



Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.)

Pulles Guevara, Evelyn Elizabeth

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de integración curricular, previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

25 de febrero del 2022



Evelyn Pulles tesis ESPE 2022.txt

Scanned on: 15:54 February 22, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

| | |
|--------------------------|-----|
| Identical Words | 299 |
| Words with Minor Changes | 66 |
| Paraphrased Words | 390 |
| Omitted Words | 0 |



Website | Education | Businesses



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.)**” fue realizado por la señorita **Pulles Guevara, Evelyn Elizabeth** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 24 de febrero de 2022



Firmado electrónicamente por:
FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Pulles Guevara, Evelyn Elizabeth**, con cédula de ciudadanía n° 1805467048, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.)** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 24 de febrero de 2022

Pulles Guevara, Evelyn Elizabeth

C.C.: 1805467048



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA
CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Pulles Guevara, Evelyn Elizabeth**, con cédula de ciudadanía n° 1805467048, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 24 de febrero de 2022

Pulles Guevara, Evelyn Elizabeth

C.C.: 1805467048

Dedicatoria

A Dios. A mis padres Jorge y Rocío. A mi familia y amigos.

Agradecimientos

Al Dr. Francisco Flores, docente de la Universidad de las Fuerzas Armadas, por ser un excelente maestro y tutor. Por su tiempo, consejos y guía en el desarrollo de este proyecto de titulación. Además, por haberme permitido ejecutar la mayor parte de la fase experimental en el Laboratorio de diagnóstico molecular IDgen.

Al Ing. Francisco Garrido, técnico del Laboratorio IDgen y a Silvana Granda, técnico del Laboratorio de Microbiología de la ESPE, por su apoyo en el desarrollo del proyecto de integración curricular.

A la Granja Agroecológica y Demostrativa de Píllaro y las personas que me facilitaron las muestras para el desarrollo del proyecto de investigación.

A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE y personal de la carrera de Ingeniería en Biotecnología. A mis docentes a lo largo de la carrera universitaria por haber compartido sus conocimientos y ser un ejemplo a seguir.

A mis padres y familia en general, por su continuo apoyo y acompañamiento durante todos estos años.

A mis compañeros y amigos de la universidad que han estado para darme una mano a lo largo de la carrera.

Índice de Contenido

| | |
|---|----|
| Resultado del análisis de Copyleaks | 2 |
| Certificación | 3 |
| Responsabilidad de autoría | 4 |
| Autorización de publicación | 5 |
| Dedicatoria..... | 6 |
| Agradecimiento..... | 7 |
| Listado de tablas | 11 |
| Listado de figuras | 11 |
| Listado de abreviaturas | 12 |
| Resumen | 14 |
| Abstract..... | 15 |
| Capítulo I: Introducción..... | 16 |
| Formulación del problema | 16 |
| Justificación del problema | 18 |
| Objetivos..... | 19 |
| Objetivo general..... | 19 |
| Objetivos específicos..... | 19 |
| Capítulo II: Marco Teórico..... | 20 |
| Cultivo de Uvilla | 20 |
| Importancia agrícola | 21 |
| Modo de cultivo | 22 |
| Producción en el Ecuador..... | 23 |
| Exportación | 24 |
| Enfermedades que afectan el cultivo | 25 |
| Enfermedad del moho gris | 27 |

| | |
|---|----|
| Sintomatología | 27 |
| Antecedentes de moho gris en cultivos uvilla | 28 |
| Agente causal | 29 |
| Características macroscópicas y microscópicas..... | 30 |
| Identificación morfológica de hongos | 31 |
| Identificación molecular de hongos | 31 |
| Marcadores moleculares..... | 32 |
| Secuenciación genética | 34 |
| Análisis filogenético | 36 |
| Postulados de Koch | 37 |
| Hipótesis | 38 |
| Capítulo III: Materiales y Métodos | 39 |
| Recolección de material vegetal | 40 |
| Aislamiento de hongos asociados a la enfermedad | 41 |
| Identificación morfológica | 42 |
| Identificación molecular..... | 42 |
| Extracción de ADN..... | 42 |
| Amplificación por PCR | 43 |
| Secuenciación y análisis bioinformático de secuencias | 44 |
| Análisis filogenético | 45 |
| Postulados de Koch | 46 |
| Capítulo IV: Resultados | 48 |
| Identificación de plantas sintomáticas | 48 |
| Aislamiento de hongos..... | 49 |
| Identificación morfológica | 49 |
| Aislado L1M5..... | 49 |

| | |
|---|----|
| Aislado L3M3..... | 51 |
| Aislado L3M7..... | 52 |
| Medición de estructuras | 54 |
| Identificación molecular..... | 56 |
| Extracción de ADN y amplificación por PCR | 56 |
| Secuenciación y análisis de secuencias | 58 |
| Análisis filogenético | 61 |
| Postulados de Koch | 63 |
| Capítulo V: Discusión | 66 |
| Capítulo VI: Conclusiones..... | 76 |
| Capítulo VII: Recomendaciones..... | 77 |
| Referencias bibliográficas | 78 |
| Anexos | 94 |

Listado de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Localidades de muestreos | 40 |
| Tabla 2. Pares de primers utilizados para la amplificación por PCR | 43 |
| Tabla 3. Especies y cepas de <i>Botrytis</i> utilizados en el análisis filogenético | 45 |
| Tabla 4. Promedio y rango de tamaños de conidios de L1M5, L3M3 y L3M7 | 55 |
| Tabla 5. Promedio y rango de tamaños de esclerocios de L1M5, L3M3 y L3M7 | 55 |
| Tabla 6. Resultados de la búsqueda de homólogos con ITS por BLAST en el NCBI | 59 |
| Tabla 7. Resultados de la búsqueda de homólogos con G3PDH y HSP60 por BLAST en el NCBI .. | 60 |

Listado de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Flujo de trabajo | 39 |
| Figura 2. Ubicación geográfica de las localidades de muestreos en la provincia de Tungurahua | 40 |
| Figura 3. Plantas de uvilla con sintomatología de la enfermedad de moho gris | 48 |
| Figura 4. Características morfológicas del aislado L1M5 | 50 |
| Figura 5. Características morfológicas del aislado L3M3 | 52 |
| Figura 6. Características morfológicas del aislado L3M7 | 53 |
| Figura 7. Esclerocios de los aislados L1M5 y L3M7 | 56 |
| Figura 8. Electroforesis de productos de PCR con el marcador ITS | 57 |
| Figura 9. Electroforesis de productos de PCR con los marcadores G3PDH y HSP60 | 57 |
| Figura 10. Árbol de máxima verosimilitud de <i>Botrytis</i> sp..... | 62 |
| Figura 11. Postulados de Koch en frutos de <i>P. peruviana</i> , reconocimiento de síntomas en individuos sanos..... | 64 |
| Figura 12. Postulados de Koch en frutos de <i>P. peruviana</i> , aislamiento del patógeno e identificación | 65 |

Listado de abreviaturas

ABM: Applied Biological Materials

ADN: Ácido desoxirribonucleico

APHIS: Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: ARN ribosomal

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

CIPF: Convención Internacional de Protección Fitosanitaria

CYTED: Ciencia y Tecnología para el Desarrollo

DDBJ: DNA Data Bank of Japan

EMBL: European Nucleotide Sequence Archive of the European Molecular Biology Laboratory

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

G3PDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GTR: General Time Reversible

HSP60: Proteína de choque térmico 60

INEC: Instituto Nacional de Estadística y Censos

ITS: internal transcribed spacer

MAG: Ministerio de Agricultura y Ganadería

MEGA-X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis X

ML: Maximum Likelihood

MLST: Multilocus sequence typing

NCBI: National Center for Biotechnology Information

nep: Proteína inductora de etileno

NGS: Next Generation Sequencing

pb: pares de bases

PCR: Polymerase chain reaction

PDA: Papa Dextrosa Agar

PIB: Producto Interno Bruto

RaxML: Randomized Axelerated Maximum Likelihood

RPB1: Subunidad I de la ARN polimerasa

RPB2: Subunidad II de ARN polimerasa dependiente de ADN

tef: Factor de elongación de traducción 1-alfa

Resumen

Los cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) han ganado importancia en el Ecuador para la exportación de los frutos frescos y deshidratados. Los cultivos, son susceptibles a ataques fúngicos. El objetivo de este proyecto fue caracterizar a nivel morfológico y molecular el agente causal de la enfermedad del moho gris en uvilla en Ecuador. Aun cuando empíricamente se ha atribuido la presencia de síntomas y signos de la enfermedad a hongos del género *Botrytis*, no se ha realizado una identificación y caracterización científica del fitopatógeno. Se obtuvieron 4 aislados (L1M5, L2M6, L3M3 y L3M7) de hongos asociados a la sintomatología de la enfermedad del moho gris de cultivos de uvilla de tres localidades en Tungurahua. Las características morfológicas de los aislados L1M5, L3M3 y L3M7 indican que pertenecen al género *Botrytis*, lo que se confirmó con el análisis molecular, al comparar las secuencias de la región ITS (espaciador transcrito interno) en la base de datos del NCBI. L2M6 se descartó por pertenecer al género *Alternaria*. Además, para el aislado L3M7 se construyó un árbol filogenético multilocus con las secuencias de los genes G3PDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) y HSP60 (proteína de choque térmico 60) para determinar su relación genética. El análisis filogenético determinó que L3M7 es *B. cinerea*. Los postulados de Koch se completaron con los aislados L1M5, L3M3 y L3M7, al observar en las plantas inoculadas la misma sintomatología identificada en campo, principalmente la pudrición del fruto y signos como la formación de moho gris.

Palabras clave:

- **PHYSALIS PERUVIANA L.**
- **ENFERMEDAD DEL MOHO GRIS**
- **FITOPATÓGENO**
- **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR**

Abstract

Golden berry (*Physalis peruviana* L.) crops have gained importance in Ecuador for the export of fresh and dried fruits. The crops are susceptible to fungal attack. The objective of this project was to characterize at the morphological and molecular level the causal agent of gray mold disease on golden berry in Ecuador. Although the presence of symptoms and signs of the disease have been empirically attributed to fungi of the genus *Botrytis*, no scientific identification and characterization of the phytopathogen has been carried out. Four isolates (L1M5, L2M6, L3M3 and L3M7) of fungi associated with the symptomatology of gray mold disease were obtained from golden berry crops from three locations in Tungurahua. The morphological characteristics of isolates L1M5, L3M3 and L3M7 indicate that they belong to the genus *Botrytis*, which was confirmed by molecular analysis, by comparing the sequences of the ITS (internal transcribed spacer) region in the NCBI database. L2M6 was discarded as belonging to the genus *Alternaria*. In addition, for isolate L3M7, a multilocus phylogenetic tree was constructed with the sequences of the G3PDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and HSP60 (heat shock protein 60) genes to determine their genetic relationship. Phylogenetic analysis determined that L3M7 is *B. cinerea*. Koch's postulates were completed with isolates L1M5, L3M3 and L3M7, when the same symptomatology identified in the field was observed in the inoculated plants, mainly fruit rot and signs such as the formation of gray mold.

Key words:

- ***PHYSALIS PERUVIANA* L.**
- **GRAY MOLD DISEASE**
- **PHYTOPATHOGEN**
- **MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

La producción de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en el Ecuador se ha incrementado en la última década, principalmente por el aumento de los volúmenes de exportación de la fruta hacia mercados internacionales, por lo que resulta una alternativa conveniente de ingresos para los agricultores ecuatorianos. Se han fortalecido los esfuerzos para satisfacer la demanda del mercado nacional e internacional, la uvilla se comercializa como fruta fresca con o sin cáliz, o como fruta deshidratada (PRO ECUADOR, 2018), siendo los principales destinos de exportación Canadá, Australia, Francia, Alemania, Países Bajos, Estados Unidos y España (PRO ECUADOR, 2020). Sin embargo, como muchos otros cultivos, son susceptibles a enfermedades causadas por bacterias, hongos y nematodos, que limitan la producción y reducen la calidad del fruto (Gongora & Rojas, 2006; CYTED, 2014).

En la producción agrícola, los cultivos afectados por patógenos fúngicos representan un gran riesgo a nivel económico que puede llegar a ser devastador, incluyendo las pérdidas de inversiones por parte de los agricultores, bajos rendimientos de producción o pérdida de hectáreas de cultivos (PRO ECUADOR, 2020; Bhunjun et al., 2021). La presencia de hongos fitopatógenos pone en riesgo la seguridad alimentaria, al no garantizar la disponibilidad de los productos para lograr abastecer a la cadena de suministros para los consumidores y exportaciones, tampoco asegurar la inocuidad de los mismos (Lehotay, 2018; Melotto et al., 2020; Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2021).

Los hongos interactúan con las plantas huésped y mantienen una relación con sus tejidos vivos, lo que puede resultar en asociaciones mutualistas, neutrales o parásitas (Rimington et al., 2020). Las comunidad fúngicas han desarrollado estrategias fisiológicas

distintivas que les permite habitar, afectar y colonizar diferentes tejidos de las especies vegetales, éstas funciones ecológicas adquiridas determinan su abundancia según el huésped y el tejido (Dávila et al., 2018). Las asociaciones mutualistas simbióticas brindan un beneficio a la planta, por ejemplo, las micorrizas en las raíces participan en el ciclo de obtención de nutrientes (Rimington et al., 2020). Sin embargo, hay casos, en los que los hongos colonizan los diferentes tejidos vegetales y su presencia causa daños significativos en la planta, debido a que han desarrollado propiedades que les da esa capacidad potencial de dañar al huésped, son varios los géneros de hongos asociados a enfermedades de las plantas (Bhunjun et al., 2021).

Los hongos del género *Botrytis* son patógenos para varias especies de plantas alrededor del mundo y son responsables de la pérdida de cultivos de importancia económica como mora, fresa, arándanos, cebolla, tomates, plantas ornamentales, entre otras. Este género fúngico tiene una gran diversidad genética, se han identificado más de 30 especies a nivel mundial hasta el momento, y casi la totalidad de ellas son patógenas de plantas (Plesken et al., 2021). Estudios han evidenciado el desarrollo de adaptaciones evolutivas en los hongos fitopatógenos, y el género *Botrytis* no es la excepción, esas variaciones les confiere dinámica y plasticidad genómica que facilitan su capacidad de infectar específicamente ciertas especies de huéspedes (Leroch et al., 2013; Weiberg et al., 2013; Plesken et al., 2021), es así que también constituyen un riesgo para la producción de uvilla.

En el Ecuador y países vecinos se ha reportado la presencia de *Botrytis* sp. como causante de la enfermedad del moho gris y pudrición del fruto (Altamirano, 2010; PRO ECUADOR, 2020), lo que claramente disminuye el rendimiento de los cultivos y afecta directamente la calidad del fruto. En el país, de forma general se asume que la especie causante del moho gris es *B. cinerea*, que si bien, es la especie con mayor incidencia en el mundo, no hay estudios que corroboren dicha afirmación en el Ecuador. Estudios en otras regiones,

demuestran una variabilidad morfológica considerable entre las especies e incluso cepas de *Botrytis*, incluidas diferencias en el crecimiento del micelio, la conidiación y la formación de esclerocios, además, se ha documentado un alto grado de variabilidad genética, presentando elementos genéticos que no todas las especies poseen, y puede ayudar en los procesos infecciosos y la virulencia (Plesken et al., 2021). La incidencia y severidad de la infección puede variar según las condiciones de manejo del cultivo, susceptibilidad del huésped, variabilidad patogénica y agresividad del hongo (Leiva et al., 2019).

Justificación del problema

Los hongos del género *Botrytis* representan un riesgo significativo para los cultivos de uvilla en el Ecuador. Estos hongos constituyen una amenaza constante, tanto antes como después de la cosecha de los frutos, lo que hace importante establecer nuevos conocimientos, clasificación y caracterización de los patógenos. De esta manera se pueden establecer técnicas de control fitosanitario, identificación temprana de las infecciones fúngicas y el fitomejoramiento, como herramientas para mejorar la seguridad alimentaria de los productos alimenticios de origen vegetal (Lehotay, 2018; Melotto et al., 2020; CIPF, 2021).

Botrytis sp. produce una infección necrotrófica, es decir, mata los tejidos vegetales para sobrevivir invadiendo las células, causando una pérdida total de los frutos afectados (Valero et al., 2020). Poseen una gran flexibilidad y versatilidad para adaptarse al estilo de vida del huésped (Garfinkel et al., 2019), por lo que fácilmente pueden ampliar su capacidad de infección a nuevos cultivos, como la uvilla. Sin embargo, en el país no se ha realizado una identificación específica del patógeno, lo que incluye la identificación de sintomatología en plantas enfermas y caracterización del hongo con base en características morfológicas macroscópicas y microscópicas y análisis molecular.

Este estudio contribuye con datos de caracterización morfológica y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en cultivos de *P. peruviana* en el Ecuador, cultivo que ha ganado un gran impulso para la exportación hacia mercados extranjeros, y debe cumplir con estrictas normas fitosanitarias para aprobar los controles antes de salir del país. La información que resulta de este estudio constituye una guía para futuros proyectos de identificación de hongos fitopatógenos y pone a disposición información genética resultante del análisis molecular.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar a nivel morfológico y molecular el agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.).

Objetivos específicos

- Aislar los microorganismos asociados con la sintomatología de la enfermedad del moho gris en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.).
- Identificar macro y microscópicamente a los microorganismos aislados a partir de las muestras de plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) con sintomatología de la enfermedad del moho gris.
- Identificar a nivel molecular a los microorganismos aislados a partir de las muestras de plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) con sintomatología de la enfermedad del moho gris.
- Completar los postulados de Koch en plantas sanas de uvilla (*Physalis peruviana* L.).

Capítulo II: Marco Teórico

Cultivo de Uvilla

La uvilla, conocida con el nombre científico de *Physalis peruviana* L. forma parte de la familia de las solanáceas, es originaria de América del Sur, específicamente de la región andina peruana (Legge, 1974) y se encuentra distribuida en las zonas altas, principalmente en el Perú, Ecuador, Colombia y Brasil (Fischer et al., 2014), en terrenos desde 1800 hasta 2800 m.s.n.m. (Fischer & Melgarejo, 2020) . Se le ha dado varios nombres según la región de procedencia, en español se la llama uchuva, chuchuva, uvilla, capulí, aguaymanto y topo, mientras que en inglés la llaman goldenberry, peruvian ground cherry, poha yam o poha berry (Fischer et al., 2011, 2014). De forma general, las plantas de uvilla se desarrollan bien en regiones de clima frío tropical con temperaturas entre los 13 y 16 °C (Fischer & Melgarejo, 2020) y una humedad relativa de 70 a 80 % (Fischer et al., 2011). Específicamente en el Ecuador, se ha reportado áreas productivas de uvilla hasta a los 3300 m.s.n.m. con una temperatura óptima de 18 °C (Fischer et al., 2021).

Las plantas de uvilla son arbustivas perennes tipos enredaderas de madera blanda que pueden crecer incluso de forma silvestre a lo largo de los Andes, alcanzando una altura de hasta 2 m (1,5 m en promedio), muestran crecimiento indeterminado, por lo que desarrollan nuevos brotes, hojas, flores y frutos casi de forma simultánea, y para su desarrollo vegetativo necesita un suministro constante de agua (Fischer et al., 2014). Las hojas tienen forma de corazón con abundante pubescencia, desarrollan flores en las axilas de las ramas, las flores son pentámeras hermafroditas en forma de campana y pedunculadas, son de color amarillo con marchas marrón o morado en la parte media de los pétalos, coronadas por un cáliz pubescente de color verde

oscuro con nervaduras moradas, con el tiempo toma una coloración dorada (Fischer et al., 2011, 2014).

El cáliz, también llamado cáscara o capuchón, se desarrolla como una envoltura que rodea todo el fruto en proceso de maduración, lo protege de las condiciones climáticas externas que podrían dañarlo, como lluvias, granizo, radiación UV, daños mecánicos, aves, insectos y enfermedades, además le brinda resistencia para cambios bruscos de temperaturas (Fischer et al., 2021; Paredes et al., 2021). En la etapa final de desarrollo, el cáliz llega a medir unos 5 cm de longitud (Lagos et al., 2008; Fischer et al., 2011). La fruta una vez madura es de forma redonda tipo baya, con un diámetro que varía ente 1,5 a 2,5 cm, y una masa de 4 a 10 gramos, presenta color amarillo o anaranjado y un sabor agridulce (Giraldo et al., 2017), en su interior almacenas de 150 a 300 semillas aplanadas (Fischer et al., 2014).

Importancia agrícola

Los últimos años se ha incrementado el interés en la producción del cultivo de uvilla en países sudamericanos como Perú, Chile, Brasil y Ecuador, debido a la apertura de negociaciones para su exportación a mercados internacionales. Es así que, ahora el cultivo de este fruto es una alternativa para potenciar la economía de muchos países y representa una oportunidad novedosa para los agricultores, quiénes por lo regular destinaban la producción al consumo local. Los frutos maduros pueden comercializarse como uvilla fresca convencional sin capuchón, uvilla orgánica sin capuchón, uvilla fresca sin capuchón en supermercados y mercados mayoristas, o incluso como frutos deshidratados, para consumo interno o exportación (PRO ECUADOR, 2018, 2020).

Entre las propiedades nutricionales que atraen la atención de los consumidores, la uvilla tiene un alto contenido de provitamina A, principalmente betacaroteno y ácido ascórbico o

vitamina C, además de las vitaminas A, D y K, se han identificado y cuantificado niacina, riboflavina, tiamina, piridoxina, vitamina B12, cloruro de colina y ácido p-aminobenzoico (Kasali et al., 2021). En la medicina naturista se utilizan los frutos de uvilla o extractos de la planta para tratamientos de enfermedades como el asma, hepatitis o reumatismos, también se recomienda para fortalecer el nervio óptico por su contenido de betacaroteno, además se utiliza también para el tratamiento de molestias intestinales al ser una planta diurética, entre otros estudios que le atribuyen propiedades antiinflamatorias, antioxidante, anti hepatotóxica e incluso actividad anticancerígena (Fuente et al., 2020; Ezzat et al., 2021; Puente et al., 2021; Yu et al., 2021).

Modo de cultivo

Las plantas de uvilla tienen un alto grado de germinación por semilla, incluso mayor que la propagación por estacas, desarrollando frutos de buena calidad. Las semillas para germinación se deben dejar secar una vez de extraídas de los frutos maduros, y deben ser tratadas con fungicidas debido al riesgo de enfermedades causadas por hongos como *Cladosporium* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Phytium* sp., *Botrytis* sp. y *Colletrotrichum* sp. De forma general el ciclo de producción (CYTED, 2014).

Es necesario mantener un suministro constante de agua durante el desarrollo vegetativo de las plantas de uvilla debido a su crecimiento indeterminado, así como la mayoría de solanáceas, sin embargo, los suelos encharcados pueden dañar el sistema radicular y matar la planta. Durante épocas de precipitación abundante justo después de períodos secos, se ha evidenciado más probabilidad de que se produzca el rajado de fruto, principalmente en los frutos maduros y de alto volumen, en esos casos se recomienda eliminar las primeras flores de

la planta para favorecer el desarrollo de nuevas flores y frutos es mejor temporada (Fischer et al., 2014).

En caso de fenómenos climáticos como granizadas, es frecuente que se den perforaciones en el cáliz y las hojas, en esos casos se recomienda podar la planta para recuperarla y aplicar fungicidas para control biológico. Por otra parte, en caso de fuertes vientos, el suelo y las plantas se deshidratan, se recomienda aplicar barreras físicas o naturales como otros frutales (Fischer & Miranda, 2012).

Producción en el Ecuador

En el Ecuador, el sector agropecuario contribuye económicamente al desarrollo del país, el último año la agricultura mostró un crecimiento del 2,2% (Banco Central del Ecuador, 2021) y en el 2019 el 22,4% de la población ocupada se dedicaba a la agricultura (Instituto Nacional de Estadística y Censos [INEC], 2020). En el Ecuador de forma tradicional se cultiva uvilla de manera silvestre, sin embargo, los últimos años se ha incentivado el cultivo con fines comerciales principalmente en la Sierra Norte, en Pichincha, Imbabura y Carchi, siendo el objetivo final la exportación del producto, en menor proporción también hay cultivos en Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar y Chimborazo, que actualmente corresponden a un total 0.02% del Producto Interno Bruto (PIB) agrícola.

Históricamente se lo ha catalogado como un cultivo agrícola familiar, de pequeños productores que destinan una parte de sus terrenos a la uvilla, y el resto del terreno a otros cultivos. Según reportes nacionales se incrementó la superficie de siembra en un 36% en el país entre el 2012 y 2016, sin embargo, se ha registrado una disminución en el rendimiento, de una producción de 24 toneladas por hectárea (t/ha) a 3 t/ha Para el 2016 (MAG, 2020; PRO ECUADOR, 2020).

Exportación

Ecuador se encuentra en la lista de los principales países exportadores mundiales de uvilla, actualmente en el país se destina el 2% de la producción a la exportación como fruta fresca, mientras que, el 22% se exporta como fruta deshidratada, por otra parte, el 28% se comercializa internamente como fruta fresca envasada en supermercados a nivel nacional, y solo el 0.3% se consume como fruta deshidratada en el país. Según un reporte del Banco Central del Ecuador en el 2019 el Ecuador exportó USD 208.000 correspondientes a uvilla fresca, siendo los principales destinos de exportación Canadá, Francia, Países Bajos, Estados Unidos y España (PRO ECUADOR, 2020).

En cuanto, a las exportaciones de uvilla deshidratada, se ha reportado que en el 2019 las exportaciones desde el Ecuador alcanzaron USD 657.000, que corresponde a un crecimiento promedio anual en el periodo entre 2016 - 2019 del 53,1% siendo los principales destinos de exportación Australia, Alemania, Estados Unidos, Reino Unido y Canadá (PRO ECUADOR, 2020). Existe un gran potencial en la exportación de uvilla deshidratada debido a que la fruta conserva las propiedades nutricionales y vitamínicas a lo largo del tiempo, en el caso puntual de Estados Unidos la uvilla se encuentra dentro del 22,28% de frutos deshidratados de exportación del país, y su comercialización está contemplada en la estrategia nacional de incrementar las exportaciones de productos agrícolas no tradicionales (PRO ECUADOR, 2018), por medio del Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (APHIS) quienes establecen los requisitos fitosanitarios (Tapia, 2019). De hecho, la uvilla consta en la lista de priorización de productos agrícolas con potencial de exportación siendo los principales mercados potenciales a los que se apunta Brasil, Corea del Sur y Uruguay (MAG, 2021).

Enfermedades que afectan el cultivo

Durante la etapa de producción y poscosecha es de vital importancia la identificación y el manejo de enfermedades en los cultivos, que pueden presentarse debido a deficiencias en el manejo fitosanitario o incorrecta aplicación de las buenas prácticas de cultivo, ocasionando pérdidas económicas, disminución del rendimiento y la calidad del fruto. Se menciona, además, que la incidencia y severidad de estas enfermedades ha ido aumentando con el tiempo. Los casos que presentan mayor patogenicidad son las enfermedades ocasionadas por microorganismos de origen fungoso y bacteriano (CYTED, 2014).

En Colombia se ha reportado la enfermedad del marchitamiento vascular por infección de *Fusarium oxysporum* como uno de los principales microorganismos responsables de la pérdida de cultivos y muerte de las plantas de uvilla, por lo que, varios productores abandonan el cultivo en busca de otras alternativas. Para prevenir esta enfermedad se recomienda control preventivo para sembrar semillas y plántulas sanas en suelos no infestados, ya que el hongo tiene resistencia a varios fungicidas (Leroch et al., 2013; Fischer et al., 2014).

En la misma región, es frecuente la infección por *Phoma* sp. causando la enfermedad de manchas en tallos, ramas, hojas y frutos en zonas de alta humedad, la infección se manifiesta por lesiones de color amarillo que afectan los tejidos. Entre otras enfermedades, se ha registrado en Colombia la mancha gris de las hojas (*Cercospora physalidis*), pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum*), moho gris (*Botrytis* sp.), manchas foliares en plantas (*Pythium* sp. y *Rhizoctonia* sp.), otros hongos como *Alternaria* sp. y *Colletotrichum gloeosporioides*, bacterias como *Xanthomonas* sp. y *Ralstonia solanacearum* y diversos virus (Gongora & Rojas, 2006; Fischer et al., 2014; CYTED, 2014).

Así también, en el Ecuador se han reportado enfermedades que pueden afectar las exportaciones y comercialización de uvillas, por una parte se ha identificado a *Fusarium oxysporum* como el agente causal de la marchitez vascular en plantas de *P. peruviana* en cultivos de la Sierra centro y norte del país, que afectan a la raíz tallo y hojas de las plantas, la infección se presenta como amarillamiento en las hojas debilitándose hasta que se marchitan y presentan necrosis, en el caso del tallo y raíz genera obstrucciones en el xilema generando una coloración marrón, necrosis y pudrición (Arellano, 2018). Paredes y colaboradores (2021) identificaron la presencia de *Cercospora beticola* en cultivos en la región centro norte de la Sierra ecuatoriana, este fitopatógeno es el agente causal de la enfermedad conocida como la mancha foliar, que ocasiona pigmentaciones en las hojas de la planta de color marrón claro que con el tiempo se secan y se vuelven quebradizas.

Otro hongo fitopatógeno que se encuentra atacando cultivos en el Ecuador es *Alternaria alternata*, se ha informado de su presencia en cultivos de Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura, confirmado que es el agente causal del secamiento descendente que causa daños a nivel de frutos (Granda, 2016; Bosquez, 2018) y también está asociado a manchas foliares en hojas de uvilla (Granda, 2016). Si bien, se han caracterizado algunos de los patógenos potenciales para cultivos de *P. peruviana* en el país, aún hacen falta más estudios de identificación de las potenciales enfermedades que pueden presentarse, para que los productores y personal de control sanitario consideren los riesgos durante la producción y tome las precauciones necesarias. De igual forma, se deben integrar los cuidados y controles preventivos durante la poscosecha, ya que, algunas enfermedades pueden presentarse durante la cadena de comercialización y exportación (Fischer et al., 2021). Varios de los hongos fitopatógenos reportados en otros países pueden llegar a infectar los cultivos nacionales, en este caso se pone

principal atención a la posible presencia de moho gris en las plantas de *P. peruviana* en el Ecuador.

Enfermedad del moho gris

Sintomatología

Se conoce que la enfermedad del moho gris es causada por el hongo del género *Botrytis*, es un microorganismo polífago, es decir, posee un extenso rango de plantas huésped y una extensa difusión en varias regiones. Afecta a una gran diversidad de cultivos de importancia para la economía, como lo es el caso del arándano, la frutilla, mora, el kiwi, la vid, tomate, entre otros, presentándose un signo característico en todos los casos, desarrollo de moho gris en el sitio de la infección (Staats et al., 2005; Hyde et al., 2014; CYTED, 2014; Terrones et al., 2019).

Es el responsable de una podredumbre de color gris en los frutos y tallos, también se presenta como tizones en las flores y brotes (Prasannath et al., 2021), en donde se puede observar el crecimiento fúngico y el desarrollo abundante de esporas, puede causar también el volcamiento de plántulas y manchas necróticas en las hojas y flores (Cepero et al., 2012). Inicialmente el crecimiento fúngico es de color blanco, que se torna de color gris por la producción de conidios (esporas asexuales) (Cepero et al., 2012; Prasannath et al., 2021).

En uvillas se han descrito lesiones de color marrón pálido en el cáliz, y posteriormente desarrollaron pudrición y el micelio de color gris, en la superficie de los frutos se observa arrugas y depresión. Durante los procesos de cosecha se pueden liberar estructuras del hongo fitopatógeno *Botrytis* y dispersarse por el viento, por lo que es posible el desarrollo de infecciones poscosecha cuando las condiciones de humedad son favorables para la germinación de los conidios (CYTED, 2014).

Antecedentes de moho gris en cultivos uvilla

En Colombia se conoce que la enfermedad del moho gris es frecuente en numerosas especies vegetales, y se ha reportado también en cultivos de uvilla, en dónde el hongo del género *Botrytis* se desarrolla sobre el cáliz y las células epidemiales de los frutos, formando un crecimiento micelial de color blanco que se torna a gris con el pasar de los días debido a la formación de conidios, la infección se ve favorecida en condiciones de alta humedad en campo (CYTED, 2014; Fischer & Melgarejo, 2020).

Por otra parte, también se ha reportado la enfermedad de moho gris en *P. peruviana* en huertos de Turquía, en la provincia de Samsun, identificando al agente causal como *Botrytis cinerea* según características morfológicas y análisis de secuencia, la importancia de este estudio radica en la demanda del cultivo en la región, en donde los síntomas incluyen arrugas y depresión de la superficie de los frutos (Erper et al., 2015). Otro reporte de la enfermedad en la misma región, afirma que los síntomas se presentaron como lesiones de color marrón pálido en el cáliz, y posteriormente desarrollaron pudrición y el micelio de color gris, se identificó al hongo como *Botryotinia fuckeliana* (teleomorfo de *B. cinerea*) (Beever & Weeds, 2007; Gümrükcü et al., 2016).

Un estudio en Chile, evidencia de que *B. cinerea* puede causar la enfermedad del moho gris en una amplia gama de plantas nativas y endémicas, lo que representa un posible impacto ecológico en la región (Notte et al., 2021). Los efectos de la contaminación de frutos de uvilla con conidios de *Botrytis* sp. en la poscosecha se demostró en un estudio de evaluación del secado del cáliz para evaluar su influencia en el comportamiento poscosecha, en los que se sometía a la fruta con cáliz a temperaturas de 18 y 24 °C, en el tratamiento a 18°C se presentó

un ataque de *Botrytis cinerea* a los 20 días de almacenamiento, evidenciando la susceptibilidad del producto y la necesidad de controles adecuados (Novoa et al., 2006).

Agente causal

Dentro del género *Botrytis* Persoon se ha clasificado a *Botrytis cinerea* como un generalista, patógeno para más de 200 huéspedes, mientras que las otras especies, son especialistas o infectan a plantas específicas (Staats et al., 2005). Se han descrito más de 30 especies de *Botrytis*, se clasifican taxonómicamente dentro de la familia Sclerotiniaceae Whetzel, incluyendo a su forma sexual *Botryotinia* Whetzel (Plesken et al., 2021). Se usa *Botrytis* en el sentido genérico para incluir tanto *Botrytis* como *Botryotinia* (Beever & Weeds, 2007). Tradicionalmente la clasificación de especies se basaba en características morfológicas y nombradas en función del huésped al que infectas, ahora se complementa con técnicas moleculares (Hyde et al., 2014; Staats et al., 2005).

Los hongos del género *Botrytis* son patógenos necrótrofos de plantas, en decir, que matan las células del huésped durante la infección, produciendo la descomposición del tejido vegetal y presenta daños significativos en diversos cultivos y principalmente en la etapa poscosecha de las frutas, verduras y plantas ornamentales (Staats et al., 2005; Cepero et al., 2012). En pocos casos la especie puede presentarse como saprófito (Zhang et al., 2016; Garfinkel et al., 2019) o endófito (Plesken et al., 2021).

B. cinerea, así como la mayoría de especies del género, produce toxinas y enzimas que les ayuda a degradar la pared celular, por lo que mata rápidamente los tejidos. Produce dos fitotoxinas principales, el policétido ácido botcínico y el sesquiterpeno botridial, implicados en la virulencia del hongo del moho gris (Dalmais et al., 2011; Porquier et al., 2019; Bhunjun et al., 2021). Se destaca su potencial patogénico al producir fitotoxinas, especies reactivas de oxígeno

(ROS), proteasas, cutinasas, enzimas que degradan la pared celular vegetal y proteínas inductoras de muerte celular vegetal (Choquer et al., 2007).

Se demostró que el género *Botrytis* se puede dividir en dos clados, uno de ellos está formado por especies que colonizan huéspedes pertenecientes a eudicotiledóneas exclusivamente, mientras que el otro clado está formado por especies patógenas tanto para eudicotiledóneas como monocotiledóneas; los árboles filogenéticos se construyeron por medio del análisis de secuencias de los fragmentos de tres genes de ADN nuclear conservados que codifican para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), la proteína de choque térmico 60 (HSP60) y la subunidad II de ARN polimerasa dependiente de ADN (RPB2) (Staats et al., 2005; Hyde et al., 2014; Plesken et al., 2021).

Características macroscópicas y microscópicas

Son hongos de crecimiento rápido que forman colonias hialinas con micelio vegetativo que se torna blanquecino a la vista, al madurar presentan una coloración grisácea o marrón oscuro de textura algodonosa por la abundante esporulación del hongo (Cepero et al., 2012). El micelio es septado y ancho. Desarrollan conidióforos anchos que pueden permanecer solitarios y en grupos, son estructuras proliferativas que en la zona apical presentan unas vesículas que producen los conidios o esporas producidas mitóticamente (Staats et al., 2005).

Los conidios son unicelulares, ovalados y elipsoidales con paredes lisas que permanecen sobre dentículos cortos en arreglo botrioso o ramificados similar a un árbol. Además, algunos aislamientos pueden desarrollar esclerocios, estructuras de tejido pseudoparenquimatoso (Cepero et al., 2012) de color negro, que se forman de micelio melanizado para la supervivencia, ya que, pueden permanecer sobre restos vegetales o en el suelo durante las épocas del invierno (Staats et al., 2005).

Identificación morfológica de hongos

La identificación morfológica de hongos consiste en la clasificación por medio de las características físicas macroscópicas y microscópicas que presentan durante su desarrollo, lo que permite diferenciar a unos grupos de otros. Entre los parámetros de análisis se incluyen las características del micelio como su apariencia, color, textura, patrón de crecimiento, pigmentación, formación de esclerocios, entre otros. A nivel microscópico se debe observar el color, diámetro y la presencia o no de septos en las hifas, ramificación de conidióforos y formación de conidios. En cuanto al color, las hifas pueden ser incoloras o hialinas u oscuras o dematiáceas, determinado por la presencia de melanina. Los septos son paredes transversales que dividen las hifas en compartimentos, característica que permite también identificar unos hongos de otros (Cepero et al., 2012).

Las técnicas de identificación morfológica son útiles como una guía de clasificación, sin embargo, no siempre permiten una distinción adecuada de todos los grupos fúngicos presentes, debido a las diferencias de crecimiento de los hongos del medio natural o en los diferentes medios de cultivo, por ejemplo, se puede dar que el hongo no esporule en medio de cultivo, lo que reduce un parámetro morfológico de identificación, se puede perder información valiosa y no resulta del todo confiable (Keating et al., 2020), es por ello que se han desarrollado técnicas de identificación molecular perfeccionadas a lo largo de los años, que se basan en secuencias de ADN para identificar especies de hongos (Shinohara et al., 2021).

Identificación molecular de hongos

Ahora las técnicas moleculares de identificación basadas en ADN proveen mayor especificidad al distinguir entre especies y subespecies de hongos, son más rápidos y confiables que las técnicas morfológicas y pruebas bioquímicas que se utilizan en el diagnóstico. La

identificación molecular se basa en la determinación de especies por medio de barcoding, que consiste en el análisis de regiones cortas estandarizadas de ADN de entre 400-800 pares de bases (pb) en el genoma (Raja et al., 2017), funciona de forma análoga a un código de barras (barcoding) que le corresponde exclusivamente a un producto en una tienda, la clave está en escoger las regiones moleculares adecuadas (Tekpinar & Kalmer, 2019).

El flujo de trabajo incluye una extracción de ADN fúngico total de los aislados, seguido de una amplificación de los genes seleccionados mediante reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR) para el barcoding y secuenciación, una vez con las secuencias genéticas se procede con el análisis bioinformático, se deben comparar con las bases de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (Federhen, 2012) que incluye el GenBank, el Archivo Europeo de Secuencias de Nucleótidos del Laboratorio Europeo de Biología Molecular (European Nucleotide Sequence Archive of the European Molecular Biology Laboratory, EMBL) o el Banco de datos de ADN de Japón (DNA Data Bank of Japan, DDBJ) con el fin de identificar la o las especies en función de la similitud de secuencia, en análisis se realiza por medio de un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST, Basic Local Alignment Search Tool) (Dereeper et al., 2010; Raja et al., 2017). Finalmente, si el objetivo es clasificar el aislado y ubicarlo dentro de un esquema taxonómico para establecer su relación filogenética, se aplica un análisis filogenético a partir técnicas de análisis bioinformático a partir de las secuencias (Schmitt & Barker, 2009).

Marcadores moleculares

Se utilizan datos de marcadores moleculares, es decir, secuencias genéticas, para la identificación de hongos, por ejemplo, se utilizan las regiones no codificantes espaciadoras entre

los genes conservados de ARN ribosomal (ARNr) 18S, 5.8S y 28S (White et al., 1990; Tekpinar & Kalmer, 2019), específicamente toda la región que incluye dos espaciadores intergénicos transcritos 1 y 2 (ITS1-5.8S-ITS2; aprox. 0,45–0,80 kb) (Raja et al., 2017). El espaciador transcrito interno nuclear (internal transcribed spacer, ITS), fue categorizada como el código de barras de ADN oficial para hongos aprobada por el Consorcio para el Código de Barras de la Vida, esta región evoluciona más rápido y tiene mayor variación, es el marcador molecular más útil para la identificación a nivel de género y especie con mayor probabilidad de identificación correcta, es de fácil amplificación y de uso generalizado, y puede ser utilizada sola o en conjunto con otros genes (Schoch et al., 2012; Raja et al., 2017; Heeger et al., 2019). Además, son ampliamente utilizados para análisis filogenético, ya que se encuentran universalmente distribuidos, funcionalmente constantes, suficientemente conservados y de longitud adecuada para proporcionar una visión de las relaciones evolutivas (Alsohaili & Bani-Hasan, 2018).

Alternativamente, se pueden utilizar genes que codifican proteínas, ya que, en teoría se presentan en el genoma como una sola copia siendo menos variables en longitud. Estos genes acumulan menos mutaciones en los exones, por lo que, son más fáciles de alinear que los genes de ARNr (Raja et al., 2017). Estos genes se utilizan para construir filogenias moleculares para la identificación y clasificación de taxones más estables, favoreciendo la comprensión de relaciones evolutivas entre hongos. Estos genes son considerados marcadores secundarios, incluyen el factor de elongación de traducción 1-alfa (*tef1*), con potencial como código de barras de mejor resolución que el ITS; la subunidad más grande de la ARN polimerasa (RPB1), la segunda más grande (RPB2), y la beta-tubulina (*tub2/BenA*), que permiten la identificación a nivel de especie para la gran mayoría de los géneros de Ascomycota, como *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Raja et al., 2017; Tekpinar & Kalmer, 2019).

Staats y colaboradores (2005) ejecutó la primera clasificación molecular completa de *Botrytis* sp. basado en la comparación de las secuencias de los genes G3PDH, HSP60 y RPB2 como marcadores moleculares conservados, también utilizados en varios estudios posteriores para la clasificación de especies (Li et al., 2012; Liu et al., 2016; Saito et al., 2016; Zhang et al., 2016; Prasannath et al., 2021). También se han utilizado los genes que codifican proteínas inductoras de etileno 1 y 2 (nep1 y nep2) que proporcionan una resolución más alta, ya que se observó una mayor variabilidad entre especies, sin embargo, se había puesto en cuestión su validez debido a que el estudio sugirió que estas proteínas estarían involucradas en el proceso de infección y que evolucionaron por selección positiva, por lo tanto, podrían no ser marcadores filogenéticos neutrales (Staats et al., 2007; Hyde et al., 2014).

La presencia o ausencia del retrotransposon repetido terminal largo Boty y el transposón de ADN Flipper (Diolez et al., 1995; Levis et al., 1997; Notte et al., 2021), se usa para clasificar cepas en 4 tipos, Boty o Flipper que solo tienen uno de los retrotransposones, “transposa” que tiene ambos o “vacuma” que no tienen ninguno, este último se definió como una nueva especie denominada *B. pseudocinerea* (Walker et al., 2011). Finalmente, también se ha desarrollado un esquema de tipificación de secuencias multilocus (MLST) con 10 genes para la diferenciación y clasificación de las cepas del clado 1 y posiblemente también del clado 2, seleccionados por su alta variabilidad y congruencia filogenética que reveló una clara separación y ubicación filogenética de todas las especies de *Botrytis* (Plesken et al., 2021).

Secuenciación genética

La secuenciación de genomas consiste en determinar el orden de nucleótidos por medio de tecnologías de laboratorio, se aplica en conjunto con herramientas de análisis bioinformático e interpretación de datos. La secuenciación Sanger, también llamada secuenciación de

terminación de cadena, requiere de una cadena de ADN molde, ADN polimerasa, los 4 deoxinucleótidos (dNTD) marcados con fluoróforos diferentes y dideoxinucleótidos (ddNTP). Los ddNTP carecen de un grupo 3' OH, por lo que, el enlace fosfodiéster entre el C3' OH del último resto de azúcar y el C5' de los siguientes dNTP no se formará, lo que resulta en la terminación de la cadena en ese punto. El resultado se obtiene mediante una electroforesis capilar acoplado a un detector de fluorescencia, cada color corresponde a una base nitrogenada diferente y el orden de emisiones permite determinar la secuencia (Sanger et al., 1977; Verma et al., 2017).

La diferencia principal con otras técnicas, como las tecnologías de secuenciación de próxima generación (NGS) es el volumen de secuenciación, Sanger solo secuencia un fragmento de ADN a la vez, mientras que, NGS es masivamente paralelo. En ese caso Sanger se recomienda para un bajo número de muestras resultando más rentable, sin embargo, puede tener baja sensibilidad y baja escalabilidad. Por otra parte, en cuanto a la longitud de las secuencias, NGS tiene la limitación de que sus lecturas son relativamente cortas, en un rango de 40-400 pb, mientras que Sanger permite longitudes de 800-1000 pb (van Dijk et al., 2018; Rubio et al., 2020). Si bien en los últimos 40 años se han puesto a disposición muchas nuevas técnicas de secuenciación, las nuevas generaciones no desplazan a las anteriores, sino que se superponen, y el objetivo final es permitir un análisis genómico completo (McGinn & Gut, 2013; van Dijk et al., 2018).

Las técnicas de secuenciación aplicadas para el análisis de genomas fúngicos han permitido la identificación de docenas de especies de hongos patógenos de plantas, lo que permite determinar los rasgos y cualidades que ayudan en los procesos de infección e información sobre su evolución (Gongora & Rojas, 2006).

Análisis filogenético

El análisis filogenético utiliza la variación genética entre secuencias de ADN para identificar taxones, con la aplicación de técnicas de análisis bioinformático a partir de las secuencias para identificar una especie desconocida y ubicarla en un marco evolutivo y taxonómico en comparación con otras secuencias de especies homólogas. Se basa en la alineación de secuencias múltiples y técnicas de construcción de árboles para analizar las relaciones filogenéticas (Schmitt & Barker, 2009; Hyde et al., 2014). Se pueden utilizar uno o más genes ribosómicos o genes que codifican proteínas para la identificación de especies a través barcoding, los últimos permiten una mejor resolución a niveles taxonómicos más altos en comparación con los genes de ARNr, debido a la presencia de regiones de intrones, que a veces evolucionan a un ritmo más rápido en comparación con ITS (Tekpinar & Kalmer, 2019).

Las herramientas de creación de árboles permiten estimar las relaciones filogenéticas entre especies utilizando cualquier región de genes individuales o concatenados, para ubicar al individuo en un clado o grupo filogenético (Raja et al., 2017). Es recomendable obtener una pista del grupo taxonómico del hongo con genes de ARNr, como la familia o el género, y posteriormente, usar genes codificadores de proteínas nucleares para proporcionar una identificación más concluyente a nivel de especie (Hyde et al., 2014; Tekpinar & Kalmer, 2019).

En la creación de árboles filogenéticos se puede aplicar el criterio de optimización según el método de máxima verosimilitud (Maximum Likelihood, ML) que se basa en un modelo estocástico de evolución de secuencia de nucleótidos o aminoácidos, en busca del árbol con la puntuación más alta de verosimilitud y que maximiza la probabilidad de los datos de la secuencia dados en el árbol (Jill Harrison & Langdale, 2006; Yang & Rannala, 2012). Por otra parte, se puede aplicar la inferencia bayesiana (teorema bayesiano) en el que se postula un

modelo de evolución y el software busca el mejor árbol que sea consistente y que maximiza la probabilidad del árbol dados los datos y el modelo de evolución de la secuencia, se usa principalmente para modelos evolutivos complejos (Holder & Lewis, 2003; Keating et al., 2020; Wang et al., 2020).

El soporte estadístico para árboles filogenéticos permite cuantificar la solidez de los datos utilizados para construir el árbol, generalmente se cuantifica por medio de valores de soporte bootstrap (valores de arranque, BS). El valor de arranque muestra el porcentaje de veces que aparece un clado cuando los caracteres individuales en el conjunto de datos se eliminan aleatoriamente y se reemplazan con datos de otro carácter del mismo conjunto de datos, y el análisis se realiza nuevamente para un número específico de repeticiones, el valor de soporte representa la probabilidad de que un nodo sea correcto (Jill Harrison & Langdale, 2006).

La inferencia filogenética se aplica en base a modelos de sustitución de nucleótidos, que describen, cómo evolucionan las secuencias con respecto al tiempo. El modelo más complejo es el General Time Reversible (GTR), que supone diferentes frecuencias de nucleótidos y seis tasas de sustitución diferentes, por lo tanto, determina la probabilidad de cambio de un nucleótido en una posición de la matriz en un tiempo determinado, es así que, permite estimar distancias y matrices de tasas de sustitución (Gatto et al., 2007; Chen et al., 2019).

Postulados de Koch

Los postulados fueron propuestos por Robert Koch en 1882 como un protocolo experimental que buscaba demostrar la relación causal entre un microorganismo y la enfermedad en un hospedero susceptible. Se deben cumplir varios criterios secuenciales, primero que el microorganismo debe encontrarse en abundancia en tejido de enfermo y ausente en tejidos sanos, además, el microorganismo debe aislarse mediante cultivo puro del

tejido enfermo para caracterizarlo, a continuación, el microorganismo cultivado debería causar la enfermedad al ser inoculado en individuos sanos, y finalmente, el microorganismo debe ser aislado del huésped experimental enfermo, debe presentar los mismos síntomas observados inicialmente, y las características morfológicas y biológicas deben coincidir con el aislamiento original (Bhunjun et al., 2021).

El propósito es demostrar la asociación específica del microorganismo con la enfermedad, por medio de evidencias microbiológicas, patológicas y clínicas. Sin embargo, se debe tomar en cuenta algunas limitaciones, como que varios de los microorganismos pueden estar en portadores asintomáticos o que la presencia de algún microorganismo no siempre implica la presencia de enfermedad, además, no siempre la inoculación de un microorganismo puede causar la enfermedad en un huésped sano, ya que hay varios factores que pueden influir, además, cuando las enfermedades son causadas por patógenos obligados no se pueden aislar en medios de cultivo sintéticos (Volcy, 2008; Bhunjun et al., 2021).

Se han propuesto otros criterios de análisis que se pueden aplicar en conjunto con los postulados de Koch, que dependen del agente patógeno y la etiología de la enfermedad, como la aplicación de técnicas moleculares y fotografía de longitud de onda visible para cuantificar la enfermedad. En el caso de infecciones fúngicas en plantas, si se puede aplicar como tal los postulados de Koch, y se pueden complementar con análisis molecular para el diagnóstico de enfermedades en plantas (Volcy, 2008; Hosainzadegan et al., 2020).

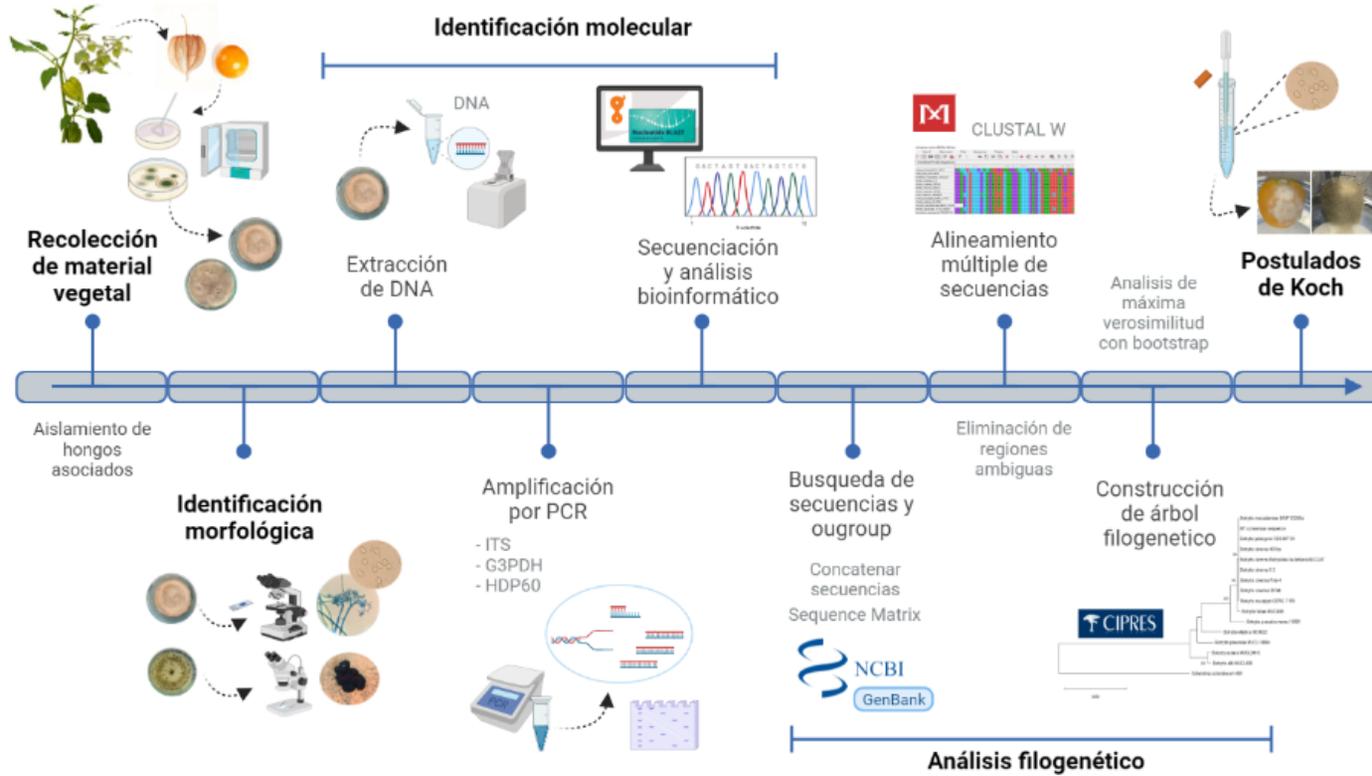
Hipótesis

El agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en el Ecuador pertenece al género *Botrytis*.

Capítulo III: Materiales y Métodos

Figura 1

Flujo de trabajo de la caracterización a nivel morfológico y molecular



Nota. Creado en BioRender.com

Recolección de material vegetal

El muestreo de material vegetal de plantas de uvilla se realizó durante el mes de octubre del 2021, en tres localidades de la provincia de Tungurahua, en el cantón Ambato (L1), Cevallos (L2) y Píllaro (L3). Se recolectaron de forma aleatoria muestras con sintomatología de la enfermedad de moho gris, principalmente de cáliz y fruto, cada muestra se guardó en fundas herméticas individuales que se almacenaron en refrigeración por hasta 5 días. Se recolectaron un total de 25 muestras y se transportaron al laboratorio, donde se desarrollaron los protocolos de aislamiento y el diagnóstico de la enfermedad causada por el hongo.

Tabla 1

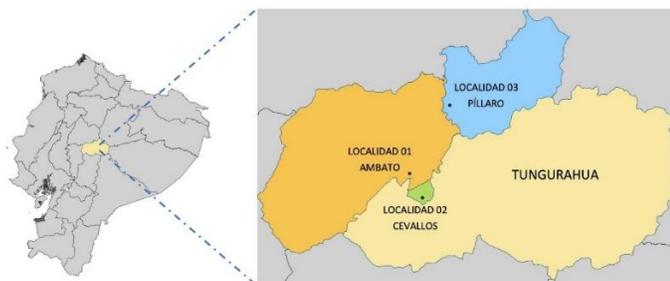
Localidades de muestreos

| Localidad | Provincia | Cantón | Coordenadas |
|-----------|------------|----------|--------------------------|
| L1 | Tungurahua | Ambato | 1°18'44.3"S 78°38'14.8"W |
| L2 | Tungurahua | Cevallos | 1°21'36.9"S 78°36'43.6"W |
| L3 | Tungurahua | Píllaro | 1°10'35.1"S 78°33'29.5"W |

Nota. Coordenadas determinadas con GPS

Figura 2

Ubicación geográfica de las localidades de muestreos en la provincia de Tungurahua



Nota. Mapa creado en QGIS 3.22.3

Aislamiento de hongos asociados a la enfermedad

Las muestras sintomáticas se incubaron en cámaras húmedas para favorecer el crecimiento fúngico y la esporulación durante cuatro días a 20°C, hasta observar la formación de abundante micelio y esporas en la superficie vegetal. Se obtuvieron cultivos monospóricos a partir de una solución de esporas, la solución se preparó raspando los conidios presentes en la muestra vegetal, con un asa estéril procurando no tocar la fruta o el cáliz, se re suspendieron en 15 mL de una solución de agua destilada estéril y se filtró a través de una gasa estéril. De la suspensión de conidios obtenida, se tomaron 200 µL y se sembraron en medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA, 39 g/L) con ampicilina (1 µL/mL) en cajas Petri selladas y se incubó a 30 °C, en oscuridad durante un rango de 36 horas. Se transfirieron los conidios germinados a una nueva placa de PDA y se dejó incubar a 30°C hasta que el hongo crezca, se seleccionaron aquellos que cumplen con las características macroscópicas de moho gris (Li et al., 2012; Terrones et al., 2019; Notte et al., 2021).

De forma simultánea, a partir de los crecimientos de las cámaras húmedas se extrajeron muestras de 3x3 mm de material vegetal sintomático, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, seguido de tres lavados con agua destilada estéril y se sembraron en medio de cultivo PDA con ampicilina en cajas Petri selladas con Parafilm y se incubó a 30 °C, en oscuridad durante 72 horas, modificado de Bosquez (2018). Luego, se aislaron nuevamente aquellos hongos que cumplían con las características macroscópicas descritas del moho gris en medio de cultivo fresco. Para inducir la esporulación de los cultivos se aplicaron ciclos de luz oscuridad de 12 horas, a temperatura ambiente (Bhunjun et al., 2021). Una vez que se obtuvieron cultivos puros, las esporas se conservaron en agua destilada a 4°C para los postulados de Koch (Notte et al., 2021).

Identificación morfológica

De los aislados obtenidos, se seleccionaron aquellos que cumplieran con las características macroscópicas esperadas del moho gris, como son la coloración del micelio, textura, forma crecimiento del micelio, tiempo de esporulación, días de formación de esclerocios, color, forma y tamaño de esclerocios (Erper et al., 2015; Saito et al., 2016; Terrones et al., 2019).

A continuación, se visualizaron en un microscopio las estructuras de hongos de los aislados seleccionados utilizando el objetivo 40X y 100X, con y sin tinción utilizando azul de metileno, en busca de coincidencias en cuanto a morfología estructural, lo que incluye tipo de crecimiento, color, tamaño y forma de los conidióforos y conidios (Erper et al., 2015; Saito et al., 2016; Terrones et al., 2019; Prasannath et al., 2021).

Identificación molecular

Extracción de ADN

Se extrajo ADN del micelio crecido en PDA, se tomaron aproximadamente 50 mg de muestra en un tubo de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio estériles, con 500 μ L de buffer de extracción (2,5% w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl [pH 8,0]) y 2 μ L de β -mercaptoetanol). Después de macerar enérgicamente con ayuda del vortex se incubó en baño María a 60 °C por 30 min, mezclando por inversión cada 10 minutos. Seguidamente, se añadieron 500 μ L de cloroformo, congelado y se homogeneizó en Vortex por 30 segundos. Después de unos segundos de reposo, se procedió con la centrifugación a 14.500 x g durante 5 a 10 min. El sobrenadante se transfirió a nuevo tubo estéril de 1.5 mL y se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 μ L de Acetato de sodio 3M y 300 μ L ml de etanol 70% filtrado, se dejó precipitar el ADN toda la noche a -20 °C. Se eliminó el sobrenadante después de una centrifugación a 14.500 x g durante 14-17 min y se realizaron dos lavados con 200 μ L de etanol

70%. Finalmente, se re suspendió el pellet de ADN 25 µL de agua ultra pura con 1 µL ARNasa y se dejó incubar por 30 min a 37 ° C. Se cuantificó la concentración de ADN y se determinó la calidad usando un espectrofotómetro Nanodrop, finalmente, se almacenaron las muestras a -20 °C hasta su posterior uso (Berrendero et al., 2008).

Amplificación por PCR

Para la identificación del hongo causante de moho gris se utilizó como marcador molecular de código de barras de ADN primario la secuencia del ITS con el par de primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990; Hyde et al., 2014; Notte et al., 2021), mientras que, como marcadores secundarios se utilizaron las secuencias parciales de los genes G3PDH y HSP60, con los primers G3PDH-F/G3PHD.R y HSP60-F/HSP60-R (Staats et al., 2005; Li et al., 2012; Hyde et al., 2014; Notte et al., 2021). En la Tabla 2 se encuentran las secuencias de los primers (Macrogen, Corea) utilizados para la amplificación de los genes mencionados.

Tabla 2

Pares de primers utilizados para la amplificación por PCR

| Nombre del Primer | Región genética | Amplicón (pb) | Secuencia de nucleótidos del primer (5' - 3') |
|--------------------------|------------------------|----------------------|--|
| ITS1 ^a | 5.8SARNr-ITS | ~ 500 | TCCGTAGGTGAACCTGCGG |
| ITS4 ^a | | | TCCTCCGCTTATTGATATGC |
| G3PDH-F ^b | <i>G3PDH</i> | ~ 888 | ATTGACATCGTCGCTGTCAACGA |
| G3PDH-R ^b | | | ACCCCACTCGTTGT CGTACCA |
| HSP60-F ^b | <i>HSP60</i> | ~ 900 | CAACAATTGAGATTTGCCACAAG |
| HSP60-R ^b | | | GATGGATCCAGTGGTACCGAGCAT |

Nota. ^a White et al. (1990). ^b Staats et al. (2005).

La PCR se realizó en un volumen final de 25 μL , utilizando polimerasa comercial (2x Taq Master Mix with dye, Applied Biological Materials [ABM]) y 2 μL de ADN como plantilla. Los ciclos de amplificación para cada uno de los genes se programaron en un Termociclador. Para la región del ITS la amplificación empezó con 1 ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturalización, anillamiento (annealing) y extensión a 94 °C por 30 segundos (s), 53,5 °C durante 30 s y 72 °C por 45 s, y un ciclo de extensión final a 72 °C durante 4 min. Por otra parte, para amplificar el fragmento de G3PDH y HSP60 se comenzó con un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 60 s, seguido de 30 ciclos de desnaturalización, annealing y extensión a 95 °C durante 30 s, 64 °C por 60 s, 72 °C durante 45 s, y un ciclo de extensión final a 72 °C durante por 5 minutos. modificado de Notte y colaboradores (2021) . Para evaluar la calidad de los productos de PCR, se separó los amplicones por electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris, ácido bórico, 0.5 M EDTA [pH 8,0]) teñido con bromuro de etidio y marcador molecular.

Secuenciación y análisis bioinformático de secuencias

Los productos de PCR correspondientes a los genes ITS, G3PDH y HSP60 se secuenciaron en ambas direcciones con tecnología Sanger en MacroGen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias de ADN se limpiaron y ensamblaron en Geneious Prime (Biomatters Ltd., v. 2022.0.1) para obtener las secuencias consenso de cada locus. Las secuencias se compararon con otros organismos en busca de los parientes filogenéticos más cercanos en la base de datos de nucleótidos del NCBI con el fin de determinar el género y especie de los aislados (Li et al., 2012; Prasannath et al., 2021).

Análisis filogenético

Se utilizaron las secuencias de los genes G3PDH y HSP60 concatenados para el análisis filogenético y construcción de un árbol multilocus de máxima verosimilitud y se compararon con las secuencias genéticas de algunas especies reconocidas de *Botrytis*, incluyendo *B. cinerea* y un taxón externo (outgroup), obtenidas del NCBI (Tabla 3) (Hyde et al., 2014; Notte et al., 2021; Prasannath et al., 2021). Se realizó un alineamiento múltiple de secuencias usando CLUSTAL W y se determinó el mejor modelo para la construcción del árbol filogenético en el programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA-X) (Notte et al., 2021).

Se eliminaron las posiciones mal alineadas y regiones divergentes del alineamiento de secuencias de ADN utilizando Gblocks v. 0.91b y se concatenaron las secuencias genéticas con la interfaz Sequence Matrix. Se utilizó el portal CIPRES Science Gateway V. 3.3. con el programa Randomized Axelerated Maximum Likelihood (RaxML) (Stamatakis, 2014), para la inferencia filogenética basada en máxima verosimilitud, con la ejecución de 1000 réplicas de inferencias de arranque rápido (He et al., 2021). Las matrices de distancias evolutivas se calcularon mediante el método complejo de sustitución de nucleótidos gamma GTR, predeterminado en el software.

Tabla 3

Especies y cepas de Botrytis utilizados en el análisis filogenético

| Especie | Colección/cepa | Huésped | Accesión | Accesión |
|-----------------------|----------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
| | | | G3PDH ^a | HSP60 ^a |
| <i>B. californica</i> | X655 | <i>Vitis vinifera</i> L. | KJ937069 | KJ937059 |
| <i>B. cinerea</i> | MUCL87 | >200 plantas | AJ705004 | AJ716065 |
| <i>B. cinerea</i> | 5-3 | >200 plantas | MH796662.1 | MH796663.1 |

| | | | | |
|-------------------------|-------------|--------------------------------------|------------|------------|
| <i>B. cinerea</i> | 207dbH | >200 plantas | KY930938.1 | KY930939.1 |
| <i>B. cinerea</i> | Poly-4 | >200 plantas | MG846499.1 | MG846504.1 |
| <i>B. elliptica</i> | BE0022 | <i>Lilium</i> spp. L. | AJ705010 | AJ716071 |
| <i>B. eucalypti</i> | CERC 7170 | <i>Eucalyptus</i> | KX301020 | KX301024 |
| | | <i>urophylla</i> × <i>Eucalyptus</i> | | |
| | | <i>grandis</i> | | |
| <i>B. fabae</i> | MUCL98 | <i>Vicia</i> spp. L. | AJ705014 | AJ716075 |
| <i>B. ficariarum</i> | CBS176.63 | <i>Ficaria verna</i> | AJ705015 | AJ716076 |
| <i>B. macadamiae</i> | BRIP 72295a | <i>Macadamia</i> | MZ344226.1 | MZ344237.1 |
| | | <i>integrifolia</i> Maiden & | | |
| | | Betche | | |
| <i>B. pelargonii</i> | CBS497.50 | <i>Pelargonium</i> spp. L. | AJ704990 | AJ716046 |
| <i>B. pseudocinerea</i> | 10091 | <i>Vitis vinifera</i> L. | JN692414 | JN692400 |
| <i>B. ranunculi</i> | CBS178.63 | <i>Ranunculus</i> spp. L. | AJ705034 | AJ716095 |
| <i>Sclerotinia</i> | 484 | - | AJ705044 | AJ716048 |
| <i>sclerotiorum</i> | | | | |

Nota. ^a Números de acceso de la base de datos de nucleótidos del NCBI.

Postulados de Koch

Se realizaron los postulados de Koch a partir de los aislados L1M5, L3M3 y L3M7 del hongo asociado a la enfermedad del moho gris a partir de las muestras vegetales sintomáticas, con el objetivo de completar los postulados de Koch. Se seleccionaron uvillas sin cáliz en estado de madurez fisiológica de supermercado. Las frutas desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril, finalmente se dejaron

secar y se colocaron dentro de recipientes plásticos individuales (método de cámara húmeda) (Bosquez, 2018; Bhunjun et al., 2021).

Se realizaron tres ensayos de inoculación: inyección con una jeringa, inoculación en una herida e inmersión del fruto, cada uno con su respectivo control. Se utilizaron soluciones de conidios de cada aislado a una concentración de 4×10^5 conidios/mL para L1M5, L3M3 y a 3×10^5 conidios/mL para L3M7. Se inocularon 3 frutos por cada ensayo, utilizando suspensión de conidios por cada aislado, con 3 frutos control para cada caso en los que se aplicó agua destilada estéril (Bhunjun et al., 2021). En los dos primeros ensayos se aplicaron aproximadamente 15 μ L de inóculo, la laceración se realizó con un bisturí en la parte lateral del fruto de 1 mm de longitud. Los recipientes se sellaron herméticamente para favorecer un ambiente húmedo y se incubaron a 20 °C, se evaluaron cada 24 horas por un periodo de 10 días (Notte et al., 2021). Por último, se re aislaron los hongos que produjeron lesiones en los frutos inoculados, en medio de cultivo PDA, se caracterizó macroscópicamente y microscópicamente, y se compararon características morfológicas con los aislados originales.

Capítulo IV: Resultados

Identificación de plantas sintomáticas

Se buscaron cultivos de uvilla en los cantones de Tungurahua, y se identificaron aquellos en los que había plantas enfermas. En campo se identificaron síntomas correspondientes a los descritos durante la enfermedad del moho gris en plantas de cáliz y fruto de *P. peruviana*, lo que incluye la presencia de crecimiento fúngico de color gris o marrón oscuro en la superficie, podredumbre en los frutos, así como tizones sobre el tejido vegetal. Las muestras fueron analizadas visualmente a detalle en el laboratorio, se observó crecimiento fúngico o esporas de color grisáceo que cubría parcialmente el cáliz, y en casos de heridas hongo penetra hasta llegar al fruto en donde se presenta un mayor volumen de crecimiento y desarrollo de esporas.

Figura 3

Plantas de uvilla con sintomatología de la enfermedad de moho gris



Aislamiento de hongos

Del total de muestras recolectadas en las tres localidades (L1, L2 y L3) de la provincia de Tungurahua, se aislaron varios hongos, de los cuales se seleccionaron aquellos con las características de crecimiento fúngico descritas para hongos del género *Botrytis*, causantes la enfermedad del moho gris para análisis posteriores descritos en la metodología. Los aislados seleccionados se nombraron como L1M5, L2M6, L3M3 y L3M7. El aislado L1M5 pertenece a la localidad L1, L2M6 a la localidad L2 mientras que, los aislados L3M3 y L3M7 pertenecen a L3. Algunos aislados se descartaron por análisis morfológico al pertenecer a otros géneros fúngicos, el más común fue *Alternaria*, ya caracterizado en cultivos de uvilla.

Identificación morfológica

Todos los cultivos fueron incubados en cajas Petri con medio PDA con ampicilina a 30°C durante los primeros días y, posteriormente, a temperatura ambiente hasta observar la producción de conidios que dan una coloración gris o marrón a simple vista, además, también se dio la producción de esclerocios en algunos cultivos. Por las características morfológicas que presentaron los aislados L1M5, L3M3 y L3M7, se determinó que pertenecen al género *Botrytis*. Los aislados del cantón Cevallos (L2) presentaron características morfológicamente consistentes con géneros diferentes a *Botrytis*; en el caso específico de L2M6, el hongo presentó micelio color gris diferente a los aislados de la misma localidad y no esporuló (resultados no mostrados), por lo que se incluyó en el análisis molecular.

Aislado L1M5

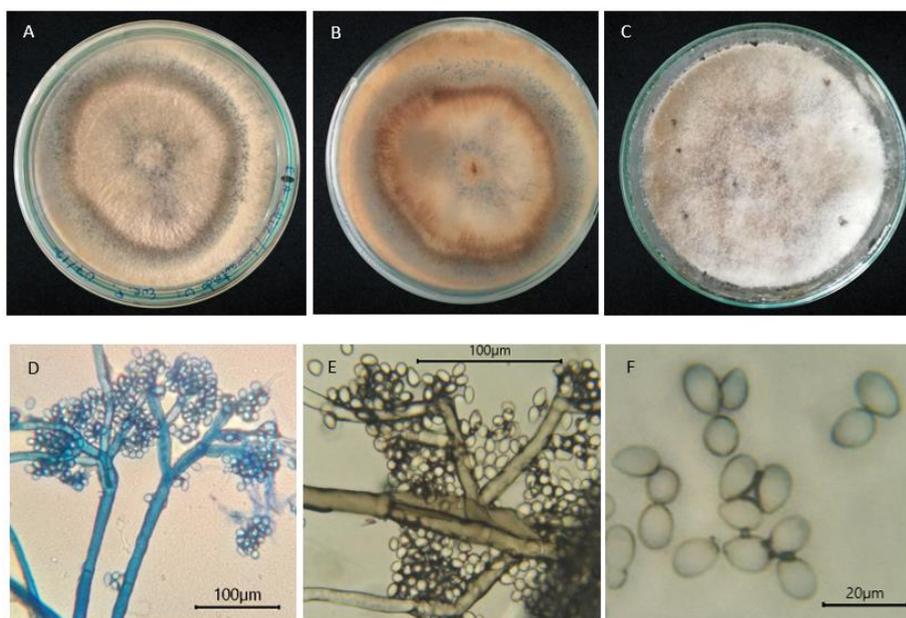
El cultivo presentó una coloración blanca durante los primeros 6 días de crecimiento, el micelio posteriormente se tornó de color gris claro debido principalmente al inicio de la producción de conidios a los 9 días. El reverso de la caja Petri mantuvo una coloración blanca

inicial, y después marrón claro que se intensificó en las zonas con mayor esporulación. Se observó desarrollo de micelio gris aéreo flocoso en la parte central, que se extiende de forma superficial hacia los bordes de la caja, con el tiempo toma un color grisáceo oscuro por la densidad de conidios.

Microscópicamente presenta crecimiento filamentoso con hifas septadas hialinas de color marrón, con desarrollo de conidióforos largos y septados ramificados, en el extremo terminal se observa producción de conidios en arreglo botrioso. En cuanto a los conidios, son de forma ovoidea, unicelulares de paredes lisas, hialinos de color marrón claro. Una de las réplicas desarrolló esclerocios a los 30 días, distribuidos de forma irregular sobre el micelio, los esclerocios tienen borde irregular y son de color negro.

Figura 4

Características morfológicas del aislado L1M5



Nota. Aislado L1M5 de 13 días identificado morfológicamente como *Botrytis* sp. en medio PDA a 30 °C. A. Anverso, crecimiento de micelio aéreo y conidios, que le da coloración gris claro. B.

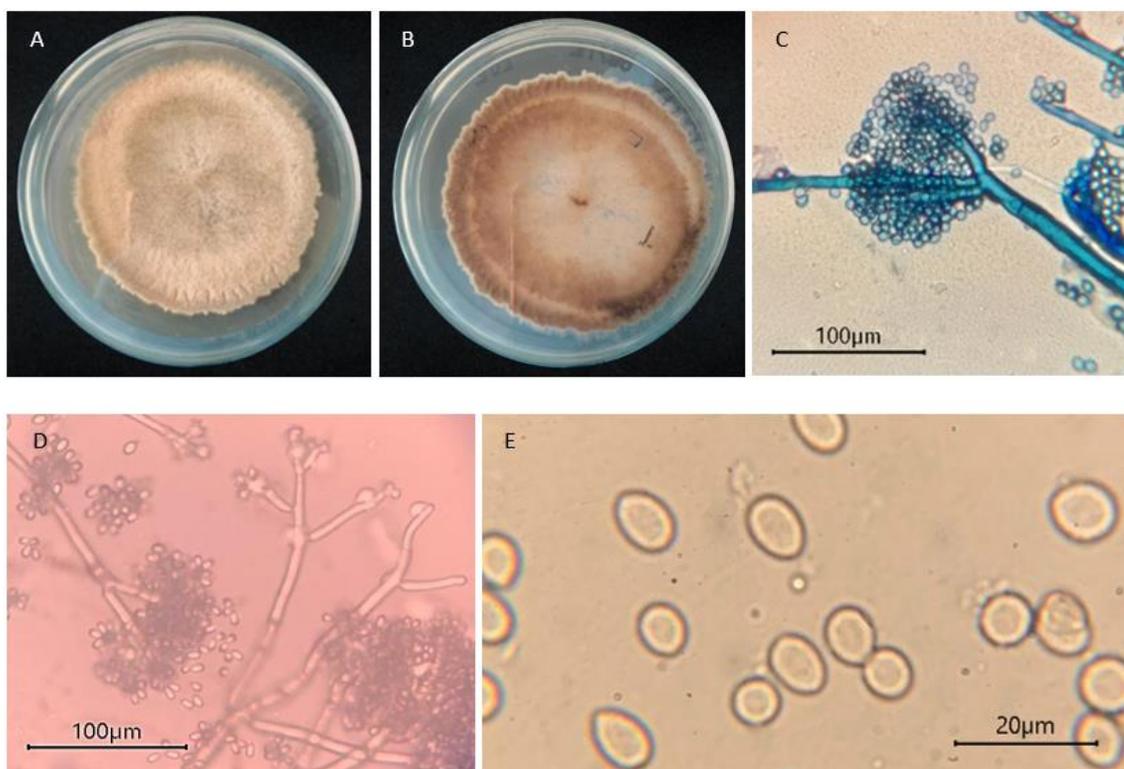
Reverso de coloración marrón. C. Formación de esclerocios a los 30 días de cultivo. D.

Micrografía de conidióforos y conidios, tinción con azul de metileno, lente 40X, escala 100 μm .

E. Micrografía de conidióforos y conidios, sin tinción, lente 40X, escala 100 μm . F. Micrografía de conidios, sin tinción, lente 100X, escala 20 μm .

Aislado L3M3

El crecimiento mostró una coloración blanca durante los días iniciales de desarrollo, luego con la producción de esporas a partir del día 9, se tornó de color marrón grisáceo claro. El reverso de la caja Petri mantuvo una coloración marrón que se hace más oscuro hacia los bordes. Se observó desarrollo de micelio aéreo floco en gran densidad. Este aislado no desarrolló esclerocios durante el tiempo de evaluación. Al microscopio el hongo presenta crecimiento filamentoso con hifas septadas color marrón hialinas, conidióforos ramificados y septados con conidios de forma ovoidea, unicelulares de paredes lisas en los extremos terminales.

Figura 5*Características morfológicas del aislado L3M3*

Nota. Aislado L3M3 de 13 días identificado morfológicamente como *Botrytis* sp. en medio PDA cultivado a 30 °C. A. Anverso, crecimiento de micelio aéreo y conidios, que le da coloración marrón grisáceo claro. B. Reverso de coloración marrón. C. Micrografía de conidióforos y conidios, tinción con azul de metileno, lente 40X, escala 100 µm. D. Micrografía de conidióforos y conidios, sin tinción, lente 40X, escala 100 µm. E. Micrografía de conidios, sin tinción, lente 100X, escala 20 µm.

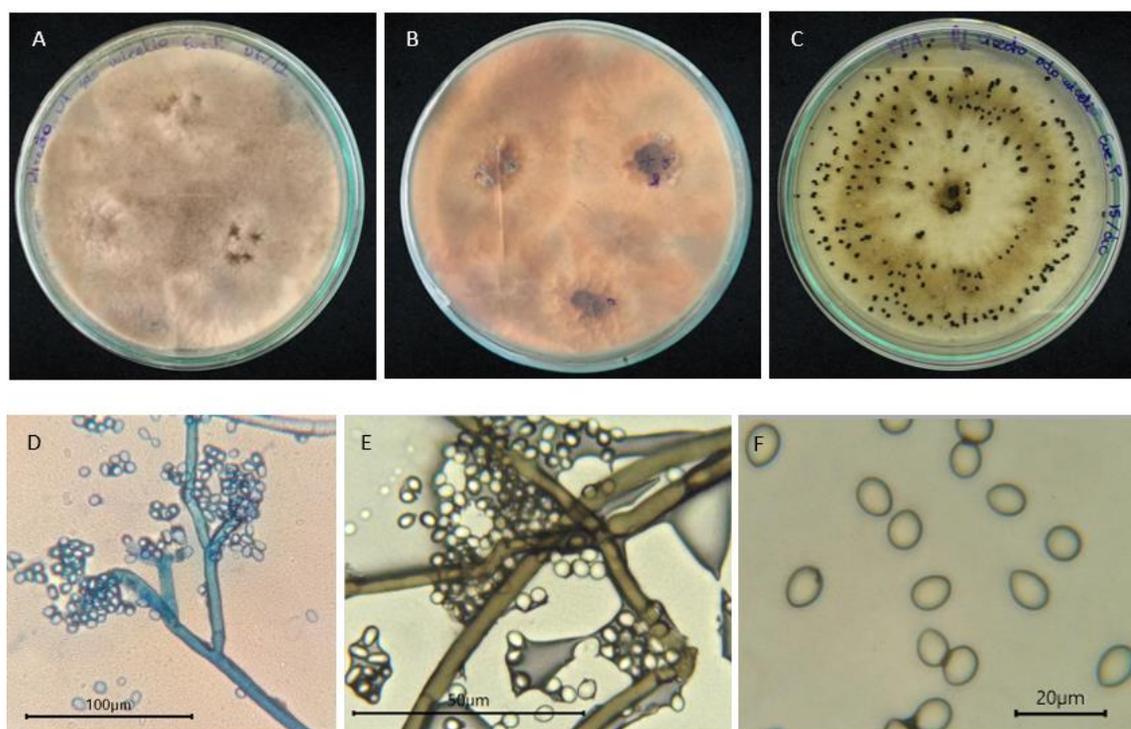
Aislado L3M7

Este aislado se desarrolló presentando crecimiento masivo extenso, los primeros días con una coloración blanca que rápidamente se tornó de un color gris oscuro a partir del sexto día. El reverso de la caja Petri mantuvo una coloración marrón oscura en el centro y más clara

hacia el exterior. Se observó desarrollo de micelio aéreo floccoso denso. En uno de los subcultivos el hongo desarrolló esclerocios distribuidos por todo el medio de cultivo de forma parcialmente concéntrica, los esclerocios eran irregulares y de color negro, en ese caso el micelio creció de forma superficial y mantuvo una coloración blanca con zonas marrón. El hongo, observado al microscopio presenta crecimiento filamentoso con abundantes hifas hialinas septadas, conidióforos ramificados y septados, al extremo final de las ramificaciones de los conidióforos se observan los conidios unicelulares de forma ovoidea, hialinos y de paredes lisas.

Figura 6

Características morfológicas del aislado L3M7



Nota. Aislado L3M7 de 13 días identificado morfológicamente como *Botrytis* sp. en medio PDA cultivado a 30 °C. A. Anverso, crecimiento abundante de micelio y conidios, que le da coloración

grisácea oscura. B. Reverso de coloración marrón intenso. C. Formación de esclerocios a los 20 días de cultivo. D. Micrografía de conidióforos y conidios, tinción con azul de metileno, lente 40X, escala 100 μm . E. Micrografía de conidióforos y conidios, sin tinción, lente 100X, escala 100 μm . F. Micrografía de conidios, sin tinción, lente 100X, escala 20 μm .

Medición de estructuras

Se realizaron mediciones de los conidios y esclerocios formados por los aislados L1M5, L3M3 y L3M7. En el caso de los conidios la medición se hizo con un aumento al microscopio de 100X, considerando su forma ovoide se tomaron medidas de ancho y largo, determinando para los conidios del aislado L1M5 un rango de 6,89 - 8,83 x 10,80 - 13,02 μm de ancho y largo, respectivamente (promedio 7,72 x 11,64 μm). Por otra parte, en el aislado L3M3 el rango se encuentra entre 5,85 - 8,46 x 7,49 - 9,94 μm de ancho y largo, respectivamente (promedio 6,46 x 9,09 μm). Finalmente, las longitudes registradas en el aislado L3M7 se encuentran en un rango entre 6,47 - 7,52 x 8,38 - 10,30 μm de ancho y largo, respectivamente (promedio 7,01 x 9,28 μm).

En cuanto a los esclerocios, únicamente se tomaron medidas de los aislados L1M5 y L3M7, ya que, L3M3 no formó esclerocios durante el periodo de evaluación. Ya que los esclerocios formados son de forma irregular se aproximaron medidas de ancho y largo de cada uno, en el caso de L1M5 los esclerocios estaban rodeados de abundante micelio por lo que las medidas pueden tener margen de error, las dimensiones presentan un rango entre 0,60 - 0,98 x 0,83 - 1,58 mm (promedio 0,80 x 1,22 mm), mientras que, los de L3M7 fueron un poco más grandes, 0,86 - 1,36 x 0,66 - 1,97 mm (promedio 1,16 x 1,38 mm).

Tabla 4*Promedio y rango de tamaños de conidios de L1M5, L3M3 y L3M7*

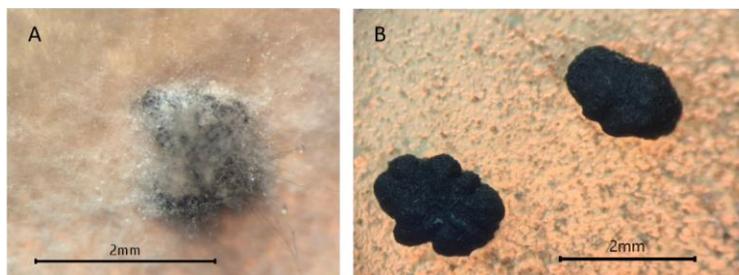
| Aislado | Medida | Rango | Promedio | Desviación estándar |
|----------------|-------------------------|---------------|-----------------|----------------------------|
| L1M5 | Ancho (μm) | 6,89 - 8,83 | 7,72 | 0,63 |
| | Largo (μm) | 10,80 - 13,02 | 11,64 | 0,72 |
| L3M3 | Ancho (μm) | 5,57 - 8,46 | 6,46 | 0,81 |
| | Largo (μm) | 7,49 - 10,29 | 9,10 | 0,94 |
| L3M7 | Ancho (μm) | 6,47 - 7,52 | 7,01 | 0,29 |
| | Largo (μm) | 8,38 - 10,30 | 9,28 | 0,68 |

Tabla 5*Promedio y rango de tamaños de esclerocios de L1M5, L3M3 y L3M7*

| Aislado | Medida | Rango | Promedio | Desviación estándar |
|----------------|---------------|--------------|-----------------|----------------------------|
| L1M5 | Ancho (mm) | 0,60 - 0,98 | 0,80 | 0,15 |
| | Largo (mm) | 0,83 - 1,58 | 1,22 | 0,24 |
| L3M7 | Ancho (mm) | 0,86 - 1,36 | 1,16 | 0,18 |
| | Largo (mm) | 0,66 - 1,97 | 1,38 | 0,49 |

Figura 7

Esclerocios de los aislados L1M5 y L3M7



Nota. Imágenes obtenidas con estereoscopio de esclerocios de L1M5 y L3M7 a los 30 días en PDA a 20°C. A. Esclerocios de L1M5, escala 2 mm. B. Esclerocios de L3M7, escala 2 mm.

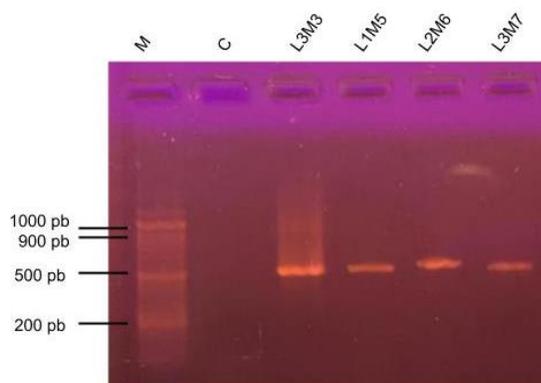
Identificación molecular***Extracción de ADN y amplificación por PCR***

En la extracción de ADN se obtuvieron buenas concentraciones que oscilaron entre 132,6 y 417,3 ng/μL, con el radio 260/280 con un rango de 1,5 - 2,03. En este análisis se incluyó el aislado L2M6 que no esporuló, pero presentaba micelio color gris, con el fin de determinar su identidad, al igual que L1M5, L3M3 y L3M7. En todos los aislados se usó marcador primario ITS, mientras que, para un análisis más específico, uno de los aislados, L3M7 se amplificaron las secuencias parciales de los genes G3PDH y HSP60. La calidad de los productos de PCR se determinó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

En el caso de los amplicones ITS de los aislados L1M5, L3M3, L3M7 se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 500 pb, mientras que para el aislado L2M6, el amplicón ITS tiene entre aproximadamente unos 550 pb. En el caso de la amplificación de los genes G3PDH y HSP60, se realizó únicamente para el aislado L3M7 y se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 900 pb en ambos casos.

Figura 8

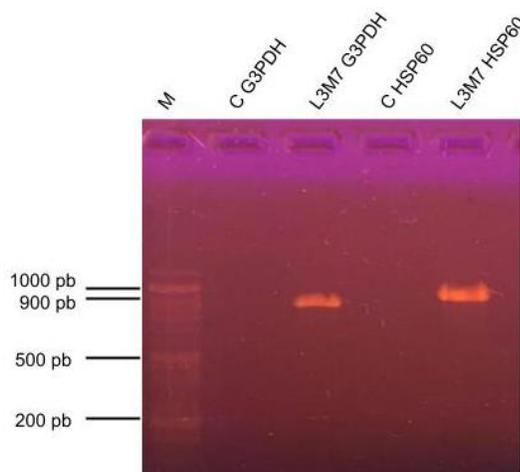
Electroforesis de productos de PCR con el marcador ITS



Nota. Electroforesis en gel de agarosa 1% para ITS. Carriles: 1. Marcador de peso molecular. 2. Control negativo. 3. Aislado L3M3. 4. Aislado L1M5. 5. Aislado L2M6. 6. Aislado L3M7.

Figura 9

Electroforesis de productos de PCR con los marcadores G3PDH y HSP60



Nota. Electroforesis en gel de agarosa 1% para G3PDH Y HSP60. Carriles 1. Marcador de peso molecular. 2. Control negativo G3PDH. 3. Aislado L3M7 G3PDH. 4. Control HSP60. 5. Aislado L3M7 HSP60.

Secuenciación y análisis de secuencias

El análisis de secuencias ITS confirmó que los aislados L1M5, L3M3 y L3M7 (440, 490 y 487 pb, respectivamente) corresponden al género *Botrytis*, específicamente a *Botrytis cinerea*, con el 100% de cobertura y 100% de identidad con secuencias de aislados en la base de datos general del NCBI (Tabla 6).

Sin embargo, al comparar las secuencias ITS con la base de datos de material tipo del NCBI los resultados muestran, en el caso del aislado L1M5, a *Botrytis californica* como primer resultado, con un 100% de cobertura y 99,77% de identidad. Por otra parte, la secuencia ITS del aislado L3M3 tiene 100% de cobertura y 99,59% de identidad con la secuencia de *Botryotinia ranunculi* (*Botrytis ranunculi*). Finalmente, L3M7 presenta 100% de cobertura y 99,80% de identidad con la secuencia correspondiente a *Botrytis caroliniana* (Tabla 6). Por su parte, la secuencia ITS del aislado L2M6 permitió determinar que pertenece al género *Alternaria*.

En el caso específico de L3M7, se secuenciaron los genes G3PDH y HSP60, se obtuvieron amplicones de 888 y 997 pb, respectivamente. Al comparar con la base de datos general del NCBI, los dos genes mostraron el 100% de cobertura y 100% de identidad con secuencias de aislados de *Botrytis cinerea*. Sin embargo, al comparar las secuencias de G3PDH y HSP60 con secuencias de material tipo, muestran a *Botryotinia pelargonii* (*Botrytis pelargonii*) como primer resultado, con un porcentaje de cobertura del 99 y 97% e identidad del 100 y 99,69%, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 6

Resultados de la búsqueda de homólogos con ITS por BLAST en el NCBI

| Aislado | Toda la base de datos | | | Material tipo | | | | |
|-------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|
| | Especie | Porcentaje de cobertura | Porcentaje de identidad | Accesión | Especie | Porcentaje de cobertura | Porcentaje de identidad | Accesión |
| L1M5 | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MT573470.1 | <i>B. californica</i> | 100 | 99,77 | NR_151843.1 |
| | <i>Botrytis</i> sp. | 100 | 100 | MK934589.1 | <i>B. caroliniana</i> | 100 | 99,77 | NR_111839.1 |
| | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MT495453.1 | <i>B. pelargonii</i> | 98 | 100 | NR_159600.1 |
| L3M3 | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MT573470.1 | <i>B. ranunculi</i> * | 100 | 99,59 | NR_164278.1 |
| | <i>Botrytis</i> sp. | 100 | 100 | MK934589.1 | <i>B. ranunculi</i> * | 100 | 99,59 | MH858258.1 |
| | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MH860108.1 | <i>B. californica</i> | 100 | 99,59 | NR_151843.1 |
| L3M7 | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MN448502.1 | <i>B. caroliniana</i> | 100 | 99,80 | NR_111839.1 |
| | <i>Botrytis</i> sp. | 100 | 100 | MK934589.1 | <i>B. ranunculi</i> * | 100 | 99,59 | NR_164278.1 |
| | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MK934584.1 | <i>B. californica</i> | 100 | 99,59 | NR_151843.1 |

Nota. **Botryotinia ranunculi*

Tabla 7

Resultados de la búsqueda de homólogos con G3PDH y HSP60 por BLAST en el NCBI

| Aislado | Toda la base de datos | | | Material tipo | | | | |
|-------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|
| | Especie | Porcentaje de cobertura | Porcentaje de identidad | Accesión | Especie | Porcentaje de cobertura | Porcentaje de identidad | Accesión |
| L3M7 | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MH796662.1 | <i>B. pelargonii</i> * | 99 | 100 | AJ704990.1 |
| | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MG264521.1 | <i>B. macadamiae</i> | 97 | 100 | MZ344226.1 |
| | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MG204876.1 | <i>B. fabae</i> | 99 | 99,21 | AJ705014.1 |
| L3M7 | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MN159921.1 | <i>B. pelargonii</i> | 97 | 99,69 | AJ716046.1 |
| | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MH796663.1 | <i>B. fabae</i> | 97 | 99,28 | AJ716075.1 |
| | <i>B. cinerea</i> | 100 | 100 | MH732867.1 | <i>B. macadamiae</i> | 93 | 99,68 | MZ344237.1 |

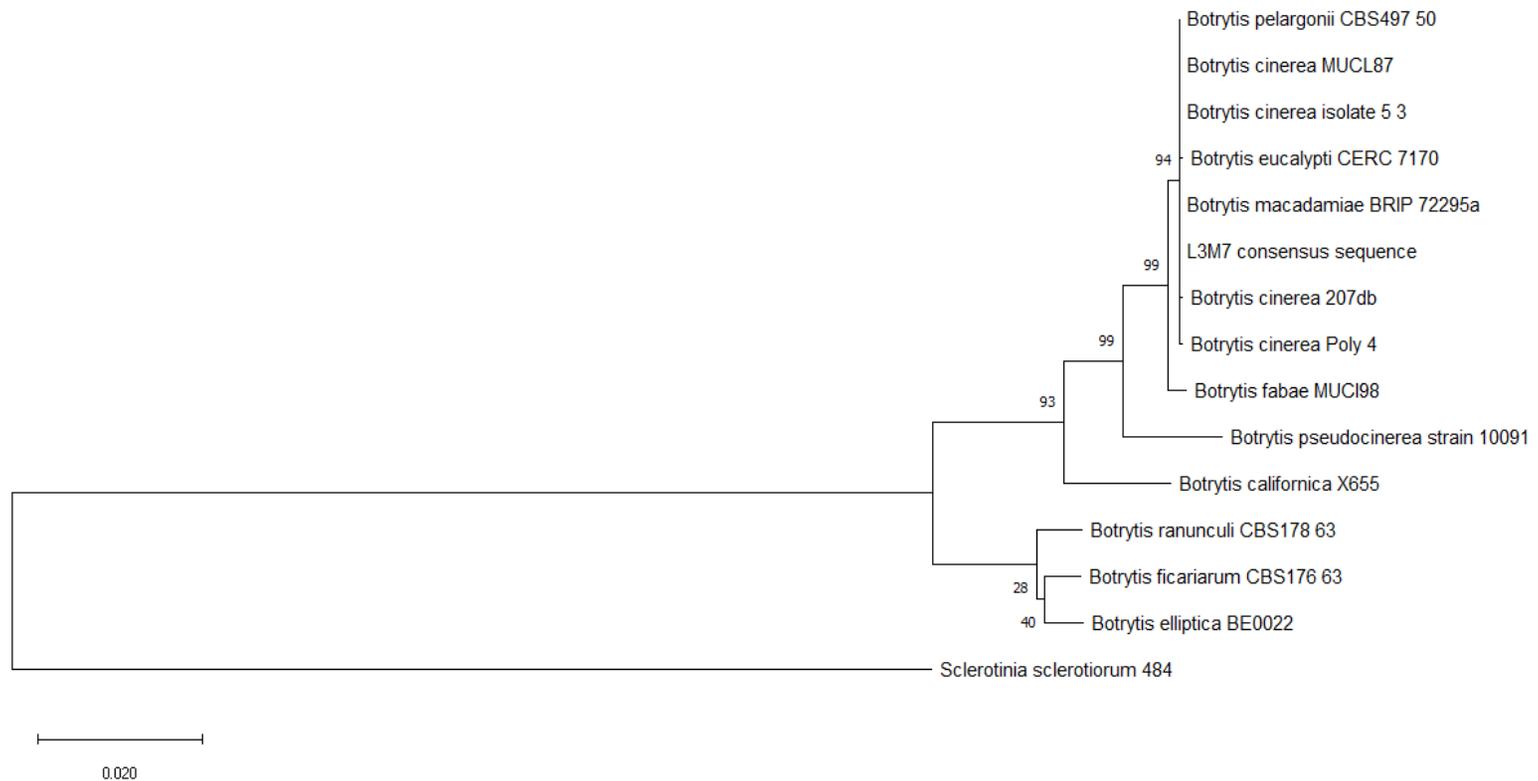
Nota. **Botryotinia pelargonii*

Análisis filogenético

En base a los resultados anteriores, se construyó un árbol filogenético de máxima verosimilitud con las cepas pertenecientes a algunas especies del género *Botrytis* y el aislado L3M7, la posición filogenética de cada una se determinó con los genes concatenados G3PDH y HSP60 (1862 pb) y el modelo de sustitución GTR. En el árbol filogenético se pueden diferenciar 2 clados principales. El aislado L3M7 se agrupa en un solo clado junto con las otras cepas de *B. cinerea*, lo que indica que el aislado está genéticamente relacionado a ellas, con un valor de soporte del nodo de 94. Por lo tanto, se asume que L3M7 pertenece a *B. cinerea*, ya que, morfológicamente también comparten características comunes. Así también, se encuentra muy cerca de *B. macadamiae* (Prasannath et al., 2021), *B. eucalypti* (Liu et al., 2016) y *B. pelargonii* (Staats et al., 2005), filogenéticamente cercanas entre sí. Los valores de soporte se representan en los nodos del árbol. El cladograma se muestra en el Anexo 1.

Figura 10

Árbol de máxima verosimilitud de *Botrytis* sp.



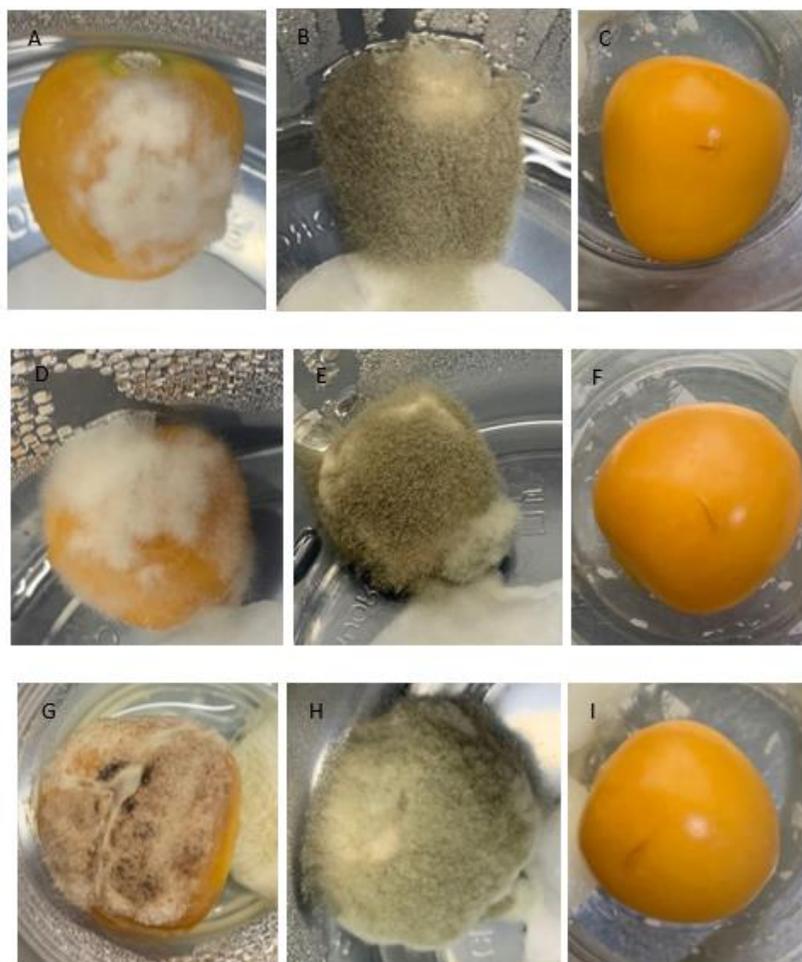
Nota. Alineación concatenada de múltiples locus G3PDH + HSP60 (1862 pb). *Sclerotinia sclerotiorum* 484 se utilizó como outgroup. Modelo de sustitución GTR. Los números en los nodos indican el valor de soporte (Bootstrap) de 1000 repeticiones.

Postulados de Koch

Los resultados se evaluaron hasta 10 días posteriores a la inoculación con las soluciones de conidios. En los primeros 5 días se observó el crecimiento de micelio de color blanco sobre la zona de infección, y en el fruto de experimentación se observaban signos de pudrición y ablandamiento del tejido hasta necrosis. En los días posteriores, se hizo evidente el desarrollo de abundante micelio de color gris, junto con la presencia de conidios en toda la extensión del fruto, cubriéndolo por completo. La evolución de la infección fue mucho más rápida en el tratamiento con herida, mientras que, en los frutos tratados por inmersión en la solución de conidios, los síntomas demoraron aproximadamente 4 días más en presentarse, y no todos los frutos presentaron síntomas, lo que demuestra que las heridas o rajado del fruto, lo hace más propenso a este tipo de infecciones fúngicas. Por otra parte, en el control, tratado con agua estéril, no se observó ningún cambio en la apariencia o textura del fruto, en ninguno de los casos. El hongo patógeno se aisló nuevamente de los frutos infectados con síntomas visibles y se confirmó su identidad morfológicamente, así se completaron los postulados de Koch.

Figura 11

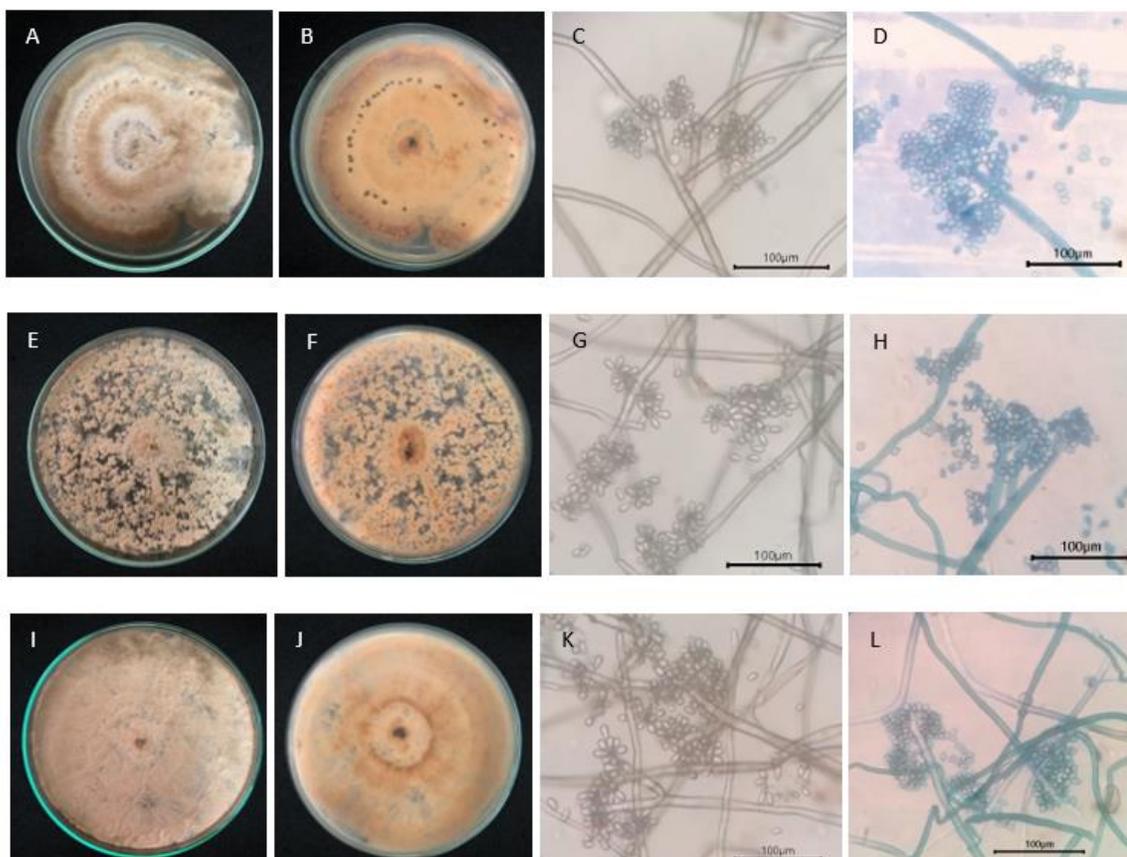
Postulados de Koch en frutos de P. peruviana, reconocimiento de síntomas en individuos sanos



Nota. A-B. Inóculo solución de conidios del aislado L1M5. D-E. Inóculo solución de conidios del aislado L3M3. G-H. Inóculo solución de conidios del aislado L3M7. C, F e I. Experimento control de L1M5, L3M3 y L3M7, respectivamente.

Figura 12

Postulados de Koch en frutos de P. peruviana, aislamiento del patógeno e identificación



Nota. A-D. Aislado del fruto con inóculo de L1M5. E-H. Aislado del fruto con inóculo de L3M3. I-L. Aislado del fruto con inóculo de L3M7. A-B, E-F, I-J. Anverso y reverso de caja Petri con crecimiento micelial y conidios de cada aislado, respectivamente. C-D, G-H, K-L. Micrografías de conidióforos y conidios, lente 40X, escala 100 μm, sin tinción y tinción con azul de metileno, respectivamente.

Capítulo V: Discusión

Se ha confirmado que el patógeno que causa el moho gris en cultivos de uvilla en Ecuador es *Botrytis cinerea*. Si bien varios reportes apuntan a *B. cinerea* como el agente causal del moho gris en uvilla (Fischer & Miranda, 2012; CYTED, 2014), no se habían reportado las características fenotípicas y genotípicas del hongo en cultivos del Ecuador. Estos últimos años se ha puesto especial atención al cultivo de la uvilla, y por supuesto a los patógenos que pueden enfermar a las plantas y afectar la producción, que ahora ha tomado importancia porque se ha incluido en el plan de exportaciones del país (PRO ECUADOR, 2020).

La identificación de síntomas en las plantas de uvilla de las localidades de Tungurahua se basó en los reportes descritos para la enfermedad del moho gris (Fischer & Miranda, 2012; CYTED, 2014). Se identificaron tizones sobre el cáliz, podredumbre en los frutos, y formación de micelio blanco y de color gris con esporas en la superficie del tejido infectado. La sintomatología coincide con la observada en otros cultivos que se ven afectados por hongos del género *Botrytis*, que presentan en todos los casos sintomatología similar, lo que incluye pudrición blanda de todas las partes aéreas de la planta en hojas, frutas y flores y por lo general, también afecta después de la cosecha, como una infección latente, para producir conidióforos grises y conidios típicos de la enfermedad (Williamson et al., 2007).

Si bien en este estudio solo se muestrearon localidades de la provincia de Tungurahua, sería importante replicar el estudio en más provincias del país, principalmente en las que se centra la producción a gran escala para la exportación de los frutos, sin dejar de lado muestreos poscosecha, por el riesgo de contaminación de los frutos con conidios o esclerocios. De hecho, se ha demostrado que, en poscosecha, en la etapa de secado se pueden presentar brotes de *Botrytis* (Novoa et al., 2006).

En algunas muestras tomadas en los cultivos, se confundieron los síntomas de crecimiento fúngico con *Alternaria*, al presentarse también como tizones de color gris oscuro en el tejido vegetal (Herrera, 2016; Kwon et al., 2021). De hecho, en la localidad 2 en el cantón Cevallos, todos los aislados correspondían morfológicamente con *Alternaria*, identificada por las características de las esporas vistas al microscopio. Uno de los aislados L2M6 que no había esporulado, pero formó micelio de color gris se envió a secuenciar con el objetivo de determinar su identidad. El BLAST de la secuencia del aislado L2M6 determinó que forma parte del género *Alternaria*, su presencia en cultivos de uvilla ya se ha reportado y caracterizado en el país, incluyendo cultivos de la provincia de Tungurahua (Bosquez, 2018).

La presencia de *Alternaria* sp. junto con *Botrytis* sp. en las localidades de muestreo L1 en cantón Ambato y L3 en el cantón Píllaro, indica que los hongos patógenos están infectando de forma simultánea las plantas en los cultivos de uvillas, lo que puede acelerar el deterioro de la fruta y constituye un riesgo para la producción. De hecho, se ha confirmado que *Alternaria* por sí sola puede ser patógena y causar secamiento descendente de cáliz de uvilla (Bosquez, 2018).

Los aislados L1M5, L3M3 y L3M7 identificados como *Botrytis*, en PDA crecieron de forma similar, durante los primeros días presentó micelio blanco que al empezar la esporulación toma color gris claro a oscuro o marrón con el aumento de la producción de conidios. Este desarrollo es típico de las colonias de las especies del género *Botrytis*, y se ha reportado en la mayoría de especies entre las que se puede mencionar *B. caroliniana* en mora (Li et al., 2012), *B. eucalypti* en plántulas de eucaliptos (Liu et al., 2016), *B. polygoni* en Polygonaceae (He et al., 2021), *B. cinerea* en flora endémica de Chile (Notte et al., 2021), entre otras. Algunas réplicas de los aislados sembradas en PDA usando un disco de agar como inóculo, no volvieron desarrollar conidios, sino que solo crecieron formando un micelio blanco brillante en toda la extensión de la caja Petri. Un caso similar se reportó en la especie recientemente identificada como *B. polygoni*,

mencionando que se debe a un proceso de degeneración de las colonias sin esporulación, pero sí mantuvo la patogenicidad para infectar al huésped (He et al., 2021).

Las estructuras fúngicas de los de los aislados L1M5, L3M3 y L3M7 al microscopio presentan coloración hialina marrón claro. Se puso especial énfasis en las medidas de los conidios con el fin de comparar este parámetro con otras especies. Los conidios en general presentan forma ovoide y se tomaron medidas de ancho y largo, el análisis se centró en el aislado de referencia L3M7 que se confirmó como *B. cinerea* en el análisis molecular. Las medidas de los conidios del aislado L3M7 son 6,47 - 7,52 x 8,38 - 10,30 μm (promedio 7,01 x 9,28 μm), son muy similares en dimensiones en comparación con la cepa de *B. cinerea* que infecta a uvilla, descrita en el primer reporte en Turquía, que registró medidas entre 5,5 a 9,4 x 7,0 a 13,0 μm (Erper et al., 2015). Los conidios de *B. pelargonii* presentan un rango de medidas de 8,2 a 17,3 μm de largo y de 5,8 a 12,2 μm de ancho, siendo un poco más largos que los de *B. cinerea*, y en este caso también de L3M7 (Lu et al., 2019).

En comparación con otras especies, las dimensiones son semejantes a las reportadas en *B. caroliniana* 7,5 – 15,5 x 6,0 – 12,0 μm con forma variable elipsoide u ovoide (Li et al., 2012) y también se aproxima a *B. californica* que desarrolla conidios elípticos y ovoides de 6,0–14,0 x 4,5–10,0 μm (Saito et al., 2016); mientras que, los conidios de L3M7 son mucho más pequeñas que las dimensiones de conidios que se registra en el caso de *B. fabiopsis* y *B. galantina*, 15,7–24,1 x 10,8–19,2 μm ; 15,0–23,4 x 10,1–17,8 μm , respectivamente (Zhang et al., 2010).

En cuanto a los esclerocios, se consideró también el aislado L3M7, en el caso de L1M5 los esclerocios estaban rodeados de micelio, pero presentaban la misma morfología que los desarrollados en L3M7. Los esclerocios de L3M7 fueron de color negro e irregulares y las medidas a los 30 días fueron de 0,86 - 1,36 x 0,66 - 1,97 mm (promedio 1,16 x 1,38 mm), y se

encuentran dentro del rango de 1 - 4 mm descrito en *B. cinerea* por Erper y colaboradores (2015). En el caso de *B. californica*, como describe Saito y colaboradores (2016), la medida está en el rango de 0,5–2,5 x 0,5–5,0 mm, siendo de mayor tamaño, sin embargo, no superan los 5 mm, y de forma similar en *B. caroliniana* con una medida de 0,5–4,0 x 0,5–10,5 mm (Li et al., 2012). Se debe considerar que *Botrytis* sp. puede presentar ciertas características específicas según el huésped del que se aísla y también su desarrollo puede variar según las condiciones del medio y la locación, es por eso, que las características morfológicas no siempre son suficientes para diferenciar una especie de otra. Por ejemplo, la mayoría de cultivos se desarrollaron a 20 - 23 °C, sin embargo, L3M7 permaneció a 30 °C durante la etapa inicial de su crecimiento.

Morfológicamente las diferencias entre especies de *Botrytis* son casi imperceptibles (Williamson et al., 2007; Gümürkcü et al., 2016), sin embargo, a nivel genético las poblaciones son heterogéneas, como se menciona en la primera clasificación molecular integral de *Botrytis* por Staats y colaboradores (2005). Se han diferenciado varias especies según la capacidad que tienen de infectar a un huésped en específico, lo que conlleva modificaciones a nivel genético (Staats et al., 2005; Plesken et al., 2021). En este caso, como parte del análisis molecular se realizó la secuenciación de amplicones de los genes ITS, G3PDH y HSP60 y análisis filogenético. El reporte de Turquía concluye que es *B. cinerea* el patógeno que ocasiona la enfermedad del moho gris en uvilla, por medio del análisis de la secuencia de 700 pb obtenida con los primers C729+/ C729- (Erper et al., 2015), sin embargo, no se estableció una relación filogenética con otras especies del género. Los primers C729+/ C729- son específicos para *B. cinerea* y puede usarse para la detección de esta especie (Khazaeli et al., 2010).

Los genes de ARNr son una característica universal que permite evaluar relaciones filogenéticas, y en específico las regiones ITS se han utilizado ampliamente para la determinación del género e incluso de especies de organismos eucariotas (Raja et al., 2017). En

el caso del ITS, amplicones de menos de 500 pb pueden no presentar variabilidad suficiente para identificar la especie, sin embargo, son útiles aun para determinar el género (Tekpinar & Kalmer, 2019). En este caso se obtuvo amplicones ITS entre 440-497 pb, lo que permitió categorizarlos dentro del género *Botrytis*, mostrando resultados con el 100% de identidad y cobertura para *Botrytis cinerea*. Se recomienda analizar las secuencias también con bases de datos de material tipo (secuencias autenticadas) en el NCBI, debido a que se ha evidenciado que en el GenBank hay secuencias que pueden tener nombres erróneos (Raja et al., 2017). En el caso de L3M7, en la base de datos general se identifica como *B. cinerea*, mientras que, en la comparación con las secuencias de material tipo, se obtuvo como resultado porcentajes de identidad mayores al 99,59% y 100% de cobertura con secuencias de *B. caroliniana*, *B. ranunculi* y *B. californica*. Posiblemente las secuencias autenticadas de *B. cinerea* no están catalogadas en la base de datos de material tipo en el NCBI, para el análisis con BLAST. Por ese motivo, para el análisis filogenético posterior se incluyeron secuencias de cepas de *B. cinerea* de material tipo catalogadas en el BioProject (proyecto encargado de la generación y el análisis a gran escala de códigos de barras de ADN de hongos filamentosos) (Vu et al., 2019), para establecer mejor la relación filogenética entre especies.

Uno de los resultado de homología de L1M5 y L3M7 se registró con *B. caroliniana*, una especie nueva registrada en 2012 en frutos de mora en Carolina del Sur, Estados Unidos, en donde se afirma que es genética y morfológicamente diferente a *B. cinerea* (Li et al., 2012), sin embargo, en los números de accesoión del GenBank mencionados en el artículo científico, se registra como *Botrytis* sp. una especie no clasificada, por lo tanto, se excluyeron estas secuencias del análisis filogenético. Por otra parte, los aislados L3M3 y L3M7 presentan homología con *B. ranunculi* que se categorizó como secuencia de referencia para identificación de hongos en el estudio como parte de la colección de hongos filamentosos en el Instituto de

Biodiversidad Fúngica de Westerdijk (antes Centro de Biodiversidad Fúngica, CBS), Utrecht, Países Bajos. También, se encontraron similitudes genéticas de *B. californica* con L1M5, L3M3 y L3M7, es una especie nueva de California descrita en 2016, que presenta características morfológicas que la diferencian, como conidióforos mucho más largos que los de *B. sinoviticola*, *B. cinerea* y *B. pseudocinerea*, todas pertenecientes al mismo clado filogenético. Tanto *B. ranunculi* como *B. californica* se incluyeron en el análisis filogenético de este estudio.

Una vez determinado el género del hongo, se realizó el análisis con las secuencias parciales de los genes codificantes de las proteínas G3PHD y HSP60 para el aislado L3M7, ya que se ha demostrado que estos marcadores facilitan una identificación más concluyente a nivel de especie (Plesken et al., 2021). Es así que al comparar ambas secuencias en la base de datos de material tipo, se obtuvo en ambos casos identidad con *B. pelargonii*, por lo que también se incluye en el análisis filogenético. Si bien en este caso únicamente se utilizó G3PHD y HSP60, de forma generalizada, se considera un análisis filogenético completo si incluye los marcadores G3PDH, HSP60 y RPB2, adoptado desde la primera clasificación molecular realizada por Staats y colaboradores (2005). Posteriormente, Staats y colaboradores (2007) adoptaron dos marcadores moleculares adicionales, nep 1 y 2 que dieron una mayor resolución al resultado de los filogramas no enraizados de 22 especies de *Botrytis*, además estos marcadores permitieron diferenciar entre las especies *B. fabiopsis* y *B. galanthina* (Staats et al., 2007; Zhang et al., 2010).

Las variaciones genéticas generan adaptaciones puntuales, por ejemplo, la producción de toxinas específicas para el huésped al que infecta como *B. fabae*, o el caso de *B. tulipae* que es capaz de neutralizar enzimas de defensa de la planta para infectarla (Staats et al., 2005). Por otra parte, especies de *Botrytis* pueden existir como endófitos, manteniendo su virulencia (Garfinkel et al., 2019) como el caso de *B. deweyae* que normalmente crece como endófito en azucenas ornamentales pero muestra un comportamiento patógeno facultativo, lo que implica

cambios fisiológicos (van Kan et al., 2014), o como saprófito por su capacidad de sobrevivir largos periodos de tiempo sobre restos vegetales, se puede mencionar el caso de *B. pyriformis* (Zhang et al., 2016). Por lo tanto, es importante caracterizar el hongo que se encuentra infectando a una planta huésped específica, en este caso a *P. peruviana*.

Los resultados del análisis filogenético comprueban que efectivamente el árbol filogenético construido con especies del género *Botrytis* se divide en dos clados principales como en Staats y colaboradores (2005). Las especies de *B. cinerea* junto con el aislado objeto de este estudio L3M7 se agrupan en un solo clado y parten de en un solo nodo con un valor de soporte de 94%, por lo que, se concluye que L3M7 pertenece esta especie, sustentado también en base a las características fenotípicas. El valor de soporte indica el nivel de confianza estadística de la posición de los nodos, y se considera que valores mayores a 90% indica un valor alto de confianza (Jill Harrison & Langdale, 2006).

B. pelargonii se encuentra dentro del mismo nodo que *B. cinerea* y L3M7, aparentemente sin ninguna diferencia en la distancia genética, lo que indica que no hay divergencia de secuencias y por lo tanto existe un parentesco entre ellas. De hecho, se afirma que genéticamente *B. pelargonii* es muy parecida a *B. cinerea*, catalogadas como especies diferentes por un polimorfismo único (Staats et al., 2005), sin embargo, molecularmente su separación puede considerarse dudosa como afirman Hyde y colaboradores (2014) e incluso, no se la ha considerado como una especie diferente en el estudio de Plesken y colaboradores (2021).

El polimorfismo único se identificó en las secuencias del gen RPB2 en los aislados de *B. pelargonii* en el estudio de Staats y colaboradores (2005) (Anexo 2), por lo que, sería necesario secuenciar ese gen para determinar la especie a la que pertenece el aislado. A pesar de que ello,

genéticamente puede considerarse que el polimorfismo no es fundamento suficiente para definirla como una nueva especie. Se argumenta también que *B. pelargonii* es posiblemente específica de huésped, exclusivamente de miembros de la familia *Geraniaceae* (Jarvis, 1977; Staats et al., 2005), no obstante, recientemente se la ha identificado como patógeno en raíces de ginseng (Lu et al., 2019).

Por otra parte *B. fabae* se separa claramente de *B. cinerea*, posiblemente por ser específica de huésped, mientras que, la distancia genética con *B. pseudocinerea*, se puede explicar al ser genéticamente distinto a los demás del grupo, ya que, por ejemplo, no posee elementos transponibles como los identificados en *B. cinerea* (Hyde et al., 2014). En caso de que se requiera establecer árboles filogenéticos más complejos, se recomienda aplicar el método bayesiano que tiene una fuerte conexión con la máxima verosimilitud (Jill Harrison & Langdale, 2006).

A lo largo del tiempo ha existido un debate en cuando a la clasificación de especies dentro del género *Botrytis*, ahora se han documentado más de 30 especies, que morfológicamente pueden ser indistinguibles, pero una pequeña variación genética puede ser suficiente para ser catalogada como una especie diferente, como el caso de *B. pelargonii* (Staats et al., 2005). En especies genéticamente muy cercanas, la diferencia puede evidenciarse en el rango de huéspedes que son capaces de infectar, y limitarse a ellos como *B. fabae* (Hyde et al., 2014). Por lo que, se llega a la conclusión de que, para lograr una clasificación adecuada de especies, se debe establecer un sistema integral que combine el análisis morfológico, fisiológico, biológico, molecular y evolutivo.

Los postulados de Koch demostraron que el hongo aislado e identificado como *B. cinerea* es el agente causal de la enfermedad del moho gris en la uvilla, al mostrar los mismos

síntomas que se identificaron inicialmente en los frutos en las localidades de muestreo, coincidiendo también en las características morfológicas descritas tanto macroscópica como microscópicamente. En el fruto infectado experimentalmente, el síntoma principal es el desarrollo de crecimiento fúngico con formación de abundantes conidios, lo que coincide con los postulados de Koch realizados por Erper y colaboradores (2015) en el reporte de Turquía, y con los síntomas descritos en reportes del Ecuador (CYTED, 2014). En las etapas iniciales de infección se identificó también pudrición blanda en el fruto con necrosis del fruto, también descrito en algunos casos de infección por *B. cinerea* (Williamson et al., 2007). En los tratamientos de frutos con herida, la infección avanza a un ritmo más acelerado, lo que confirma que, en los frutos rajados hay mucho mayor posibilidad de infección por la presencia de conidios en la herida, ya que, estas esporas asexuales son de fácil dispersión con el viento, siendo un riesgo potencial tanto durante el cultivo, como en la etapa de poscosecha (Novoa et al., 2006; CYTED, 2014). El correcto manejo de los cultivos debería evitar el rajado del fruto por un aumento excesivo del volumen durante la etapa de crecimiento, por lo que se recomienda, tener cuidado con el suministro irregular de agua, deficiencias de calcio o boro, o una fertilización abundante (Gongora & Rojas, 2006).

La sola presencia del hongo es un riesgo, que, si bien al momento puede no estar causando mayores daños, un cambio en las condiciones puede desencadenar en una pérdida catastrófica. Se han propuesto varios métodos de control físico, químico y biológico (Matute, 2019; Acosta et al., 2020), no obstante, por sus variados métodos de supervivencia como son la producción de micelio, conidios y esclerocios, no se asegura que los métodos de control por si solos funcionen (Raja et al., 2017). Una de las preocupaciones más grandes es debido al desarrollo de resistencia de las cepas de *Botrytis* a los fungicidas típicos utilizados para el control fitosanitario, a causa de la alta frecuencia de tratamientos por la alta incidencia del patógeno.

En cultivos de fresas en Alemania se identificó una cepa de *Botrytis* con un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos, dándole una mayor capacidad de eliminación de los dos botritocidas más importantes, ciprodinil y fludioxonil, por la presencia de una mutación de delección en un gen (Leroch et al., 2013). En el Ecuador, ciprodinil y fludioxonil también se utilizan como fungicidas para el control de *Botrytis*, principalmente en cultivos de rosas para exportación, siendo los más efectivos para el control (Amaya, 2020), al igual que en Colombia (Corredor et al., 2007). Por lo tanto, el conocer las características genéticas de cada una de las cepas en un cultivo en específico en campo, puede ayudar a determinar la presencia de esos indicadores genéticos de resistencia a fungicidas, para identificar la mejor alternativa para el control, evitando pérdidas de inversiones. Se sugiere también, que la resistencia puede ser por adaptación diferencial al huésped y el manejo que se da a los cultivos, aunque el intercambio genético entre cepas es reducido (Leroch et al., 2013), aun así, el riesgo está presente y se puede identificar por análisis genéticos diferenciales.

Capítulo VI: Conclusiones

En el presente proyecto de investigación se caracterizó a nivel morfológico y molecular el agente causal de la enfermedad de moho gris en plantas de uvilla (*P. peruviana*) en el Ecuador, confirmando que es parte de los hongos patógenos del género *Botrytis*, específicamente *Botrytis cinerea*.

Botrytis cinerea está presente en dos de las tres localidades muestreadas de la provincia de Tungurahua, en donde se observó la misma sintomatología de la enfermedad.

Las características morfológicas de los aislados L1M5, L3M3 y L3M7 indican que pertenecen al género *Botrytis*, lo que se confirmó con el análisis molecular de las secuencias de la región ITS.

El análisis molecular y estudio filogenético con los genes G3PDH y HSP60 concatenados determinó que el aislado L3M7 del cultivo de uvilla en el Ecuador es *B. cinerea*.

La aplicación de los postulados de Koch permitió confirmar que el agente causal de los síntomas y signos observados en uvilla en campo es *B. cinerea*.

En campo algunos síntomas de moho gris se pueden confundir con los causados por otros hongos como *Alternaria*, que también se presenta como tizones en el tejido vegetal. Este estudio ofrece un panorama general de las características morfológicas y genotípicas de *B. cinerea* que infecta a cultivos de uvilla en el país. La descripción científica del agente causal del moho gris en uvilla permitirá el desarrollo de estudios relacionados con la interacción planta patógeno y con estrategias de control y prevención de esta enfermedad que tiene especial relevancia por el impulso económico que tiene en la actualidad el cultivo de uvilla.

Capítulo VII: Recomendaciones

Botritis cinerea es un hongo fitopatógeno que afecta a muchas plantas a nivel mundial, considerado uno de los más relevantes, por lo que su estudio no debe descuidarse, mucho menos si su capacidad de infección se evidencia cada vez en más cultivos, como ahora en el caso de la uvilla. En el Ecuador, ahora que se promueve la producción de uvilla para exportación, es importante considerar el riesgo que supone este hongo en etapas de cultivo u poscosecha.

Morfológicamente varias de las especies de *Botrytis* son indistinguibles, por lo que siempre es recomendable complementar la identificación con análisis filogenéticos, que incluyan la mayor cantidad de marcadores genéticos posible, para identificar la variabilidad genética entre especies. Así también, procurar tanto variaciones morfológicas y genéticas sean lo suficientemente significativas para catalogar a una nueva especie.

Los postulados de Koch son una metodología tradicional que permite identificar un agente patógeno y determinar su relación con el huésped, ahora con las técnicas moleculares conocidas, se recomienda complementar la etapa final de identificación del patógeno aislado de los frutos de experimentación, por secuenciación de los mismos marcadores moleculares ya descritos.

Se debe considerar el riesgo potencial que existe en cuanto al desarrollo de resistencia a los fungicidas utilizados con regularidad para el control de *Botrytis*, rasgo que ya se ha identificado en ciertas cepas, por reconocimiento de regiones genéticas que les permite eliminar las sustancias tóxicas de su sistema. El conocimiento genético del organismo, desde un punto de vista estratégico, puede permitir el desarrollo de métodos de control de la infección novedosos, que pueden sustituir los métodos químicos.

Referencias bibliográficas

- Acosta, M., Viera, W. F., Jackson, T., Vásquez, W., Acosta-Ruales, M., Viera, W. F., Jackson, T., & Vásquez-Castillo, W. (2020). Alternativas tecnológicas para el control de *Botrytis* sp. En mora de castilla (*Rubus glaucus*). *Enfoque UTE*, 11(2), 11-20.
<https://doi.org/10.29019/enfoque.v11n2.521>
- Alsohaili, S. A., & Bani-Hasan, B. M. (2018). Morphological and Molecular Identification of Fungi Isolated from Different Environmental Sources in the Northern Eastern Desert of Jordan. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 11(3), 9.
- Altamirano, M. (2010). *Estudio de la cadena productiva de uvilla (Physalis peruviana L.) en la Sierra Norte del Ecuador* [Proyecto de Grado, Universidad San Francisco de Quito].
<https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/950/1/95220.pdf>
- Amaya, E. (2020). *Control de Botrytis (Botrytis cinerea), con fungicidas en poscosecha de rosas, en la empresa Royal Flowers-Mulaló* [Estudio comparativo previo a la obtención del título de Magíster en Sanidad Vegetal., Universidad Técnica de Cotopaxi].
<http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/7620/1/MUTC-000921.pdf>
- Arellano, M. (2018). *Detección de Fusarium oxysporum en cultivos de uvilla (Physalis peruviana L.) en la Sierra norte y centro del Ecuador* [Disertación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador].
<http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14683/Detecci%C3%B3n%20de%20Fusarium%20oxysporum%20en%20cultivos%20de%20uvilla%20%28Physalis%20peruviana%20L.%29%20en%20la%20Sierra%20norte%20.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Banco Central del Ecuador. (2021). *Cuentas Nacionales Trimestrales de Ecuador Resultados de las Variables Macroeconómicas, 2021*. Banco Central del Ecuador.
<https://www.bce.fin.ec/index.php/boletines-de-prensa-archivo/item/1434-en-el->

primer-trimestre-de-2021-la-economia-ecuatoriana-crecio-0-7-respecto-al-trimestre-anterior-y-reporto-una-variacion-interanual-de-5-6-respecto-al-primer-trimestre-de-2020

Beever, R. E., & Weeds, P. L. (2007). Taxonomy and Genetic Variation of *Botrytis* and *Botryotinia*.

En Y. Elad, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (pp. 29-52). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_3

Berrendero, E., Perona, P., & Mateo, E. (2008). Genetic and morphological characterization of

Rivularia and Calothrix (Nostocales, Cyanobacteria) from running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 447-460.

<https://doi.org/10.1099/ijs.0.65273-0>

Bhunjun, C. S., Phillips, A. J. L., Jayawardena, R. S., Promputtha, I., & Hyde, K. D. (2021).

Importance of Molecular Data to Identify Fungal Plant Pathogens and Guidelines for Pathogenicity Testing Based on Koch's Postulates. *Pathogens*, 10(9), 1096.

<https://doi.org/10.3390/pathogens10091096>

Bosquez, C. (2018). *Caracterización morfológica y molecular de Alternaria alternata hongo*

fitopatogeno causante del secamiento descendente del cáliz, en frutos de Physalis peruviana en la Sierra centro-norte del Ecuador [Disertación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador]. <http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/14682>

Cepero, M., Restrepo, S., Franco, A., Cárdenas, M., & Vargas, Natalia. (2012). *Biología de Hongos*

(Universidad de los Andes, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas). Ediciones Uniandes.

Chen, W., Kenney, T., Bielawski, J., & Gu, H. (2019). Testing adequacy for DNA substitution

models. *BMC Bioinformatics*, 20, 349. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2905-3>

- Choquer, M., Fournier, E., Kunz, C., Levis, C., Pradier, J.-M., Simon, A., & Viaud, M. (2007). *Botrytis cinerea* virulence factors: New insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 277(1), 1-10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>
- CIPF. (2021). *Revisión científica del impacto del cambio climático en las plagas de las plantas* (FAO en nombre de la Secretaría de la CIPF). Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. <https://doi.org/10.4060/cb4769es>
- Corredor, I., Maria, C., & Restrepo, S. (2007). Evaluación de la susceptibilidad de hongos endófitos aislados de rosa (rosa hybrida) a fungicidas comerciales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 9(1), 59-74.
- CYTED. (2014). *Uchuva, Physalis peruviana L. Fruta andina para el mundo* (1.ª ed., Vol. 1). Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo - CYTED. <https://www.vidarium.org/wp-content/uploads/2021/07/Uchiva-Physalis-peruviana-L-Fruta-andina-para-el-mundo.pdf>
- Dalmis, B., Schumacher, J., Moraga, J., Le Pecheur, P., Tudzunski, B., Gonzalez, I., & Viaud, M. (2011). The *Botrytis cinerea* phytotoxin botcinic acid requires two polyketide synthases for production and has a redundant role in virulence with botrydial. *Molecular Plant Pathology*, 12(6), 564-579. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00692.x>
- Dávila, M., Chaves, W., & Yáñez, J. (2018). Fungal communities isolated from symptomatic naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) leaves in the Ecuadorian Amazon region. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 39(1). <https://doi.org/doi.org/10.26807/remcb.v39i1.561>

- Dereeper, A., Audic, S., Claverie, J.-M., & Blanc, G. (2010). BLAST-EXPLORER helps you building datasets for phylogenetic analysis. *BMC Evolutionary Biology*, *10*, 8.
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-8>
- Diolez, A., Marches, F., Fortini, D., & Brygoo, Y. (1995). Boty, a long-terminal-repeat retroelement in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, *61*(1), 103-108. <https://doi.org/10.1128/aem.61.1.103-108.1995>
- Erper, I., Celik, H., Turkkan, M., & Cebi, M. (2015). First report of *Botrytis cinerea* on golden berry. *Australasian Plant Disease Notes*, *10*(1), 25. <https://doi.org/10.1007/s13314-015-0175-0>
- Ezzat, S. M., Abdallah, H. M. I., Yassen, N. N., Radwan, R. A., Mostafa, E. S., Salama, M. M., & Salem, M. A. (2021). Phenolics from *Physalis peruviana* fruits ameliorate streptozotocin-induced diabetes and diabetic nephropathy in rats via induction of autophagy and apoptosis regression. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *142*, 111948. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111948>
- FAO. (2021). *El estado mundial de la agricultura y la alimentación* [Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación]. Fomentar sistemas agroalimentarios resilientes: principios rectores.
<https://www.fao.org/3/CB4476ES/online/CB4476ES.html#>
- Federhen, S. (2012). The NCBI Taxonomy database. *Nucleic Acids Research*, *40*(D1), D136-D143.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1178>
- Fischer, G., Almanza, P. J., & Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, *36*, 01-15.
<https://doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>

- Fischer, G., Balaguera, H. E., & Magnitskiy, S. (2021). Review on the ecophysiology of important Andean fruits: Solanaceae. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, 24(1), Article 1. <https://doi.org/10.31910/rudca.v24.n1.2021.1701>
- Fischer, G., Herrera, A., & Almanza, P. J. (2011). Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.). En *Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits* (pp. 374-397e). Elsevier. <https://doi.org/10.1533/9780857092762.374>
- Fischer, G., & Melgarejo, L. M. (2020). The ecophysiology of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.)—An Andean fruit crop. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 14(1), 76-89. <https://doi.org/10.17584/rcch.2020v14i1.10893>
- Fischer, G., & Miranda, D. (2012). Uchuva (*Physalis peruviana* L.). En *Introducción (Manual para el cultivo de frutales en el trópico)* (pp. 10-15).
- Fuente, F. P. la, Nocetti, D., Sacristán, C., Ruiz, P., Guerrero, J., Jorquera, G., Uribe, E., Bucarey, J. L., Espinosa, A., & Puente, L. (2020). *Physalis peruviana* L. Pulp Prevents Liver Inflammation and Insulin Resistance in Skeletal Muscles of Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, 12(3), E700. <https://doi.org/10.3390/nu12030700>
- Garfinkel, A. R., Coats, K. P., Sherry, D. L., & Chastagner, G. A. (2019). Genetic analysis reveals unprecedented diversity of a globally-important plant pathogenic genus. *Scientific Reports*, 9, 6671. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43165-y>
- Gatto, L., Catanzaro, D., & Milinkovitch, M. C. (2007). Assessing the Applicability of the GTR Nucleotide Substitution Model Through Simulations. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2, 145-155.
- Giraldo, G. I., Cruz, C. D., & Sanabria, N. R. (2017). Propiedades Físicas del Jugo de Uchuva (*Physalis peruviana*) Clarificado en Función de la Concentración y la Temperatura.

Información tecnológica, 28(1), 133-142. <https://doi.org/10.4067/S0718->

07642017000100013

Gongora, A. C., & Rojas, P. (2006). *Incidencia de las enfermedades en uchuva *Physalis peruviana* L. por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca*. [Trabajo de Grado, Pontificia Universidad Javeriana].

<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8260/tesis244.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Granda, J. (2016). *Caracterización molecular y análisis filogenético de hongos microscópicos asociados a manchas foliares en hojas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en varias localidades del cantón Quito, Pichincha*. [Disertación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador].

http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/12516/TESIS_JLDIAZ_final.pdf

Gümrükcü, E., Polat, İ., Sülü, G., Kitapçı, A., & Baysal, Ö. (2016). First Report of Grey Mold Caused by *Botryotinia fuckeliana* on Golden Berry. *Plant Disease*, 100(3), 656-656.

<https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0908-PDN>

He, S. Q., Wen, Z. H., Bai, B., Jing, Z. Q., & Wang, X. W. (2021). *Botrytis polygoni*, a new species of the genus *Botrytis* infecting Polygonaceae in Gansu, China. *Mycologia*, 113(1), 78-91.

<https://doi.org/10.1080/00275514.2020.1809288>

Heeger, F., Wurzbacher, C., Bourne, E., Mazzoni, C., & Monaghan, M. (2019). Combining the 5.8S and ITS2 to improve classification of fungi. *Methods in Ecology and Evolution*, 10(10), 1702-1711.

<https://doi.org/10.1111/2041-210X.13266>

Herrera, F. (2016). *Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de*

*Alternaria spp. Sobre botones de Rosa (*Rosa sp*) y plantas de brócoli (*Brassica oleracea**

var. Italica) [Trabajo de titulación, Universidad San Francisco de Quito].

<https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6158/1/128912.pdf>

Holder, M., & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches.

Nature Reviews. Genetics, 4(4), 275-284. <https://doi.org/10.1038/nrg1044>

Hosainzadegan, H., Khalilov, R., & Gholizadeh, P. (2020). The necessity to revise Koch's

postulates and its application to infectious and non-infectious diseases: A mini-review.

European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology, 39(2), 215-218.

<https://doi.org/10.1007/s10096-019-03681-1>

Hyde, K. D., Nilsson, R. H., Alias, S. A., Ariyawansa, H. A., Blair, J. E., Cai, L., de Cock, A. W. A. M.,

Dissanayake, A. J., Glockling, S. L., Goonasekara, I. D., Gorczak, M., Hahn, M.,

Jayawardena, R. S., van Kan, J. A. L., Laurence, M. H., Lévesque, C. A., Li, X., Liu, J.-K.,

Maharachchikumbura, S. S. N., ... Zhou, N. (2014). One stop shop: Backbones trees for important phytopathogenic genera: I (2014). *Fungal Diversity*, 67(1), 21-125.

<https://doi.org/10.1007/s13225-014-0298-1>

INEC. (2020). *Documento metodológico de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria*

Continua (ESPAC). Instituto Nacional de Estadística y Censos INEC.

<https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web->

[inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Metodologia%20ESPAC%202020.pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac-2020/Metodologia%20ESPAC%202020.pdf)

Jarvis, W. (1977). *Botryotinia and Botrytis species; taxonomy, physiology and pathogenicity*.

Canadian Department of Agriculture.

Jill Harrison, C., & Langdale, J. A. (2006). A step by step guide to phylogeny reconstruction. *The*

Plant Journal, 45(4), 561-572. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02611.x>

- Kasali, F. M., Tusiimire, J., Kadima, J. N., Tolo, C. U., Weisheit, A., & Agaba, A. G. (2021). Ethnotherapeutic Uses and Phytochemical Composition of *Physalis peruviana* L.: An Overview. *The Scientific World Journal*, 2021, 5212348. <https://doi.org/10.1155/2021/5212348>
- Keating, J. N., Sansom, R. S., Sutton, M. D., Knight, C. G., & Garwood, R. J. (2020). Morphological Phylogenetics Evaluated Using Novel Evolutionary Simulations. *Systematic Biology*, 69(5), 897-912. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syaa012>
- Khazaeli, P., Zamanizadeh, H., Morid, B., & Bayat, H. (2010). Morphological and Molecular Identification of *Botrytis Cinerea* Causal Agent of Gray Mold in Rose Greenhouses in Central Regions of Iran. *International Journal of Agricultural Science and Research*, 1(1). https://www.researchgate.net/figure/Polymerase-Chain-Reaction-PCR-amplification-with-C729-primers-on-Botrytis-cinerea_fig1_267806639
- Kwon, O.-K., Jeong, A.-R., Jeong, Y.-J., Kim, Y.-A., Shim, J., Jang, Y. J., Lee, G. P., & Park, C.-J. (2021). Incidence of *Alternaria* Species Associated with Watermelon Leaf Blight in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 37(4), 329-338. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2021.0018>
- Lagos, T., Vallejo, F., Criollo, H., & Muñoz, J. (2008). Biología reproductiva de la uchuva. *Acta Agronómica*, 57(2), 81-88.
- Legge, A. P. (1974). Notes on the history, cultivation and uses of *Physalis peruviana* L. *Journal of the Royal Horticultural Society*, 99(7), 310-314.
- Lehotay, S. J. (2018). Food safety analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5329-5330. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1129-0>
- Leiva, M., Panimboza, J. G., Rivas, F., Rivera, A., Carpio, C., Leiva-Mora, M., Panimboza-Yanzapanta, J. G., Rivas-Figueroa, F., Rivera-Casignia, A., & Carpio, C. (2019). Agresividad

diferencial entre aislados de *Botrytis cinerea* Pers. En *Fragaria vesca* L. cv. Albion. *Revista de Protección Vegetal*, 34(1).

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1010-27522019000100001&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Leroch, M., Plesken, C., Weber, R. W. S., Kauff, F., Scalliet, G., & Hahn, M. (2013). Gray Mold Populations in German Strawberry Fields Are Resistant to Multiple Fungicides and Dominated by a Novel Clade Closely Related to *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(1), 159-167. <https://doi.org/10.1128/AEM.02655-12>

Levis, C., Fortini, D., & Brygoo, Y. (1997). Flipper, a mobile Fot1-like transposable element in *Botrytis cinerea*. *Molecular and General Genetics MGG*, 254(6), 674-680. <https://doi.org/10.1007/s004380050465>

Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., & Schnabel, G. (2012). *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia*, 104(3), 650-658. <https://doi.org/10.3852/11-218>

Liu, Q., Li, G., Li, J., & Chen, S. (2016). *Botrytis eucalypti*, a novel species isolated from diseased Eucalyptus seedlings in South China. *Mycological Progress*, 15(10), 1057-1079. <https://doi.org/10.1007/s11557-016-1229-1>

Lu, B. H., Wang, X. H., Wang, R., Wang, X., Yang, L. N., Liu, L. P., Yang, C., Gao, J., & Liu, X. N. (2019). First Report of *Botrytis pelargonii* Causing Postharvest Gray Mold on Fresh Ginseng Roots in China. *Plant Disease*, 103(1), 149. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-17-0031-PDN>

MAG. (2020). *Resumen Ejecutivo de los Diagnósticos Territoriales del Sector Agrario* [Resumen Ejecutivo]. Ministerio de Agricultura y Ganadería – Coordinación General de Planificación y Gestión Estratégica. <https://www.agricultura.gob.ec/wp->

content/uploads/2020/08/Resumen-Ejecutivo-Diagn%C3%B3sticos-Territoriales-del-Sector-Agrario_14-08-2020-1_compressed.pdf

MAG. (2021). *Política y Plan Nacional Agropecuario 2020-2030* [Plan Nacional]. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <https://www.rimisp.org/wp-content/uploads/2021/04/Plan-Nacional-Agropecuario-MAG-2021.pdf>

Matute, P. (2019). *Control biológico del moho gris (Botrytis cinerea) en cultivos de fresa (Fragaria vesca L.) mediante hongos filamentosos antagonistas* [Tesis, Pontificia Universidad Salesiana Sede Cuenca].

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/18147/1/UPS-CT008620.pdf>

McGinn, S., & Gut, I. G. (2013). DNA sequencing—Spanning the generations. *New Biotechnology*, 30(4), 366-372. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2012.11.012>

Melotto, M., Brandl, M. T., Jacob, C., Jay-Russell, M. T., Micallef, S. A., Warburton, M. L., & Van Deynze, A. (2020). Breeding Crops for Enhanced Food Safety. *Frontiers in Plant Science*, 11, 428. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00428>

Notte, A.-M., Plaza, V., Marambio-Alvarado, B., Olivares, L., Poblete, M., Silva, E., & Castillo, L. (2021). Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated to the endemic flora of semi-desert climate in Chile. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100049>

Novoa, R. H., Bojacá, M., Galvis, J. A., & Fischer, G. (2006). La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12 °C (*Physalis peruviana* L.)*. *Agronomía Colombiana*, 24(1), 77-86.

Paredes, M., Yáñez, J., & Coba, M. M. (2021). Identificación de *Cercospora* spp. Como agente causal de mancha foliar en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra norte del

Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 42(2), Article 2.

<https://doi.org/10.26807/remcb.v42i2.899>

Plesken, C., Pattar, P., Reiss, B., Noor, Z. N., Zhang, L., Klug, K., Huettel, B., & Hahn, M. (2021).

Genetic Diversity of *Botrytis cinerea* Revealed by Multilocus Sequencing, and Identification of *B. cinerea* Populations Showing Genetic Isolation and Distinct Host Adaptation. *Frontiers in Plant Science*, 12.

<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2021.663027>

Porquier, A., Moraga, J., Morgant, G., Dalmais, B., Simon, A., Sghyer, H., Collado, I. G., & Viaud,

M. (2019). Botcinic acid biosynthesis in *Botrytis cinerea* relies on a subtelomeric gene cluster surrounded by relics of transposons and is regulated by the Zn2Cys6 transcription factor BcBoa13. *Current Genetics*, 65(4), 965-980.

<https://doi.org/10.1007/s00294-019-00952-4>

Prasannath, K., Shivas, R. G., Galea, V. J., & Akinsanmi, O. A. (2021). Novel *Botrytis* and

Cladosporium Species Associated with Flower Diseases of Macadamia in Australia.

Journal of Fungi, 7(11), 898. <https://doi.org/10.3390/jof7110898>

PRO ECUADOR. (2018). *Mango, piña, uvilla y banana deshidratada en el mercado de los Estados*

Unidos. Equipo OCE Nueva York. www.proecuador.gob.ec

PRO ECUADOR. (2020). *Oferta de uvilla ecuatoriana en mercados potenciales*. Ministerio de

Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca. www.proecuador.gob.ec

Puente, L., Vega-Gálvez, A., Fuentes, I., Stucken, K., Rodríguez, A., & Pastén, A. (2021). Effects of

drying methods on the characterization of fatty acids, bioactive compounds and antioxidant capacity in a thin layer of physalis (*Physalis peruviana* L.) pulp. *Journal of Food Science and Technology*, 58(4), 1470-1479. [https://doi.org/10.1007/s13197-020-](https://doi.org/10.1007/s13197-020-04659-0)

04659-0

- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, *80*(3), 756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rimington, W. R., Duckett, J. G., Field, K. J., Bidartondo, M. I., & Pressel, S. (2020). The distribution and evolution of fungal symbioses in ancient lineages of land plants. *Mycorrhiza*, *30*(1), 23-49. <https://doi.org/10.1007/s00572-020-00938-y>
- Rubio, S., Pacheco, R., Gómez, A., Perdomo, S., & García, R. (2020). Secuenciación de nueva generación (NGS) de ADN: Presente y futuro en la práctica clínica. *Universitas Medica*, *61*(2). [https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2%20\(2020\)/231062391008/](https://revistas.javeriana.edu.co/files-articulos/UMED/61-2%20(2020)/231062391008/)
- Saito, S., Margosan, D., Michailides, T. J., & Xiao, C. L. (2016). *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia*, *108*(2), 330-343. <https://doi.org/10.3852/15-165>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *74*(12), 5463-5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Schmitt, I., & Barker, F. K. (2009). Phylogenetic methods in natural product research. *Natural Product Reports*, *26*(12), 1585-1602. <https://doi.org/10.1039/b910458p>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, & Fungal Barcoding Consortium Author List. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>

- Shinohara, N., Woo, C., Yamamoto, N., Hashimoto, K., Yoshida-Ohuchi, H., & Kawakami, Y. (2021). Comparison of DNA sequencing and morphological identification techniques to characterize environmental fungal communities. *Scientific Reports*, *11*(1), 2633. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81996-w>
- Staats, M., van Baarlen, P., Schouten, A., van Kan, J. A. L., & Bakker, F. T. (2007). Positive selection in phytotoxic protein-encoding genes of *Botrytis* species. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, *44*(1), 52-63. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2006.07.003>
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. L. (2005). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*, *22*(2), 333-346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *30*(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Tapia, E. (2019). Ecuador realiza su primer envío de uvillas a EE.UU. *El Comercio*. <https://www.elcomercio.com/actualidad/negocios/ecuador-uvilla-exportacion-eeuu-comercio.html>
- Tekpinar, A. D., & Kalmer, A. (2019). Utility of various molecular markers in fungal identification and phylogeny. *Nova Hedwigia*, 187-224. https://doi.org/10.1127/nova_hedwigia/2019/0528
- Terrones, J., Nieto, D., Nava, C., Téliz, D., García, R., Vallejo, M. R., & Sánchez, P. (2019). *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista mexicana de fitopatología*, *37*(3), 365-382. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Valero, C. A., Steentjes, M. B. F., Slot, J. C., Shi-Kunne, X., Scholten, O. E., & van Kan, J. A. L. (2020). Dynamics in Secondary Metabolite Gene Clusters in Otherwise Highly Syntenic

- and Stable Genomes in the Fungal Genus *Botrytis*. *Genome Biology and Evolution*, 12(12), 2491-2507. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa218>
- van Dijk, E. L., Jaszczyszyn, Y., Naquin, D., & Thermes, C. (2018). The Third Revolution in Sequencing Technology. *Trends in Genetics: TIG*, 34(9), 666-681. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.008>
- van Kan, J. A. L., Shaw, M. W., & Grant-Downton, R. T. (2014). **Botrytis** species: Relentless necrotrophic thugs or endophytes gone rogue? *Molecular Plant Pathology*, 15(9), 957-961. <https://doi.org/10.1111/mpp.12148>
- Verma, M., Kulshrestha, S., & Puri, A. (2017). Genome Sequencing. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1525, 3-33. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6622-6_1
- Volcy, C. (2008). Genesis and evolution of Koch postulates and their relationship with phytopathology. A review. *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.
- Vu, D., Groenewald, M., de Vries, M., Gehrman, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J. Z., Cardinali, G., Houbraeken, J., Boekhout, T., Crous, P. W., Robert, V., & Verkley, G. J. M. (2019). Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*, 92, 135-154. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001>
- Walker, A.-S., Gautier, A. L., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le P Cheur, P., Dupont, J., & Fournier, E. (2011). *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 101(12), 1433-1445. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0104>

- Wang, L., Wang, S., & Bouchard-Côté, A. (2020). An Annealed Sequential Monte Carlo Method for Bayesian Phylogenetics. *Systematic Biology*, *69*(1), 155-183.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syz028>
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., & Jin, H. (2013). Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6154), 118-123.
<https://doi.org/10.1126/science.1239705>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Academic Press Inc.*, 315-322.
- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, *8*(5), 561-580.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: Principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, *13*(5), 303-314. <https://doi.org/10.1038/nrg3186>
- Yu, T.-J., Cheng, Y.-B., Lin, L.-C., Tsai, Y.-H., Yao, B.-Y., Tang, J.-Y., Chang, F.-R., Yen, C.-H., Ou-Yang, F., & Chang, H.-W. (2021). Physalis peruviana-Derived Physapruin A (PHA) Inhibits Breast Cancer Cell Proliferation and Induces Oxidative-Stress-Mediated Apoptosis and DNA Damage. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, *10*(3), 393.
<https://doi.org/10.3390/antiox10030393>
- Zhang, J., Wu, M.-D., Li, G.-Q., Yang, L., Yu, L., Jiang, D.-H., Huang, H.-C., & Zhuang, W.-Y. (2010). *Botrytis fabiopsis*, a new species causing chocolate spot of broad bean in central China. *Mycologia*, *102*(5), 1114-1126. <https://doi.org/10.3852/09-217>

Zhang, J., Yang, H., Yu, Q. Y., Wu, M. D., Yang, L., Zhuang, W. Y., Chen, W. D., & Li, G. Q. (2016).

Botrytis pyriformis sp. Nov., a novel and likely saprophytic species of *Botrytis*.

Mycologia, 108(4), 682-696. <https://doi.org/10.3852/15-340>

