



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA: “Determinación de la capacidad infectiva de hongos del género
Ilyonectria aislados de raíces y tallos de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)
con síntomas de pie negro”**

AUTOR: SÁNCHEZ CRIOLLO, JESSICA VANESSA

DIRECTOR: FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER PhD.

SANGOLQUÍ

2019



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE HONGOS DEL GÉNERO *ILYONECTRIA* AISLADOS DE RAÍCES Y TALLOS DE MORA DE CASTILLA (*RUBUS GLAUCUS BENTH*) CON SÍNTOMAS DE PIE NEGRO.**” realizado por la señorita **SÁNCHEZ CRIOLLO JESSICA VANESSA**, el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente..

Sangolquí, junio del 2019



FRANCISCO JAVIER FLORES FLOR PhD.

DIRECTOR



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **SÁNCHEZ CRIOLLO, JESSICA VANESSA** declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de titulación: **“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE HONGOS DEL GÉNERO *ILYONECTRIA* AISLADOS DE RAÍCES Y TALLOS DE MORA DE CASTILLA (*RUBUS GLAUCUS BENTH*) CON SÍNTOMAS DE PIE NEGRO”** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Consecuentemente el contenido de la investigación mencionada es veraz.

Sangolquí, junio del 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Jessica'.

Jessica Vanessa Sánchez Criollo

C.I. 1725640849



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, *Sánchez Criollo, Jessica Vanessa*, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD INFECTIVA DE HONGOS DEL GÉNERO ILYONECTRIA AISLADOS DE RAÍCES Y TALLOS DE MORA DE CASTILLA (RUBUS GLAUCUS BENTH) CON SÍNTOMAS DE PIE NEGRO”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, junio de 2019

A handwritten signature in blue ink, enclosed in a blue circular stamp.

Jessica Vanessa Sánchez Criollo

C.I. 1725640849

DEDICATORIA

Al único ser capaz de amarme a pesar de fallar una y mil veces, Dios, por ser mi fortaleza en tiempo de angustia.

A mis padres Luis y Marisol quienes con su amor, sabiduría y esfuerzo hicieron de mí una mejor persona, por mostrarme que aún en medio de dolor y pruebas Dios siempre está conmigo.

A mi hermana Johanna por ser la persona más especial en mi vida, sin duda alguna a pesar de las diferencias que a veces tenemos siempre has estado apoyándome, te amo mucho hermanita.

A mi familia por todo su amor y apoyo, a pesar de no vernos muy seguido sé que siempre están conmigo.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por seguir cumpliendo sus promesas en mi vida, tener el control de cada situación, brindarme paz, sabiduría y fuerza en los momentos de dificultad; por darme una maravillosa familia ya que sin ellos mi vida no sería igual.

A mis padres Luis y Marisol por rodearme de amor en cada momento, por el apoyo y palabras de aliento para cumplir los anhelos de mi corazón, por ser mi fuente de inspiración y ejemplo para salir adelante.

A mi hermana Johanna por ser esa mujer esforzada y valiente, capaz de levantarme cuando he caído, sin duda alguna tengo a la mejor hermana del mundo.

A mis abuelitos por nunca dejar de consentirme a pesar de ya no ser una niña, gracias por todo el amor y apoyo en cada etapa de mi vida, por ser el motivo de unión familiar, los amo mucho y desearía que fueran eternos.

A mi familia que siempre está pendiente de mí, en ellos he encontrado el apoyo y fuerza para seguir adelante, no me alcanzarían estas páginas para describir mi agradecimiento y respeto.

A mi director de tesis Francisco Flores, PhD. por permitirme realizar este trabajo bajo su dirección, darme su confianza y ayudarme a cumplir este gran reto.

A la persona que me ha motivado e inculcado mi amor por la ciencia: Alma Koch, gracias por la confianza y el apoyo durante mi paso por el laboratorio de Microbiología.

Al Ing. William Viera al otorgarme la confianza para el desarrollo de este proyecto, siendo de apoyo financiero para el desarrollo del mismo. A las personas que trabajan en el INIAP por su

ayuda y guía para el cuidado de los cultivos, permitiendo que adquiriera mayor destreza en el trabajo de campo.

A los técnicos Fernando, Jairo y Alex, del laboratorio de Fitopatología de Agrocalidad por su apoyo y supervisión mientras desarrollaba uno de los objetivos de este proyecto. A la Ing. Cynthia Oña por brindarme su ayuda durante el desarrollo en campo de este proyecto.

A los chicos del laboratorio Kathy, Grace y Cami, con quienes he compartido grandes experiencias en el transcurso de este trabajo, sobre todo a Alvarito y Dani quienes fueron de apoyo durante el desarrollo de este proyecto, gracias por su ayuda desinteresada y como olvidar a Belén que en este corto tiempo que llevamos siendo amigas me ha demostrado que es una persona con un gran corazón, sin duda alguna los voy a extrañar. A los pasantes del Laboratorio Tefa, Jeni, José, Vane, por su ayuda durante su paso por el laboratorio.

A mis amigas: Ari y Sofi por todo lo que he compartido con ellas en el transcurso de mi vida universitaria; a Fiana por ser una persona maravillosa capaz de brindar amistad sincera, con quien he compartido a lo largo de estos años varias experiencias y ha sido de gran ayuda durante el desarrollo de este proyecto, a Karlita por ser una gran amiga en todo tiempo y brindarme su apoyo incondicional en tiempos difíciles.

A mis amigos Juli, Fer, Paúl y Leo con quienes he compartido grandes momentos dentro y fuera de las aulas, los cuales los llevo en mi memoria, cada uno de ustedes es importante en mi vida, gracias por su amistad y cariño.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD.....	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	xiv
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos de la Investigación.....	4
1.3.1 Objetivo General	4

1.3.2 Objetivos Específicos	4
MARCO TEÓRICO	5
2.1 Mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth)	5
2.2 Origen y distribución de la mora de castilla	7
2.2.1 Variedades	8
2.2.1 Clasificación taxonómica de la mora	9
2.3 Importancia Económica	9
2.4 Enfermedad del Pie negro	10
2.4.1 Síntomas del pie negro en mora	11
2.4.2 Taxonomía del agente causal	13
2.5 Pruebas de patogenicidad	14
2.5.1 Método de inculación	15
2.6 Hipótesis	15
CAPÍTULO III	16
MATERIALES Y MÉTODOS	16
3.1 Revisión Bibliográfica	16
3.2 Reactivación de los aislados del género <i>Ilyonectria</i>	16
3.3 Extracción de ADN	18
3.4 Amplificación de ADN de los aislados de <i>Ilyonectria</i>	19

3.5 Inoculación de los aislados del género <i>Ilyonectria</i> en moras de castilla	21
3.5.1 Inoculación con conidias	21
3.6 Identificación morfológica de los aislados	23
3.6.1 Caracterización macroscópica y microscópica	23
3.7 Evaluación de la capacidad infectiva de los aislados	24
3.7.1 Marchitez de hojas basales	24
3.7.2 Porcentaje de infección en el cuello de la raíz	25
3.8 Reaislamiento de los hongos <i>Ilyonectria</i> y <i>Dactylonectria</i> desde las raíces de mora de castilla	26
3.9 Análisis filogenético	26
3.10 Análisis estadístico	27
CAPÍTULO IV	28
RESULTADOS	28
4.1 Caracterización morfológica de los aislados	28
4.1.1 <i>Dactylonectria torresensis</i>	28
4.1.2 <i>Ilyonectria robusta</i>	30
4.1.3 <i>Ilyonectria vredenhoekensis</i>	33
4.1.4 <i>Ilyonectria venezuelensis</i>	35
4.2 Identificación molecular	37

4.4.1 Marchitez en hojas basales	39
4.4.2 Severidad de la infección en el cuello de la raíz	43
4.5 Reaislamiento de los hongos <i>Ilyonectria</i> y <i>Dactylonectria</i>	45
4.6 Análisis filogenético	46
CAPÍTULO V	48
DISCUSIÓN.....	48
CAPÍTULO VI.....	55
CONCLUSIONES	55
CAPITULO VII.....	58
BIBLIOGRAFÍA.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mora de castilla (Rubus	5
Figura 2. Zonas con mayor producción de.....	6
Figura 3. Raíz de mora infectada con.....	12
Figura 4. Identificación morfológica de <i>I. vredenhoekensis</i> . a-b conidióforos.	14
Figura 5. Cepario de hongos aislados por Iturralde (2017).....	17
Figura 6. <i>Dactylonectria Torresensis</i> en PDA de 30 días de crecimiento.....	29
Figura 7. Macro y microconidias de <i>Dactylonectria torresensis</i> con azul de lactofenol.....	30
Figura 8. <i>Dactylonectria torresensis</i> con ácido láctico. (A, B). Conidióforos	30
Figura 9. <i>Ilyonectria robusta</i> en PDA a 25°C de 30 días de crecimiento.....	31
Figura 10. <i>Ilyonectria robusta</i> . (A) Macro y microconidias con azul de lactofenol.	32
Figura 11. <i>Ilyonectria robusta</i> . (A) Conidióforo simple y poco ramificado, hifas. (B) Clamidosporas en micelio. Lente 40X, barra de 20 µm.	32
Figura 12. <i>Ilyonectria vredenhoekensis</i> en PDA a 25°C de 30 días de crecimiento.....	33
Figura 13. <i>Ilyonectria vredenhoekensis</i> . (A) Macro y microconidias en azul de	34
Figura 14. <i>Ilyonectria vredenhoekensis</i> . (A) Conidióforo simple y poco ramificado, macroconidias. (B) Clamidosporas en micelio. Lente 40X, barra de 20 µm.	35
Figura 15. <i>Ilyonectria venezuelensis</i> en PDA a 25°C de 30 días de crecimiento.	36
Figura 16. <i>Ilyonectria venezuelensis</i> . (A) Macro y microconidias en azul de lactofenol. (B) Macro y microconidias en ácido láctico Lente 40X, barra de 20 µm.	37
Figura 17. <i>Ilyonectria venezuelensis</i> . (A, B) macro y microconidias. Lente 40X,.....	37

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con los primers.....	38
Figura 19. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis	40
Figura 20. Porcentaje de marchitez en las hojas basales entre los diferentes	40
Figura 21. Síntomas aéreos en mora de castilla después de cuatro meses	41
Figura 22. Evaluación de los síntomas aéreos después de cuatro meses de la.....	41
Figura 23. Evaluación de los síntomas aéreos en <i>R. glaucus</i> transcurrido cuatro	42
Figura 24. (A-B) T5 (<i>I. vredenhoekensis</i>) Presencia de síntomas	42
Figura 25. Tejido procedente del cuello de las raíces de mora de castilla, cuatro meses posteriores a su inoculación con una solución de esporas a una concentración 1×10^6	43
Figura 26. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un	44
Figura 27. Gráfica de porcentaje de infección en el cuello de la raíz entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero. T1 (Control negativo). T2 (<i>D. torresensis</i>).	44
Figura 28. (A) <i>Dactylonectria torresensis</i> (T2). (B) <i>Ilyonectria robusta</i> (T3).	45
Figura 29. (A) <i>Ilyonectria venezuelensis</i> (T4). (B) <i>Ilyonectria vredenhoekensis</i>	45
Figura 30. Árbol concatenado de los géneros <i>Ilyonectria</i> y <i>Dactylonectria</i> usando	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Variedades de la mora en el Ecuador</i>	8
Tabla 2. <i>Hongos reactivados del cepario del Laboratorio de Microbiología</i>	17
Tabla 3. <i>Componentes del tampón de extracción</i>	19
Tabla 4. <i>Programa de PCR para los primers ITS 4 e ITS 5</i>	20
Tabla 5. <i>Secuencias de los primers ITS4 e ITS5</i>	20
Tabla 6. <i>Descripción de los tratamientos a nivel de invernadero</i>	22
Tabla 7. <i>Escala de medición para el porcentaje de marchitez en las hojas basales</i>	24
Tabla 8. <i>Escala de medición del porcentaje de infección en el cuello de la raíz</i>	25

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µm	Micrómetros
m.s.n.m	Metros sobre el nivel del mar
°C	Grados centígrados
g	Gramo
µg	Microgramos
mg	Miligramo
ng	nanogramo
mM	Milimolar
ppm	Partes por millón
L	Litro
µL	Microlitro
sp.	Especie
r.p.m	Revoluciones por minuto
ADE	Agua destilada estéril
INEC	Instituto Nacional de Estadísticas y Censos
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
HKY	Modelo Hasegawa Kishino Yano
PDA	Agar papa dextrosa
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

En Ecuador, las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha y Carchi son las principales productoras de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth). La enfermedad conocida como “pie negro” que produce podredumbre en la raíz de la mora, es causada por hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria*. Se identificaron molecularmente los aislados de *I. vredenhoekensis*, *I. robusta*, *D. torresensis* usando la región ITS como barcode; sin embargo, *I. venezuelensis* no fue identificada debido a la falta de información disponible en la base de datos. La identificación morfológica se realizó con ayuda de un microscopio óptico mediante la técnica de microcultivos. La capacidad infectiva de *I. vredenhoekensis*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* y *D. torresensis* se determinó mediante inoculación artificial en 35 plantas sanas de mora (*R. glaucus*) con una solución 1×10^6 conidias/mL. Se evaluó el porcentaje de infección en el cuello de la raíz y la marchitez en las hojas basales en los cuatro meses posteriores a la inoculación, determinando a *I. vredenhoekensis* como el aislado con mayor virulencia en el tejido radicular con 70.43%, en comparación a *I. venezuelensis*, *I. robusta* y *D. torresensis* con un porcentajes de infección de 40.71%, 35.14% y 38.20%. El análisis filogenético de máxima verosimilitud (ML) y análisis bayesiano determinó a los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* como especies monofiléticas.

PALABRAS CLAVE:

- MARCHITEZ
- PIE NEGRO
- *Ilyonectria*

ABSTRACT

In Ecuador, the provinces of Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha and Carchi are the main producers of blackberry (*Rubus glaucus* Benth). The disease known as "black foot" that produces rot in the root of the blackberry, is caused by fungi of the genera *Dactylonectria* and *Ilyonectria*. The isolates of *I. vredenhoekensis*, *I. robusta*, *D. torresensis* were molecularly identified using the ITS region as barcode, however *I. venezuelensis* was not identified due to the lack of information available in the database. The morphological identification was made with the help of an optical microscope using the microculture technique. The infective capacity of *I. vredenhoekensis*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* and *D. torresensis* was determined by artificial inoculation in 35 healthy plants of blackberry (*R. glaucus*) with a solution 1×10^6 conidia / mL. The percentage of infection in the root neck and the march in the basic leaves in the four months after the inoculation were evaluated, determining *I. vredenhoekensis* as the isolated one with greater virulence in the root tissue with 70.43%, in comparison *I. venezuelensis*, *I. robusta* and *D. torresensis* with infection rates of 40.71%, 35.14% and 38.20%. The phylogenetic analysis of maximum likelihood (ML) and the Bayesian analysis determined the fungi of the genera *Dactylonectria* and *Ilyonectria* as monophyletic species.

KEY WORDS

- **WILTING**
- **BLACK FOOT ROOT**
- *Ilyonectria*

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) es un frutal tradicional originario de la región andina del país que se adapta mejor en áreas moderadamente frías. En zonas con mayor temperatura, la planta exige poda continua al poseer mayor crecimiento vegetativo (Martínez et al, 2013). En Ecuador, la producción en el año 2000 fue de 5247 Tm según datos del III censo Nacional Agropecuario, siendo Tungurahua y Bolívar las provincias con mayor producción (INIAP, 2016).

Actualmente las variaciones climáticas han incrementado la incidencia de enfermedades ocasionadas por diversos microorganismos perjudiciales, que afectan a diferentes órganos de la planta, reduciendo la producción de los cultivos (ICA, 2011). La producción en los cultivos de mora se ha visto perjudicada por hongos patógenos causantes de pudriciones en el fruto como *Botrytis cinerea*, mildiu vellosa producido por *Oidium* sp. y síntomas de marchitez ocasionados por *Verticillium* sp. y *Fusarium oxysporum*, dañando la economía del agricultor (Alarcón, 2008; MAGAP, 2013). En los últimos años se han reportado varios casos de pudrición en plantas herbáceas y leñosas en todo el mundo, ocasionados por los hongos teleomorfos del género *Cylindrocarpon* tales como *Campylocarpon*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria* y *Neonectria* (Malapi-Wight et al., 2015).

La enfermedad del pie negro también sucede en el aguacate (*Persea americana*), olivos (*Olea europaea*), ginseng (*Panax ginseng*) y fresa (*Fragaria × ananassa*), donde se observa pudrición radical (Malapi-Wight et al., 2015). En los cultivos de fresas y frambuesas del norte de Alemania, Weber y Entrop (2017) aislaron varios hongos *Cylindrocarpon* como patógenos potenciales; sin embargo, estas especies no fueron asociadas con la enfermedad del pie negro. También identificaron a *Dactylonectria torresensis* como la especie aislada con mayor frecuencia de las raíces de fresa y de los campos de producción, asociada a los síntomas de pie negro en fresas y frambuesas del norte de Alemania.

Iturralde (2017) estandarizó una metodología de inoculación de *Ilyonectria* sp. en plantas de mora de castilla (*R. glaucus*), mediante la aplicación de una solución de conidias en plantas con heridas en la raíz, logrando la infección del cuello y raíz de las plantas. Mediante este estudio se identificó a *D. torresensis* como uno de los agentes causales del pie negro en la mora de castilla, sin embargo, otras especies *I. vredenhoekensis*, *I. robusta* e *I. venezuelensis* también fueron asociadas con la enfermedad.

El pie negro afecta primero al sistema radical de las plantas invadiendo de manera lenta y progresiva hasta que las raíces empiezan a necrosar, las hojas se tornan amarillas y se marchitan, finalmente toda la planta muere (ICA, 2011).

El INIAP, con apoyo técnico y económico del gobierno suizo, implementó el programa de fruticultura que se desarrolla en dos etapas: la primera se enfocó en frutales del centro del país, mediante la generación de nuevas tecnologías para el manejo y selección de materiales de mayor

rendimiento, mejorando la calidad de la fruta y la rentabilidad de los productos. La segunda etapa inició en el 2000 y se enfocó en frutales de exportación, priorizando el mejoramiento genético de especies para que sean resistentes a enfermedades como la del pie negro en mora INIAP (2018).

1.2 Justificación del problema

En el Ecuador, el cultivo y comercialización de mora de castilla es la base de la economía de pequeños agricultores de la región andina, en especial en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha y Carchi. La provincia con mayor producción es Bolívar con un 39% de la producción nacional, seguido de la provincia de Tungurahua con un 31% (Mosquera et al., 2017). Sin embargo, las condiciones climáticas y la incidencia de enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos, han ocasionado una disminución en la calidad de la fruta y en el rendimiento de las cosechas (ICA, 2011).

Los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* son habitantes del suelo y pueden sobrevivir durante largos periodos gracias a estructuras llamadas clamidosporas. Poseen un amplio rango de hospederos, en los cuales causan decaimiento y muerte, principalmente en plantas jóvenes, ocasionando pérdidas económicas significativas (Alaniz, 2008). A nivel mundial existen pocos estudios sobre la etiología del pie negro en mora de castilla, por lo tanto, la identificación de las especies causantes de la enfermedad y su capacidad infectiva en el hospedero son fundamentales para poder implementar planes de control efectivos.

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Determinar la capacidad infectiva de hongos del género *Ilyonectria* asociados con síntomas de pie negro en moras de castilla (*Rubus glaucus* Benth).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Identificar morfológicamente aislados de *Ilyonectria* provenientes de plantas de mora de castilla con síntomas de pie negro.
- Reconstruir la filogenia de los aislados de hongos del género *Ilyonectria* utilizando métodos multilocus.
- Determinar el grado de infección de las cepas de *Ilyonectria* en moras de castilla a nivel de invernadero.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)

Es una planta de crecimiento herbáceo o semi leñoso anual, se cultiva en regiones comprendidas entre 2200 a 3200 m.s.n.m (INIAP, 2016). Según Clark y colaboradores (2007) pueden adaptarse a diversos pisos climáticos. Sus frutos son bayas con múltiples drupas pequeñas de 1 a 2.5 cm y cada una contiene una semilla de color café (Figura 1); las flores son blancas pequeñas con inflorescencias laterales de 6 a 11 mm de ancho (Osorio et al., 2012). La planta de mora presenta una raíz principal pivotante con raíces secundarias abundantes que se extienden 10 a 30 cm del suelo. Tiene un tallo herbáceo, recto con ramificaciones secundarias y terciarias. Sus hojas son elípticas, puntiagudas dispuestas en forma alterna (ICA, 2011).



Figura 1. Mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)

Fuente: <https://pxhere.com/es/photo/865996>

Según reportes del INEC (2000) se estima 5247 ha de cultivos de mora en el Ecuador (INIAP, 2016). Las zonas con mayor producción de mora son los valles del callejón interandino principalmente las provincias de Bolívar y Tungurahua (Figura 2).

La planta de mora inicia el periodo de fructificación a los ocho meses después del trasplante y puede presentar un periodo de producción de hasta 10 años. El fruto es una fuente de vitaminas, minerales y fibra, sus extractos son ricos en polifenoles, flavonoides y ácidos fenólicos (Delgado, 2012).



Figura 2. Zonas con mayor producción de *Rubus* en el Ecuador.
Fuente: (INEC, 2000)

Los cultivos de mora crecen en temperaturas entre 8 y 22°C, pero su mayor producción se da en zonas con temperaturas de 12 a 14°C, con precipitaciones que oscilan entre 500 y 2000 mm al año, humedad relativa del 70 al 90 % y un pH de 5.5 a 7 (INIAP, 2016). El suelo para el cultivo

de mora debe ser franco arcilloso para una mejor retención y eliminación del exceso de agua y debe poseer un alto contenido de materia orgánica (Franco & Giraldo, 1998).

2.2 Origen y distribución de la mora de castilla

Las moras (*Rubus* spp.) son frutales que presentan diversos tamaños, desde diminutas plantas hasta arbustos de más de 5 m de altura. Se distribuyen ampliamente encontrándose cultivos en Europa, Asia y América del Norte (Clark et al., 2007). Darrow (1952) describe a un fruto silvestre de los Andes creciendo en la naturaleza desde Guatemala hasta Ambato (Ecuador). Complementariamente documentos históricos del Ecuador señalan la existencia de la mora creciendo de forma silvestre durante la época de la conquista (1548) desde Tumbes (Perú) hasta Tomebamba, actual Cuenca, Ecuador (Patiño, 2002). Hartw descubrió la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) y Benth la describió, su nombre científico proviene de las palabras rubus, por el rojo de sus frutos y glaucus del verde claro de sus tallos (INIAP, 2016).

El género *Rubus* se divide en dos subgéneros, *Eubatus* (mora) e *Idaeobatus* (frambuesas), tomando en cuenta ciertas características morfológicas como el torus (receptáculo): en las moras permanece unido al fruto mientras que en las frambuesas se mantiene adherido a la planta (Clark et al., 2007). La mora tiene la capacidad de adaptarse a distintas altitudes, suelos y variaciones climáticas, pero crece mejor en zonas moderadamente frías, es decir a una altitud entre 2200 a 3200 m.s.n.m. (Clark et al., 2007, INIAP, 2016).

2.2.1 Variedades

La mora de Castilla y Brazo son las más cultivadas en el Ecuador. A continuación, en la Tabla 1 se muestran las variedades de mora que se cultivan en el país (Delgado, 2012).

Tabla 1
Variedades de la mora en el Ecuador

Variedades	Características
<ul style="list-style-type: none"> • Mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth) 	<ul style="list-style-type: none"> • Es la más cultivada y de mayor importancia en el Ecuador, conocida también como mora negra, sus cultivos se encuentran en regiones comprendidas entre los 1200 a 3000 m.s.n.m.
<ul style="list-style-type: none"> • Mora variedad brazos (<i>Rubus</i> sp.) 	<ul style="list-style-type: none"> • Genetistas de Texas la desarrollaron en 1959, es la más productiva y adaptable. Esta variedad es apropiada para la exportación por su rusticidad.
<ul style="list-style-type: none"> • Mora negra (<i>Rubus bogotensis</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Posee frutos en racimos apretados y poco jugosos, es ideal para alturas entre 1700 a 3200 m.s.n.m.
<ul style="list-style-type: none"> • Mora de páramo o de gato (<i>Rubus giganteus</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Posee un receptáculo interno hueco y de granos grandes aproximadamente de 7 cm, esta variedad se cultiva en altitudes de 2600 a 3400 m.s.n.m.
<ul style="list-style-type: none"> • Mora pequeña (<i>Rubus magalococus</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • Crece a los 2700m.s.n.m, se caracteriza por tener frutos rústicos pequeños.

CONTINUA

-
- | | |
|--------------------------|---|
| • Mora grande | • Posee frutos grandes y se cultiva desde los 2600 a 3100 |
| <i>(Rubus nubigenus)</i> | m.s.n.m. |
-

Fuente: Modificado de Delgado (2012).

2.2.1 Clasificación taxonómica de la mora

La clasificación taxonómica de la mora según Natural Resources Conservation Service (1996) y Delgado (2012) es:

Reino: Plantae

Clase: Angiospermae

Subclase: Dicotyledoneae

Orden: Rosae

Familia: Rosaceae

Género: *Rubus*

Especie: *glaucus*

2.3 Importancia Económica

La aceptación de los cultivos de mora ha incrementado llegando a cubrir alrededor de 20 035 ha aproximadamente a nivel mundial (Strik et al., 2006). Debido a los bajos costos de producción, en comparación con la frambuesa roja, el desarrollo de nuevas especies sin espinas, con mejor sabor, mayor temporada de producción y niveles altos de antocianinas, razones para la expansión de este cultivo (Clark et al., 2007).

La producción de mora en Ecuador en los últimos años ha registrado una expansión constante, según datos del INEC (2000) se produce 10283 t de mora al año. Tungurahua es la segunda zona con mayor producción con 3673 ha, logrando un rendimiento de 5.45 t al año por hectárea. Se estima que la productividad de una planta de mora debe ser 5 kg durante un ciclo; sin embargo, los productores obtienen alrededor de 3 kg por planta debido a enfermedades en los cultivos e inadecuados manejo agronómico y control de plagas (Delgado, 2012).

2.4 Enfermedad del Pie negro

La enfermedad del pie negro es causada por diferentes especies del género *Cylindrocarpon* presente de forma común en el suelo, éstos hongos pueden sobrevivir largas temporadas en ausencia de hospederos, al desarrollar estructuras como las clamidosporas; pueden afectar a plantas herbáceas y leñosas, causando decaimiento y muerte en plantas jóvenes (Brayford, 1993). La información sobre el pie negro en mora es escasa. La enfermedad ha sido descrita ampliamente en otras especies, principalmente en uva, donde el primer reporte de la pudrición de la raíz negra en vid (*Vitis* sp.) fue descrita en Francia por Grasso (1984). Durante los últimos años, la incidencia de pie negro en vid ha aumentado significativamente, observándose con mayor frecuencia en plantas de vivero y parcelas jóvenes (Petit & Gubler, 2005). Otra especie en la que se ha descrito esta enfermedad es la fresa (*Fragaria x ananassa*) la cual pertenece a la misma familia de la mora.

Varios autores han informado sobre la enfermedad del pie negro en cultivos de fresa a principios de 1900, refiriéndose a ella como una enfermedad desconocida (Botha, 2002).

El primer estudio documentado de la enfermedad del pie negro en *R. glaucus* lo realizaron Cedeño y colaboradores (2004) Venezuela, en plantas de mora cultivadas en suelo inoculado (1.5% p/p) con granos de cebada colonizado por el hongo. Como resultado, el 60% de las plantas murió a los siete días y el resto a las dos semanas. Se identificó finalmente como el agente causal del pie negro a *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans*.

La incidencia de la enfermedad en *R. glaucus* puede depender de varios factores como las condiciones del cultivo, campos que han estado en producción durante mucho tiempo, así como suelos pobremente drenados y compactados debido al cultivo (Alaniz, 2008).

2.4.1 Síntomas del pie negro en mora

Las plantas afectadas por la pudrición presentan un retraso en el crecimiento, marchitez bajo estrés térmico, hojas cloróticas y sus raíces se tornan ennegrecidas con grietas transversales (Strong, 1931). Debido a los daños sufridos en las raíces y el cuello del tallo, algunas plantas no llegan a brotar o desarrollarse. La base del tronco aparece necrótica, las hojas son más pequeñas y consecuentemente presentan una pérdida de productividad (Scheck et al., 1998).

El exceso de agua produce un déficit de oxígeno en el suelo debilitando al sistema radicular de *R. glaucus*. Las plantas estresadas por transplante o poda son más susceptibles al desarrollo de la enfermedad (Figura 3) (Cedeño et al, 2004). Las plantas enfermas desarrollan nuevas raíces por encima de la zona afectada para compensar la masa radicular perdida, los vasos conductores pueden presentar inclusiones negras o goma de color marrón y es posible la presencia de hifas en células cercanas al floema y xilema (Alaniz, 2008).



Figura 3. Raíz de mora infectada con *C. destructans var destructans*.

Fuente: (Cedeño et al., 2004)

En las plantas de vid también se establecieron los síntomas de marchitez y pudrición causadas por *Cylindrocarpon*, se evidenciaron las infecciones en vides de vivero o más jóvenes donde se observaron rayas vasculares de color marrón oscuro, inclusiones de goma en los vasos del xilema (Grasso & Magnano Di San Lio, 1975), reducción de los pelos radiculares, decoloración y compactación de la médula de las vides (Scheck et al., 1998). Como consecuencia de la pudrición del tejido radicular, las raíces tienen apariencia de una “cola de rata” (Botha, 2002).

También las infecciones se pueden dar en vides de dos a 10 años al presentar crecimiento vegetativo reducido, decoloración marrón en la madera a nivel del suelo llegando a extenderse hasta 10 cm de las raíces y vasos del xilema tapados con una goma de color marrón (Halleen et al., 2006).

2.4.2 Taxonomía del agente causal

Estudios basados en el análisis de las secuencias de ADN ribosomal permitieron determinar que las especies de hongos del género *Nectria* ahora pertenecientes a la familia Nectriaceae y sus anamorfos *Cylindrocarpon* son monofiléticas (Rossman et al., 1999; Brayford et al., 2004). Booth (1996) identificó 27 especies de *Cylindrocarpon* clasificándolas en cuatro grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de clamidosporas y microconidias.

Chaverri y colaboradores (2011) mediante un análisis multilocus (*act*, ITS, LSU, *rpb1*, *tef1*, *tub*) describieron cinco nuevos géneros de *Neonectria*, los cuales se clasifican de acuerdo a la anatomía de los peritecios y la presencia de septos en los conidios. Entre los nuevos linajes se reveló por primera vez a *Ilyonectria* perteneciente al grupo *N. radicícola* cuyo anamorfo es *C. destructans*. También determinaron que *Neonectria/Cylindrocarpon* representan a más de un género.

2.4.2.1 Morfología

Las colonias de los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* pueden tener textura algodonosa o aspecto filamentososo, crecimiento moderado, forma irregular, con varios tonos de marrón a canela. Su temperatura de crecimiento varía de 20 a 25°C aproximadamente (Cabral et al., 2012). Las estructuras conocidas como conidióforos dan lugar a las macroconidias de 1 a 3 septos y microconidias de 0 a 1 septo. Existen otras estructuras globosas llamadas clamidosporas de color marrón oscuro (Lombard et al., 2013).



Figura 4. Identificación morfológica de *I. vredenhoekensis*. **a-b** conidióforos. **c-d** esporoquicio, **e** Microconidias. **g** clamidosporas. Barra=10 μ m.

Fuente: (modificado de Lombard et al., 2013)

2.5 Pruebas de patogenicidad

Para el diagnóstico de enfermedades en plantas es necesario la implementación de estrategias responsables para el manejo de agentes patógenos, este proceso se realiza mediante la identificación del agente causal de enfermedades y la posterior prueba de patogenicidad aplicando los postulados de Koch (Wingfield et al., 2012).

Las pruebas de patogenicidad se realizan al inocular plantas o parte del material vegetal sano con el microorganismo aislado de un hospedero enfermo, con el fin de corroborarlo o descartarlo como agente causal de la enfermedad (Ames, 1997).

2.5.1 Método de inculación

Para infectar las raíces de una planta sana con el agente causal de la enfermedad, se corta de forma transversal la raíz, facilitando el ingreso del microorganismo a través de los haces vasculares mediante la adición de un inóculo, removiendo momentáneamente el suelo; de este modo el hospedero absorbe al patógeno (French & Herbert, 1980).

2.6 Hipótesis

Especies del género *Ilyonectria* (*I. vredenhoekensis*, *I. robusta* e *I. venezuelensis*) son agentes causales del pie negro en moras de castilla.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Revisión Bibliográfica

Se investigaron las características de las plantas de mora de castilla afectadas con la enfermedad del pie negro, las particularidades de los hongos del género *Ilyonectria* asociados a la misma enfermedad, la metodología de inoculación del agente causal y las variables de evaluación de la enfermedad en el hospedero.

3.2 Reactivación de los aislados del género *Ilyonectria*

Se utilizaron hongos de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria* del cepario del Laboratorio de Microbiología de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE (Tabla 2), almacenados en tubos plásticos con 600 µl de PDB y 200 µl de glicerol al 20% a -80°C durante un año. Estos hongos fueron aislados a partir de raíces y tallos de mora de castilla (*R. glaucus*) procedentes de la provincia de Tungurahua, con lesiones necróticas de tonalidad café, asociadas a los síntomas de pie negro. Las cepas fueron guardadas como parte del proyecto de titulación de Iturralde (2017), “Estandarización de una metodología de inoculación de *Ilyonectria* sp., agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*)”. Los aislados activados pertenecen a las especies: *I. vredenhoekensis*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* y *D. torresensis*.

Tabla 2*Hongos reactivados del cepario del Laboratorio de Microbiología*

CÓDIGO DEL CEPARIO	ESPECIE	NOMENCLATURA
UFAH 00033	<i>Dactylonectria torresensis</i>	DT
UFAH 00034	<i>Ilyonectria vredenhoekensis</i>	M 1.2
UFAH 00041	<i>Ilyonectria venezuelensis</i>	M 8.2
UFAH 0042	<i>Ilyonectria robusta</i>	M 9.2

Para activar los aislados de *Ilyonectria* y *Dactylonectria*, se tomó una porción del hongo guardado en uno de los viales del cepario (Figura 6), con la ayuda de un asa micológica. Se colocó en una caja Petri con PDA y cloranfenicol (100 ppm). Se realizaron dos siembras de cada aislado y se incubaron a 25°C durante 20 días.



Figura 5. Cepario de hongos aislados por Iturralde (2017)

3.3 Extracción de ADN

Para la extracción del ADN, se cultivaron los hongos aislados en medio líquido PDB (Caldo papa dextrosa) durante dos semanas a 25 °C. Posteriormente se filtró el medio a través de una gasa, se tomó la biomasa con ayuda de una pinza y se colocó el micelio en tubos de 2 mL. Se utilizó un protocolo modificado de Weising y colaboradores (2005), donde se maceró las muestras con 500 µL del buffer de extracción (Tabla 3) con ayuda de un micropistilo. Posteriormente se añadió 500 µL de cloroformo: isoamilalcohol (24:1) y se invirtieron ligeramente los tubos para homogenizar. Se incubaron las muestras a 55°C por 30 min, invirtiendo los tubos manualmente cada 10 min, y se los dejó enfriar a temperatura ambiente por cinco minutos. Después se centrifugaron a 14000 rpm durante 10 min. Se transfirió el sobrenadante sin topar la interfase a un nuevo tubo estéril de 2 mL. A continuación se añadió de 1 a 1.5 veces del volumen de sobrenadante de isopropanol frío y se dejó a -20°C entre cinco minutos a dos horas, para que precipiten los ácidos nucleicos. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron los tubos por tres minutos a 14000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* de ADN se lavó con etanol al 70%, se repitió el lavado dos veces. Se secó el *pellet* durante 25 min dentro de la cámara de flujo laminar para después resuspenderlo en 50 µL de agua ultrapura con 2 µL de RNAsa (10mg/mL); posteriormente los tubos fueron incubados en un termobloque a 37°C durante 30 min. Con ayuda del nanodrop se determinó la concentración de ADN y se ajustó a una concentración de 40 ng/ µL para usarlo en reacciones de PCR.

Tabla 3*Componentes del tampón de extracción*

Reactivo	Concentración final	Cantidad para 500 mL	Cantidad para 250 mL
Sorbitol	140 mM	12.75 g	6.375 g
Tris HCl pH=8	220 mM	13.32 g	6.66 g
EDTA	22 mM	3.21 g	1.60 g
NaCl	800 mM	23.376 g	11.688 g
CTAB	0,8 % (w/v)	4 g	2 g
Sarkosyl	1%	5 g	2.5 g
B- mercaptoetanol	0.2 % (w/v)	1 mL	500 µL

- Agregar el mercaptoetanol justo antes de usar, en una alícuota de acuerdo al número de muestras.

3.4 Amplificación de ADN de los aislados de *Ilyonectria*

Para la amplificación se utilizaron los primers ITS 4 e ITS 5 (Tabla 5), que amplifican una región de 550 pares de bases. Para cada reacción se utilizó 8,5 µL de agua de PCR, 1 µL de primer Forward [5µM], 1 µL del primer Reverse [5µM], 12.5 µL de la enzima Green GoTaq Mix (Thermo Scientific) y 2 µL de ADN. Las condiciones de PCR se detallan a continuación en la Tabla 4 (Martínez, 2014).

Tabla 4*Programa de PCR para los primers ITS 4 e ITS 5*

TEMPERATURA	TIEMPO	NÚMERO DE CICLOS
94°C	5 minutos	1
95°C	30 segundos	
58°C	30 segundos	35
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	1
4°C	5 minutos	1

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% preparado con 40 mL del tampón TAE 1X y 2 µL de bromuro de etidio, posteriormente se aplicó 100 voltios durante 30 minutos. Se empleó el marcador de peso molecular *GeneRuler 100 bp* (Thermo Scientific). Los amplicones de interés se enviaron para secuenciación en la empresa Macrogen, Inc.

Tabla 5*Secuencias de los primers ITS4 e ITS5*

Primers	Secuencias	Amplicón	Gen o Región	Referencia
ITS 4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	550 pb	Región 5,8S-ITS	(White et al., 1990) <i>CONTINÚA</i>

ITS 5	5´-	550pb	Región	(White et al.,
	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-		5,8S-	1990)
	3´		ITS	

3.5 Inoculación de los aislados del género *Ilyonectria* en moras de castilla

3.5.1 Inoculación con conidias

Para obtener el inóculo, a un cultivo de *Ilyonectria* de 20 días en PDA se añadió 10 mL de agua destilada estéril (ADE) y, con ayuda de un portaobjetos estéril, se raspó la superficie del cultivo. Se filtró la suspensión de conidios en una gasa estéril y posteriormente se ajustó a una concentración de 1×10^6 conidios/mL con ayuda de la cámara de Neubauer. Para la inoculación en las plantas de mora de castilla de cinco meses de edad, las raíces fueron lavadas en agua corriente para retirar impurezas, inmediatamente se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante dos minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril (ADE) tres veces. Se cortó 2 cm de la zona terminal de las raíces de cada planta, a continuación se sumergieron las raíces en la suspensión de conidias durante 30 minutos y se trasplantaron en un sustrato pasteurizado. Transcurridos 15 días desde la inoculación, se regó las plantas con 50 ml de una solución 1×10^6 conidios/mL (Alaniz, 2008).

3.5.1.1 Control negativo

Las raíces de las plantas de mora de castilla utilizadas como control se sumergieron en agua destilada estéril y posteriormente fueron colocadas en el sustrato pasteurizado.

3.5.1.2 Control positivo

Las plantas de mora de castilla usadas para el control positivo fueron sumergidas en una solución de conidios del hongo *Dactylonectria torresensis* a una concentración de 1×10^6 conidias/mL y finalmente colocadas en el sustrato.

3.5.1.3 Tratamientos

Se realizaron cinco tratamientos (Tabla 6) con siete repeticiones de cada uno.

Tabla 6

Descripción de los tratamientos a nivel de invernadero

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T1	Control negativo
T2	Control positivo, inoculación con <i>Dactylonectria torresensis</i>
T3	Inoculación con <i>Ilyonectria robusta</i>
T4	Inoculación con <i>Ilyonectria venezuelensis</i> CONTINUA

3.6 Identificación morfológica de los aislados

3.6.1 Caracterización macroscópica y microscópica

Para la caracterización microscópica de cada uno de los aislados se prepararon cámaras húmedas utilizando cajas Petri con papel filtro estériles y palillos de dientes como soporte para el porta objetos; en cada una de las cámaras húmedas se colocó 4 ml de ADE para generar humedad en la caja Petri; en el centro del cubreobjetos se ubicó un trozo de PDA sin inocular de 3 x 2 mm aproximadamente y junto a este trozo se puso una porción de PDA con el hongo puro, finalmente se colocó un cubre objetos, se selló la caja con parafilm y se incubó durante un periodo de 5-7 días a 25 °C. Transcurrido ese tiempo, se tomó el cubreobjetos y se preparó una placa con una gota de azul de lactofenol para las mediciones así como con ácido láctico para las fotografías.

Se tomaron fotografías con ayuda de un microscopio óptico Olympus DP73, del laboratorio de Fitopatología de Agrocalidad. Adicionalmente se realizaron 30 mediciones de las macroconidias con el software *cellSens Standar* con uno a tres septos así como microconidias con y sin septo de cada uno de los aislados.

3.7 Evaluación de la capacidad infectiva de los aislados

Las plantas de mora de castilla de invernadero inoculadas con la solución 1×10^6 conidias/mL se valoraron luego de cuatro meses posteriores a su inoculación. Las variables tomadas en cuenta fueron la marchitez de las hojas basales y la severidad de infección en el cuello de la raíz.

3.7.1 Marchitez de hojas basales

Para determinar la capacidad infectiva de cada uno de los aislados en las plantas de mora de castilla, se aplicó la escala sugerida por Oña (2018) y Alaniz (2008) que consta de cinco grados para evaluar el grado de marchitez en las hojas basales (Tabla 7).

Tabla 7

Escala de medición para el porcentaje de marchitez en las hojas basales

GRADO	DESCRIPCIÓN DEL DAÑO
0	No presentan síntomas.
1	Las hojas basales presentan del 1-25% de marchitez, una clorosis leve y no presenta pérdida de turgencia.
2	La marchitez es visible en un 26-50%. En las hojas la decoloración avanza desde los bordes hacia la nervadura central, presenta pérdida de turgencia y coloración marrón.

CONTINUA

3	Los síntomas de marchitez del 51-75%. Los bordes de las hojas empiezan a enrollarse y pierden totalmente la turgencia.
4	Si los síntomas de marchitez son >75%. Las hojas presentan una decoloración total, tienden a desprenderse y secarse.

Fuente: Modificado de Oña (2018) y Alaniz (2008).

3.7.2 Porcentaje de infección en el cuello de la raíz

Para evaluar la capacidad infectiva de los aislados en las plantas de mora de castilla a nivel del cuello de la raíz, Oña (2018) y Alaniz (2008) establecen una escala de cinco grados como se describe a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8

Escala de medición del porcentaje de infección en el cuello de la raíz

GRADO	DESCRIPCIÓN DEL DAÑO
0	El cuello de la raíz no muestra necrosis en los haces vasculares y presenta una coloración blanca–crema.
1	Los haces vasculares presentan del 1-25 % de necrosis con una coloración violeta en los bordes de la raíz.
2	Se observa necrosis en los haces vasculares en un 26-50 %. La necrosis avanza hacia el centro de los haces vasculares, siendo visible una coloración violeta.
3	Los síntomas de necrosis en los haces vasculares va desde el 51 – 75%, cubriendo hasta las $\frac{3}{4}$ partes del cuello de la raíz.

CONTINUA

4 Los haces Vasculares están completamente necrosados.

Fuente: Modificado de Oña (2018) y Alaniz (2008).

3.8 Reaislamiento de los hongos *Ilyonectria* y *Dactylonectria* desde las raíces de mora de castilla

Para aislar los hongos de interés desde las raíces de las plantas de mora de castilla se retiraron las impurezas y restos del suelo lavando las raíces con agua corriente, a continuación se cortó el cuello de la raíz con ayuda de un bisturí estéril, posteriormente se tomaron trozos de tejido de 2 a 3 mm con y sin signos de necrosis. Inmediatamente se añadió hipoclorito de sodio al 1.5 % durante 2 min para esterilizar la superficie. A continuación, se enjuagó tres veces con agua destilada estéril para finalmente sembrar los trozos de tejido en PDA. Se incubaron en la oscuridad durante ocho días a 25 °C.

3.9 Análisis filogenético

Las secuencias forward y reverse de los amplicones de la región ITS se ensamblaron utilizando la herramienta bioinformática Geneious v11.1.5 (Biomatters Ltd.) y se realizó una búsqueda de homólogos en Blast (Altschul et al., 1990). Se utilizaron las secuencias del HIS3 y TEF obtenidos por Iturralde (2017) y los taxones representativos de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria* descargados de la base de datos GenBank del NCBI. Como grupo externo se utilizaron dos taxones del género *Campylocarpon*. El alineamiento múltiple se realizó mediante el servidor en línea TCOFFEE (Center for genomic regulation).

Se realizó el análisis filogenético de los hongos *Dactylonectria* e *Ilyonectria* mediante el método bayesiano y de máxima verosimilitud. Se analizó el conjunto de datos en MEGA 7 v7.0 (Kumar et al., 2016) para la obtención del mejor modelo de sustitución.

El árbol bayesiano se construyó usando BEAST 1.8.4 (Drummond et al., 2012) con dos millones de MCMC tomando muestras cada 1000 generaciones. Posteriormente en TreeAnnotator v1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007) se obtuvo el árbol de Máxima Credibilidad de Clado (MCC) y finalmente fue examinado por FigTree v1.4.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) Para el análisis de máxima verosimilitud (ML) se utilizó RAxML (Stamatakis, 2014) en CIPRES Science Gateway.

3.10 Análisis estadístico

El ensayo a nivel de invernadero se realizó mediante un diseño completamente al azar con siete repeticiones por tratamiento. Se evaluó la normalidad de los datos y se aplicó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con nivel de significancia del 0.05 en el software estadístico *OriginPro8*.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Caracterización morfológica de los aislados

Después de 30 días de incubación a 25°C, el crecimiento del hongo cubrió por completo la caja Petri con PDA. Mediante la tinción con ácido láctico y azul de lactofenol se determinó las características microscópicas de cada uno de los aislados, en donde se observó estructuras como microconidias, macroconidias, hifas y clamidosporas.

4.1.1 *Dactylonectria torresensis*

4.1.1.1 Descripción macroscópica

Dactylonectria torresensis presentó un micelio algodonoso e irregular con una densidad media. En el centro fue de color crema y hacia los bordes marrón (Figura 7A). En el reverso mostró un tono pardo oscuro a marrón (Figura 7B).

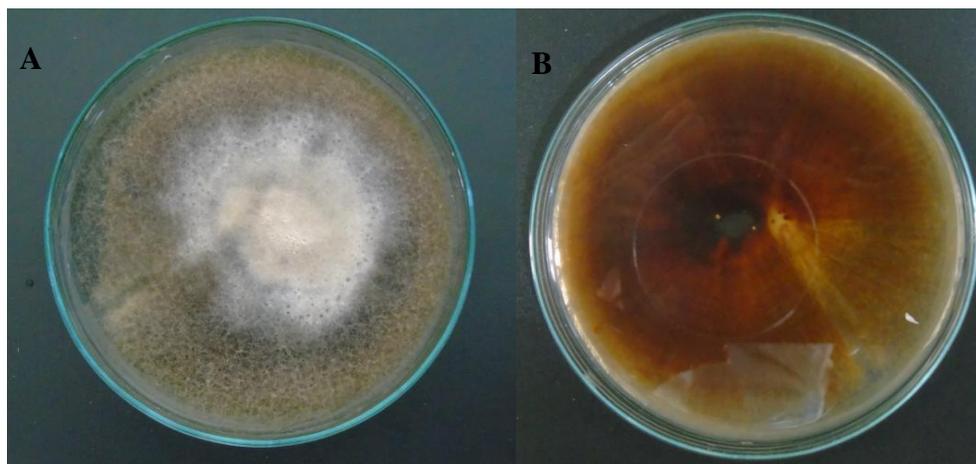


Figura 6. *Dactylonectria Torresensis* en PDA de 30 días de crecimiento.
 (A) Anverso, las hifas del centro presentan una coloración crema.
 (B) Reverso del cultivo.

4.1.1.2 Descripción microscópica

Dactylonectria torresensis presentó conidióforos simples poco ramificados con un máximo de tres fiálides ligeramente cilíndricos que se estrechan en la parte superior (Figura 9). Prevalcieron las macroconidias ligeramente alargadas con extremos redondeados (Figura 8). Macroconidias de un septo (20.73) 25.40 – 29.28 – 33.15 (36.79) x (3.48) 3.82 – 4.24 – 4.66 (5.06) μm ; Macroconidias de dos septos (25.20) 26.43– 29.94 –33.45 (37.72) x (3.0) 3.38 – 3.92–4.45 (5.03) μm ; Macroconidias de tres septos (30.06) 33.08 – 37.13– 41.17 (46.16) x (3.56) 3.96 – 4.44 – 4.92 (5.86) μm . Las microconidias sin septo fueron de forma ovoide con una relación largo/ancho de (8.39) 9.68 – 11.18 – 12.67 (13.96) x (2.70) 3.20 – 3.65 – 4.09 (4.60) μm ; Microconidias de un septo con forma elipsoidal (11.19) 12.96 – 15.61 – 18.26 (20.70) x (3.25) 3.71 – 4.40 – 5.10 (6.02) μm .

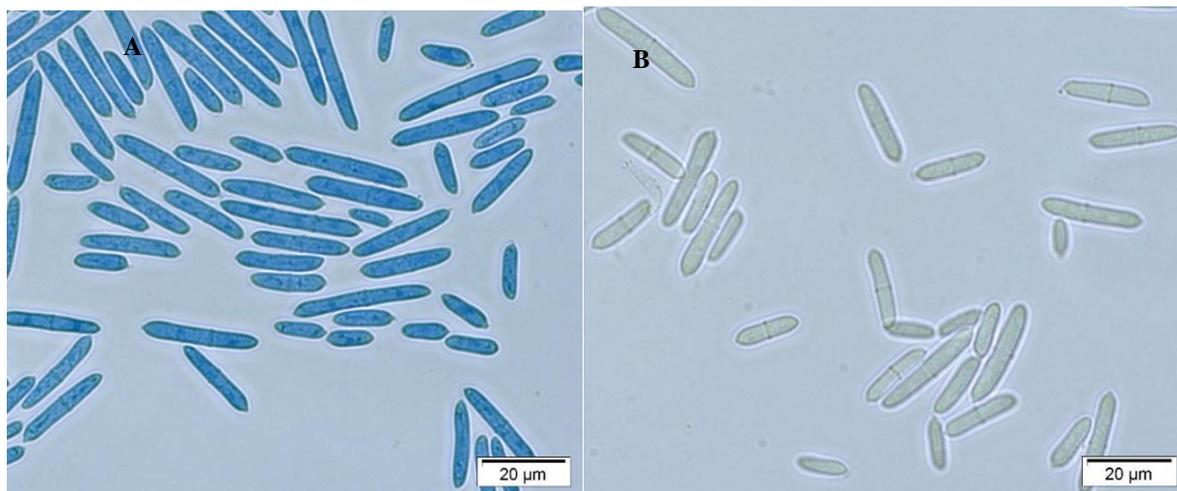


Figura 7. Macro y microconidias de *Dactylonectria torresensis* con azul de lactofenol (A). Macro y microconidias con ácido láctico (B). Lente 40X, barra de 20 µm.

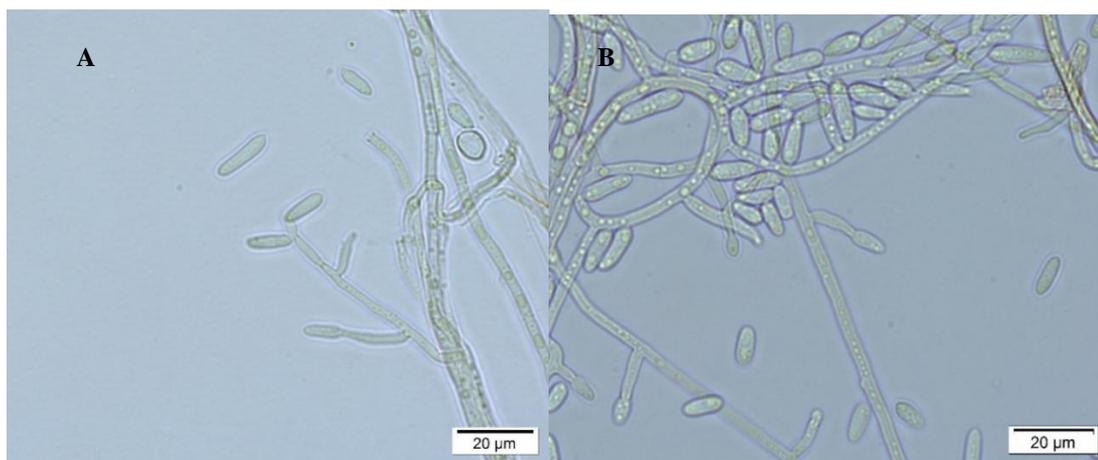


Figura 8. *Dactylonectria torresensis* con ácido láctico. (A, B). Conidióforos simples y poco ramificados, micro y macroconidias. Barra de 20 µm. Lente 40X.

4.1.2 *Ilyonectria robusta*

4.1.2.1 Descripción Macroscópica

El crecimiento del micelio de *Ilyonectria robusta* fue aéreo y disperso, con anillos de color marrón, textura filamentosa de densidad media (Figura 10A). En el reverso presentó anillos irregulares combinados de color marrón claro y oscuro (Figura 10B).

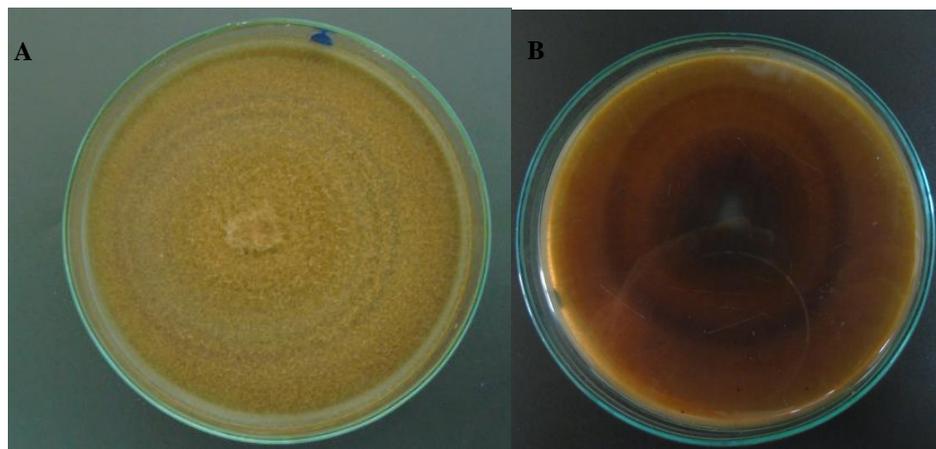


Figura 9. *Ilyonectria robusta* en PDA a 25°C de 30 días de crecimiento. (A) Anverso, crecimiento radial de las hifas desde el centro del cultivo. (B) Reverso del cultivo.

4.1.2.2 Descripción Microscópica

Ilyonectria robusta presentó conidióforos simples que surgieron del extremo del micelio aéreo, puede tener hasta tres fiálides cilíndricas ligeramente alargadas y estrechas en la parte superior (Figura 12A). Se observaron macroconidias de uno a tres septos con forma cilíndrica y extremos redondeados (Figura 11). Macroconidias de un septo (22.70) 25.09 – 28.36 – 31.63 (34.76) x (4.17) 4.99 – 6.12 – 7.25 (8.15) μm ; Macroconidias de dos septos (25.61) 28.25 – 31.11 – 33.97 (37.86) x (4.78) 5.43 – 6.10 – 6.76 (7.21) μm ; Macroconidias de tres septos (30.78) 33.71 – 37.26 – 40.82 (43.36) x (4.45) 5.28 – 6.12 – 6.96 (8.01) μm . Microconidias sin septo de forma ovoide (6.28) 8.14 – 10.02 – 11.89 (13.87) x (2.51) 2.87 – 3.35 – 3.82 (4.20) μm ; Microconidias

elipsoidales de un septo (7.13) 10.95 – 13.80 – 16.64 (17.90) x (2.90) 3.27 – 3.87 – 4.47 (4.96) μm . Clamidosporas globosas de pared gruesa y un tono marrón (Figura 12B).

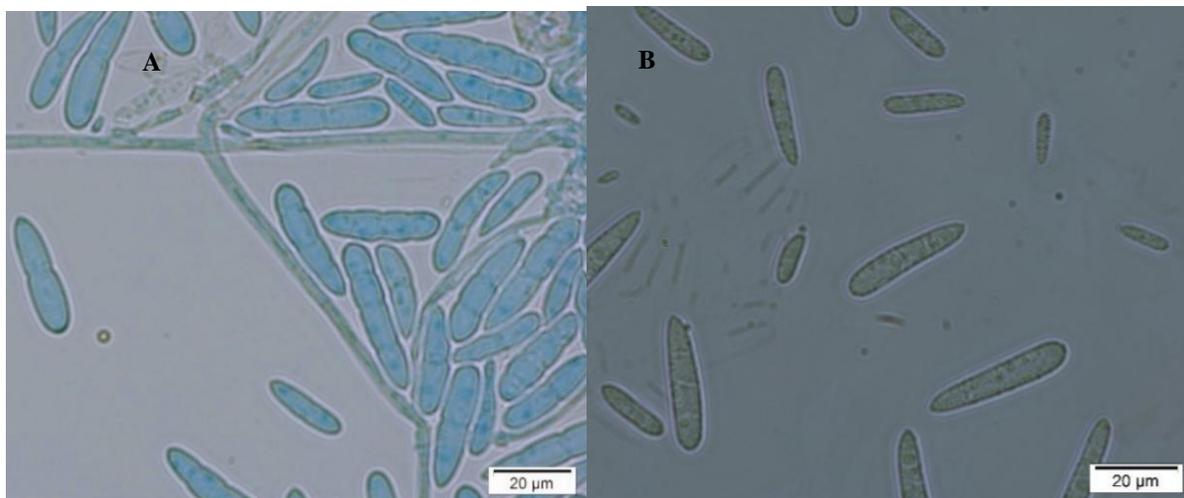


Figura 10. *Ilyonectria robusta*. (A) Macro y microconidias con azul de lactofenol. (B) Macro y microconidias con ácido láctico. Lente 40X, barra de 20 μm .

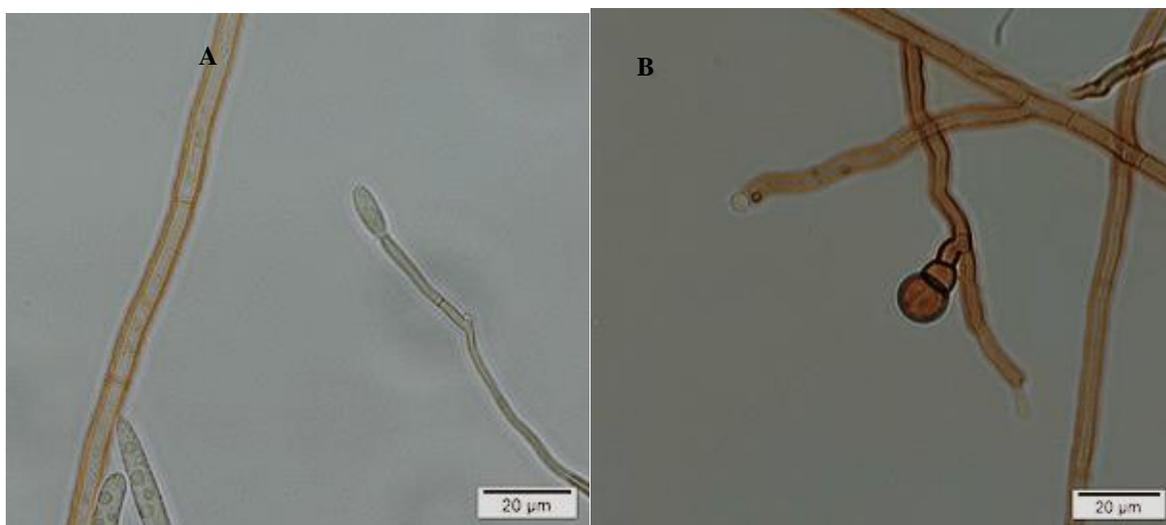


Figura 11. *Ilyonectria robusta*. (A) Conidióforo simple y poco ramificado, hifas. (B) Clamidosporas en micelio. Lente 40X, barra de 20 μm .

4.1.3 *Ilyonectria vredenhoekensis*

4.1.3.1 Descripción macroscópica

La colonia de *Ilyonectria vredenhoekensis* presentó un crecimiento ramificado irregular, textura algodonosa de color pardo oscuro y pequeñas agrupaciones lanosas de tono crema en uno de los extremos (Figura 13A). En el reverso las ramificaciones fueron marrón oscuro y en el extremo pardo (Figura 13B).

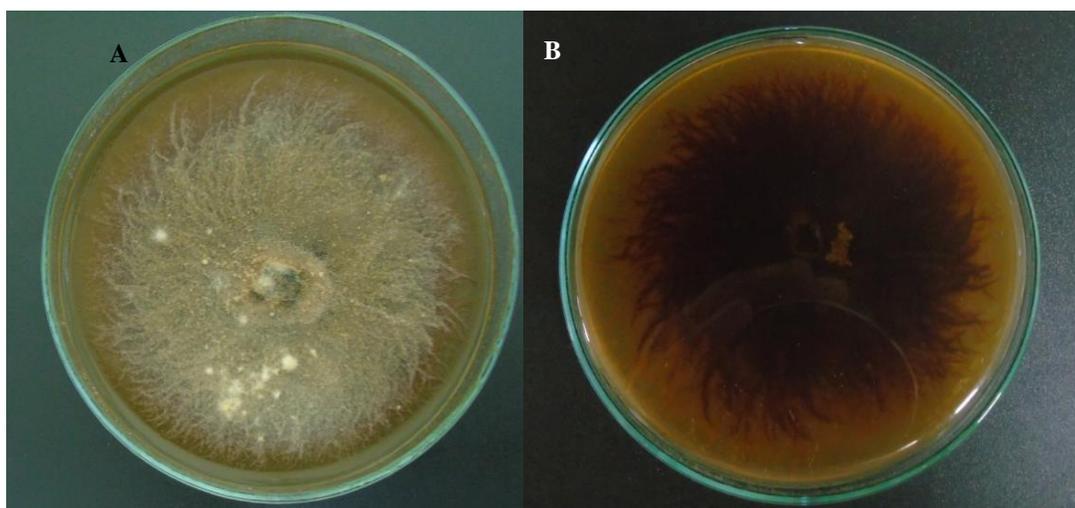


Figura 12. *Ilyonectria vredenhoekensis* en PDA a 25°C de 30 días de crecimiento. (A) Anverso, crecimiento ramificado de las hifas. (B) Reverso del cultivo.

4.1.3.2 Descripción microscópica

Ilyonectria vredenhoekensis presentó conidióforos que surgen desde el micelio aéreo, no ramificados o poco ramificados con hasta tres fiálides (Figura 15 A). Predominaron las macroconidias de uno a tres septos rectos, de forma cilíndrica con extremos redondeados (Figura

14). Las macroconidias de un septo (22.54) 26.26 -23.81 -28.80 (32.08) x (4.07) 4.41 – 5.02 – 5.63 (6.70) μm ; macroconidias dos septos (24.44) 26.41 – 28.10 29.78 (30.94) μm ; macroconidias de tres septos (30.26) 31.70 – 33.90 – 36.10 x (5.16) 5.48 – 5.96 – 6.44 (7.16) μm . Las microconidias sin septo fueron ovaladas de forma globosa a fusiforme (3.75) 5.34 – 6.79 – 8.25 (9.62) μm ; microconidias de un septo con forma elipsoidal a ovoide (12.50) 13.83 – 16.06 – 18.29 (19.70) x (3.25) 3.70 – 4.40 – 5.09 (6.02) μm . Las microconidias se formaron en los extremos de los conidióforos, también fue posible observar clamidosporas de forma globosa de pared gruesa con un tono marrón (Figura 15B).

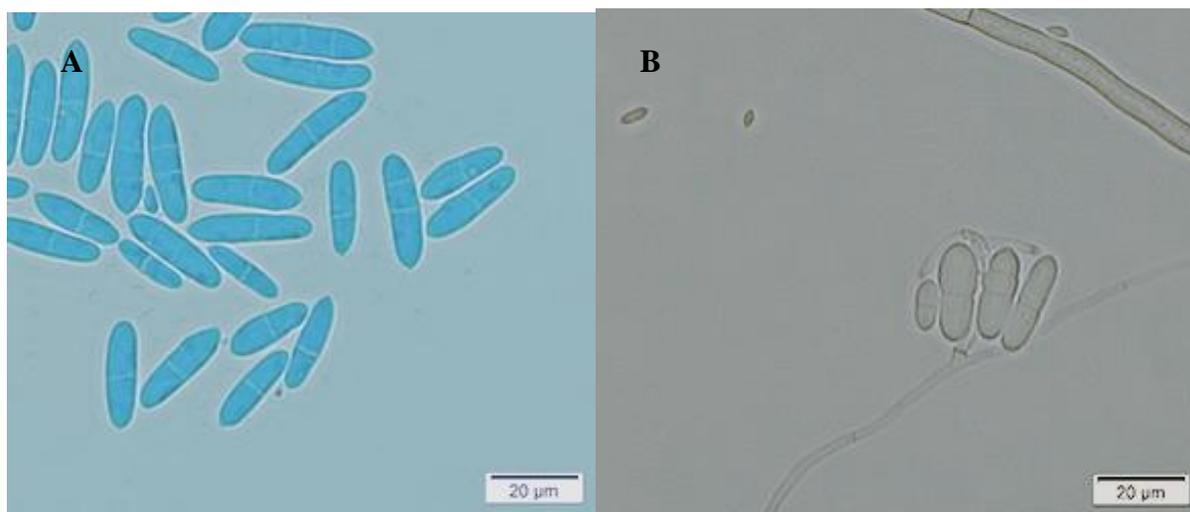


Figura 13. *Ilyonectria vredenhoekensis*. (A) Macro y microconidias en azul de lactofenol. (B) Macro y microconidias en ácido láctico Lente 40X, barra de 20 μm .

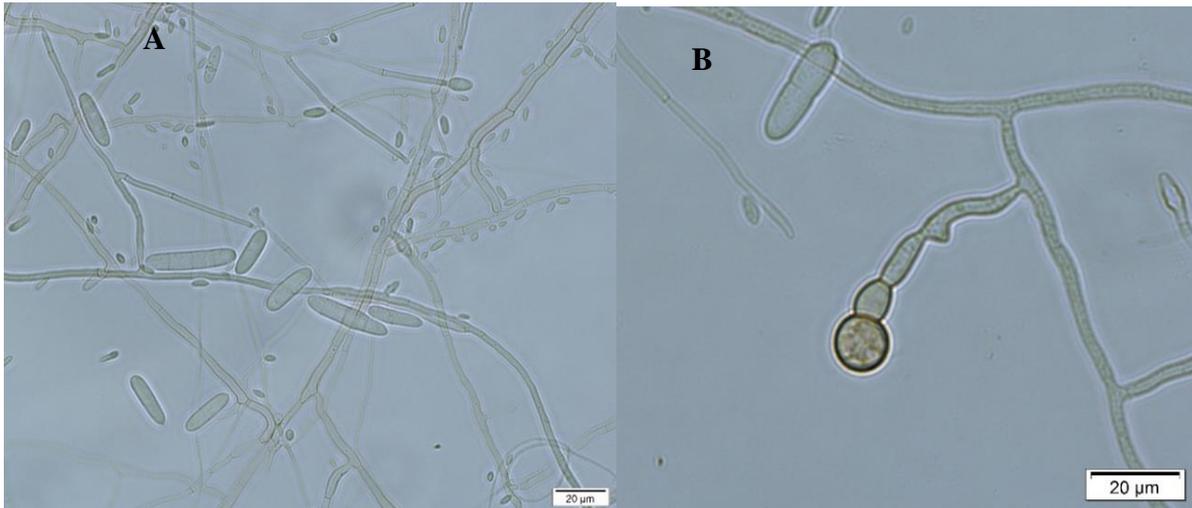


Figura 14. *Ilyonectria vredenhoekensis*. (A) Conidióforo simple y poco ramificado, macroconidias. (B) Clamidosporas en micelio. Lente 40X, barra de 20 µm.

Ilyonectria venezuelensis

4.1.4.1 Descripción macroscópica

El crecimiento de *Ilyonectria venezuelensis* fue irregular con estrías en el centro, textura algodonosa de densidad media, en el centro de color marrón y en los extremos de un tono amarillento (Figura 16A). En el reverso mostraron un tono pardo oscuro desde el centro que se va degradando hasta llegar a un tono amarillento (Figura 16B).

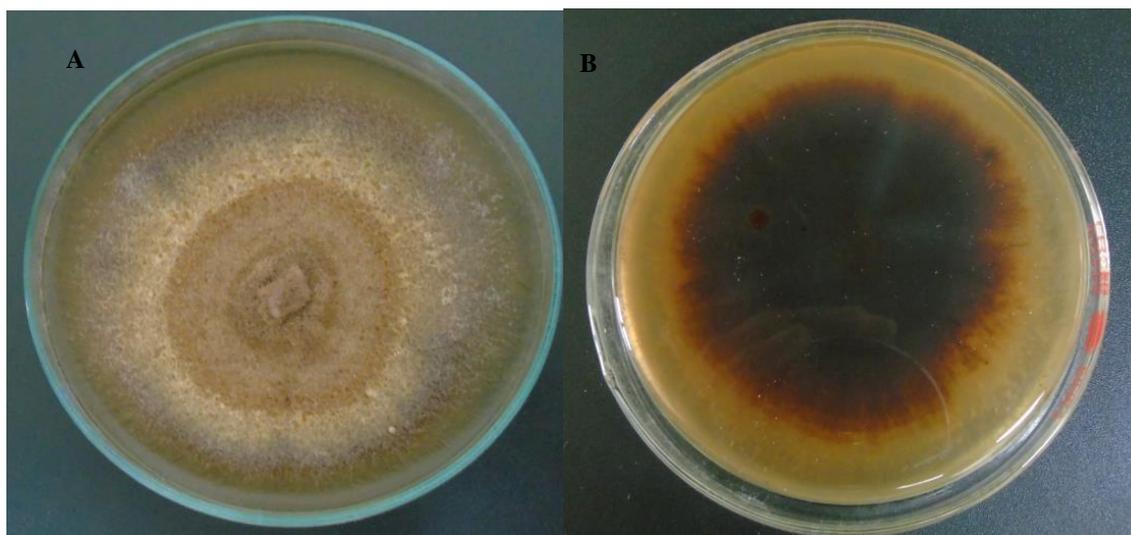


Figura 15. *Ilyonectria venezuelensis* en PDA a 25°C de 30 días de crecimiento. (A) Anverso, crecimiento flocoso de las hifas. (B) Reverso del cultivo.

4.2.4.2 Descripción microscópica

Ilyonectria venezuelensis presentó conidióforos simples o complejos con hasta tres fiálides ligeramente alargadas (Figura 18), predominan las macroconidias de uno a tres septos cilíndricas con extremos redondeados (Figura 17). Macroconidias de un septo (22.05) 23.21 – 24.86 – 26.52 (28.62) x (3.72) 4.34 – 4.73 – 5.12 (5.43) μm ; Macroconidias de dos septos (26.55) 27.15 – 30.58 – 34.0 (38.38) x (4.81) 5.05 – 5.48 – 5.90 (6.39) μm ; Macroconidias de tres septos (30.57) 31.93 – 34.02 – 36.11 (39.26) x (4.92) 5.33 – 5.84 – 6.35 (7.62) μm . Microconidias 0- 1 septo, elipsoidales u ovoides; Microconidias sin septo (6.21) 7.80 – 8.87 – 9.94 (11.02) x (1.88) 2.17 – 2.61 – 3.04 (3.73) μm ; Microconidias de un septo (12.10) 12.59 – 14.33 – 16.07 (19.88) μm .

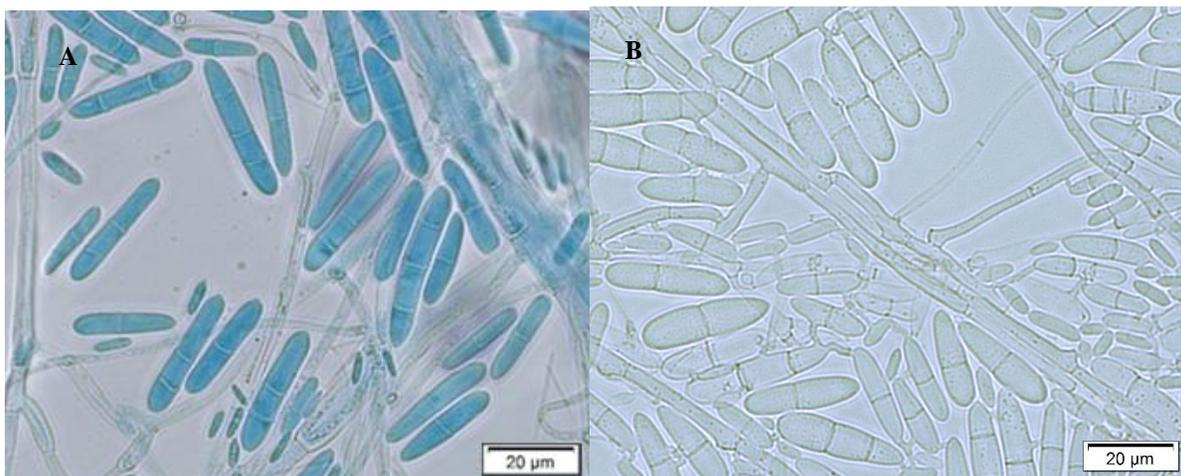


Figura 16. *Ilyonectria venezuelensis*. (A) Macro y microconidias en azul de lactofenol. (B) Macro y microconidias en ácido láctico Lente 40X, barra de 20 µm.

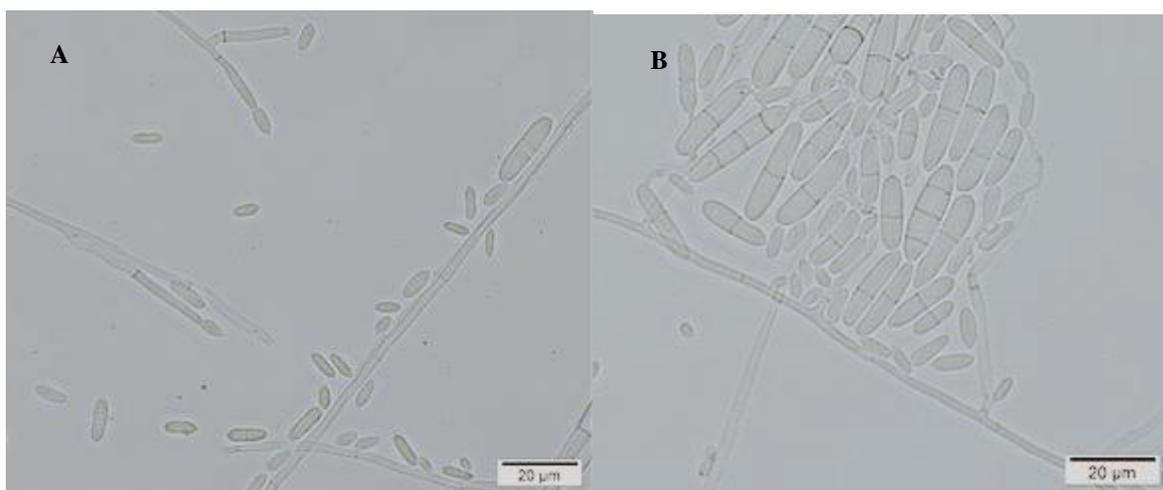


Figura 17. *Ilyonectria venezuelensis*. (A, B) macro y microconidias. Lente 40X, barra de 20 µm.

4.2 Identificación molecular

Los productos de amplificación obtenidos con los primers ITS 4 e ITS 5 dieron un amplicón de 550pb aproximadamente en todos los aislados (Figura 19)

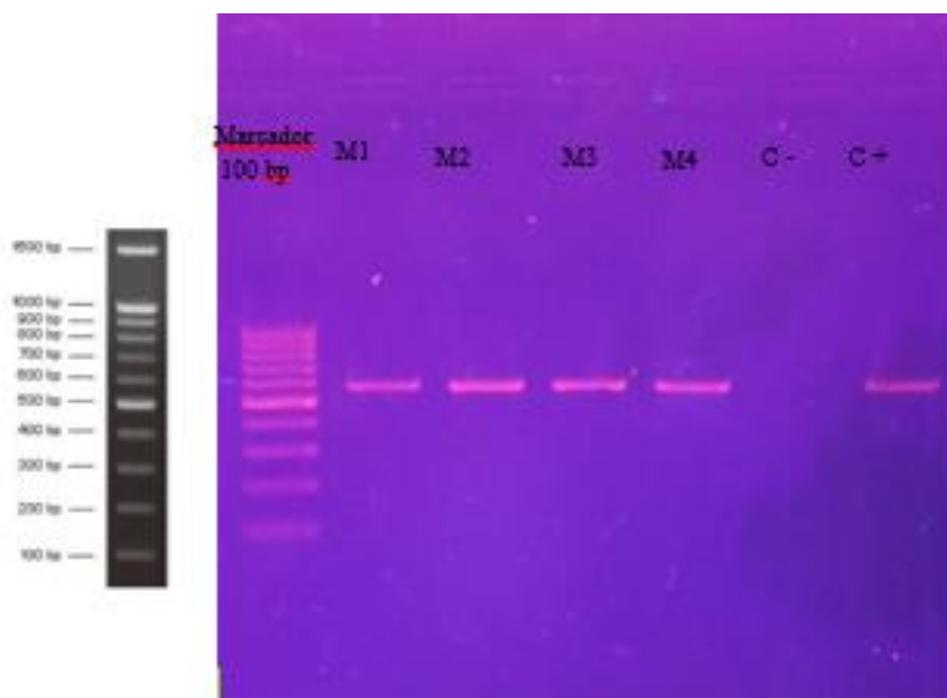


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con los primers ITS 4 e ITS 5 *I. vredenhoekensis* (M1), *I. venezuelensis* (M2), *I. robusta* (M3), *D. torresensis* (M4), control negativo (C-), control positivo (C+) y Marcador de peso molecular de 100 bp.

Posteriormente a la secuenciación de los cuatro amplicones de interés, se confirmó las especies de las muestras M1 como *I. vredenhoekensis*, la muestra M3 como *I. robusta* (M3), la muestra M4 como *D. torresensis*. Con los primers ITS 4 e ITS 5 no fue posible identificar la muestra M2 como *I. venezuelensis* si no tan solo como un aislado del género *Ilyonectria*, puesto que no hay secuencias de ITS disponibles en la base de datos.

Tabla 9*Resultados de la secuenciación y búsqueda de homólogos*

Género	Query cover	Ident	Número de accesión
<i>I. vredenhoekensis</i>	88%	99.59%	MK429846.1
<i>I. venezuelensis</i>	-	-	-
<i>I. robusta</i>	100%	99.63	MK459418.1
<i>D. torresensis</i>	99%	99.08%	KR019360.1

4.4.1 Marchitez en hojas basales

Se analizaron los signos de marchitez a nivel aéreo después de cuatro meses de su inoculación. En el transcurso del ensayo tres plantas murieron posterior a la inoculación.

4.4.1.2 Análisis estadístico

Los datos no siguen una distribución normal, por lo tanto mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (KW) al 5% (Figura 20) se estableció que las muestras provienen de diferentes poblaciones así como el porcentaje de infección en las hojas basales presenta diferencias significativas en cada tratamiento.

Test Statistics

	Chi-Square	DF	Prob>Chi-Square
% Infección	20,77999	4	3,50111E-4

Null Hypothesis: The samples come from the same population
 Alternative Hypothesis: The samples come from different populations
 % Infección: At the 0.05 level, the populations are significantly different

Figura 19. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia al 0.05 para el porcentaje de marchitez en las hojas basales.

Mediante el software estadístico *Infostat* se graficó el porcentaje de marchitez en las hojas basales (Figura 21). En el tratamiento control T1 (Figura 22) no se observó porcentaje de infección, los tratamientos T2 (Figura 23), T3 y T4 (Figura 24) presentaron porcentajes del 28.14%, 27.43% y 22% respectivamente, mientras que en el tratamiento T5 (Figura 25) se determinó un 42.57% de infección a nivel de las hojas basales en *R. glaucus*.

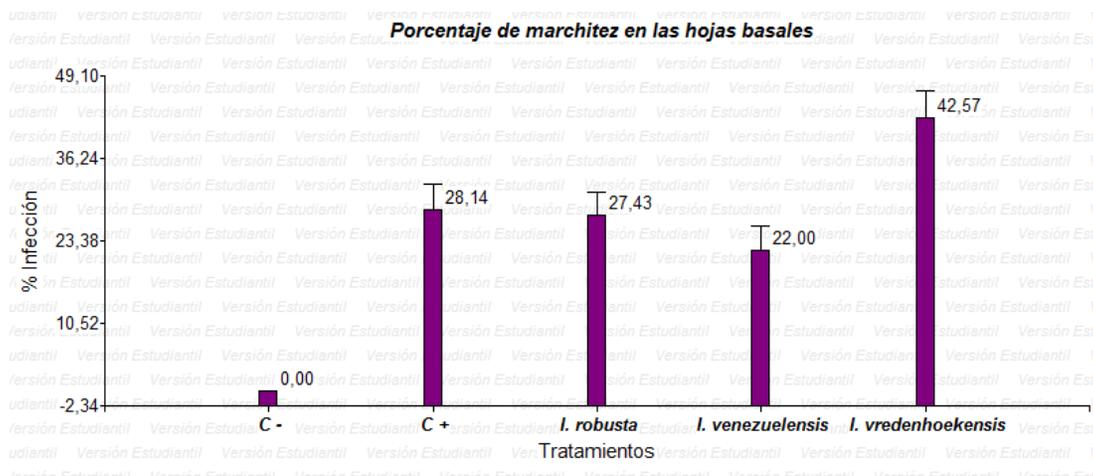


Figura 20. Porcentaje de marchitez en las hojas basales entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero. T1 (Control negativo). T2 (*D. torresensis*). T3 (*I. robusta*). T4 (*I. venezuelensis*). T5 (*I. vredenhoekensis*).



Figura 21. Síntomas aéreos en mora de castilla después de cuatro meses de su inoculación. (A) T1 (control negativo). (B) T5 inoculado con *I. vredenhoekensis*.



Figura 22. Evaluación de los síntomas aéreos después de cuatro meses de la inoculación. (A) T1 no presenta síntomas de marchitez. (B) T2 control positivo (*D. torresensis*), presenta síntomas leves de marchitez.



Figura 23. Evaluación de los síntomas aéreos en *R. glaucus* transcurrido cuatro meses. (A) T3 (*I. robusta*), presencia leve de síntomas de marchitez en las hojas basales. (B) T4 (*I. venezuelensis*) síntomas leves de marchitez.



Figura 24. (A-B) T5 (*I. vredenhoekensis*) Presencia de síntomas notables en *R. glaucus* de machitez, es evidente clorosis en las hojas.

4.4.2 Severidad de la infección en el cuello de la raíz

Se observaron lesiones necróticas de tono violeta en el cuello de la raíz (Figura 26). En el tratamiento 1 (control negativo) no se evidenciaron lesiones, el tejido presentó un tono crema a blanco, mientras que en los tratamientos, T2 (*D. torresensis*), T3 (*I. robusta*), T4 (*I. venezuelensis*) y T5 (*I. vredenhoekensis*) si fueron visibles los signos de necrosis.



Figura 25. Tejido procedente del cuello de las raíces de mora de castilla, cuatro meses posteriores a su inoculación con una solución de esporas a una concentración 1×10^6 .

(A) T1 (Control negativo). (B) T2 (*D. torresensis*). (C) T3 (*I. robusta*).
(D) T4 (*I. venezuelensis*) (E) T5 (*I. vredenhoekensis*).

4.4.2.1 Análisis estadístico

Según el análisis estadístico (Figura 27) se estableció que las muestras provienen de diferentes poblaciones y el porcentaje de infección en el cuello de la raíz es estadísticamente significativo en cada tratamiento.

Test Statistics

	Chi-Square	DF	Prob>Chi-Square
% Infección	22,4724	4	1,61371E-4

Null Hypothesis: The samples come from the same population
 Alternative Hypothesis: The samples come from different populations
 % Infección: At the 0.05 level, the populations are significantly different

Figura 26. Prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis con un nivel de significancia al 0.05 para el porcentaje de infección en el cuello de la raíz.

En el tratamiento T1 no se observa porcentaje de infección, los tratamientos T2, T3 y T4 presentan valores de 40.71%, 35.14% y 38.24% respectivamente, mientras que el tratamiento T5 muestra un porcentaje de 70.43% es decir mayor a los otros tratamientos (Figura 28).

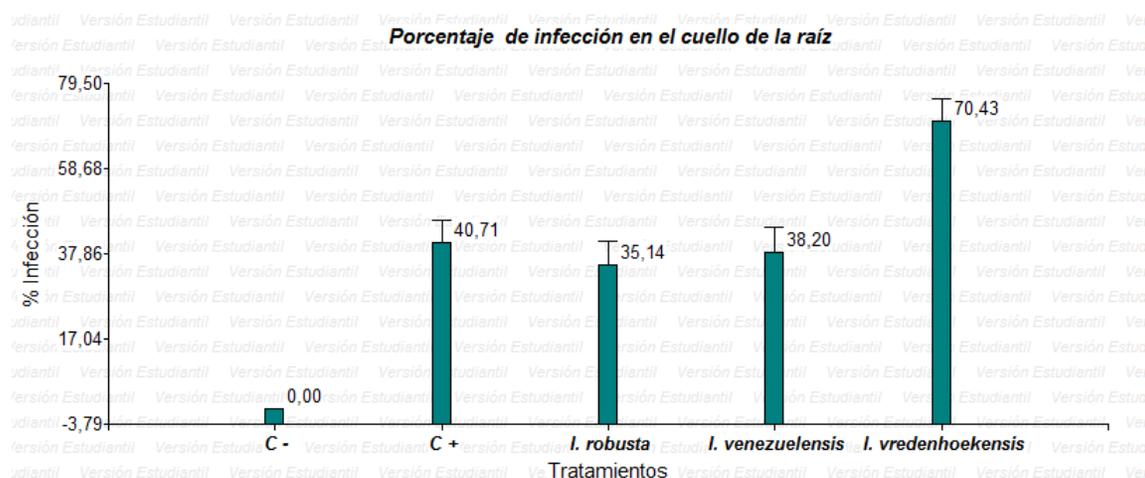


Figura 27. Gráfica de porcentaje de infección en el cuello de la raíz entre los diferentes tratamientos a nivel de invernadero. T1 (Control negativo). T2 (*D. torresensis*). T3 (*I. robusta*). T4 (*I. venezuelensis*). T5 (*I. vredenhoekensis*).

4.5 Reaislamiento de los hongos *Ilyonectria* y *Dactylonectria*

Se aislaron los hongos en cajas Petri con PDA, a partir de las raíces con síntomas de necrosis de cada uno de los tratamientos excepto del control negativo (T1) que no mostró signos de necrosis a nivel del cuello de la raíz (Figura 29 y 30).

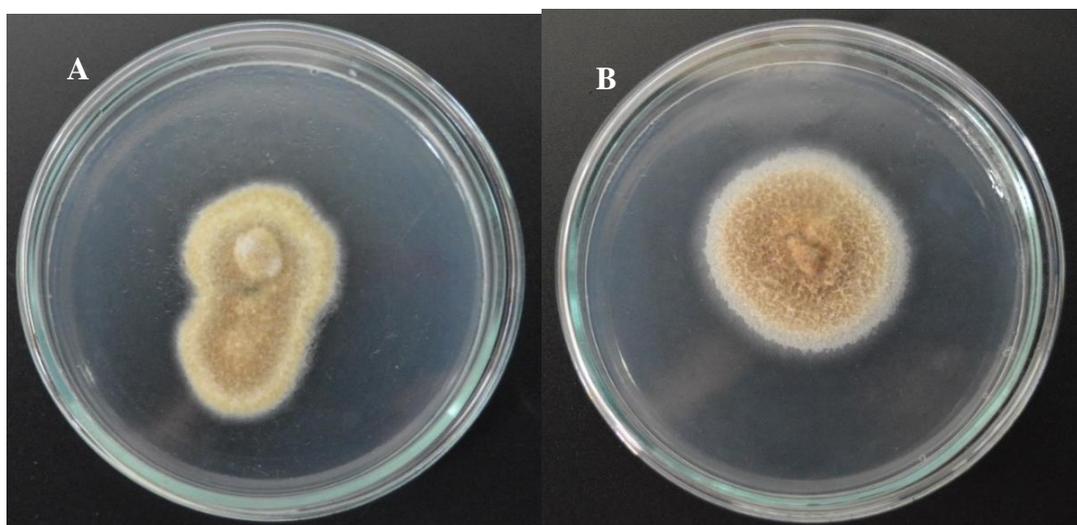


Figura 28. (A) *Dactylonectria torresensis* (T2). (B) *Ilyonectria robusta* (T3).
Edad: 11 días.

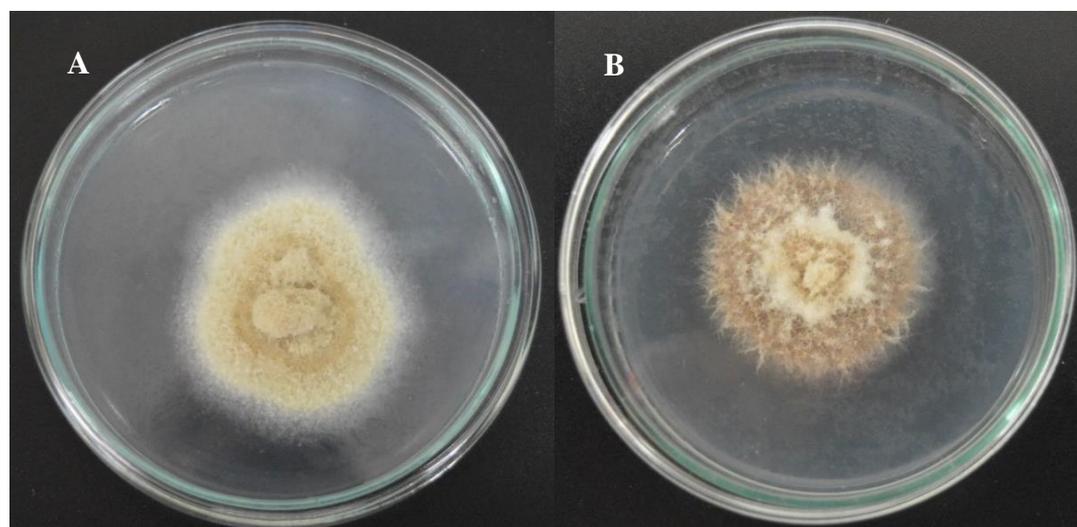


Figura 29. (A) *Ilyonectria venezuelensis* (T4). (B) *Ilyonectria vredenhoekensis* (T5). Edad: 11 días.

4.6 Análisis filogenético

El árbol filogenético se construyó en base a las secuencias de los genes HIS3, TEF e ITS con amplicones de un tamaño de 508, 720 y 504 respectivamente. El árbol de inferencia bayesiana se construyó en base los modelos que mejor describieron la sustitución de nucleótidos: Hasegawa-Kishino-Yano (HKY +G) para ITS y el modelo (HKY +I) para HIS3 y TEF. Para el de máxima verosimilitud, se aplicó el modelo predeterminado GTR (general time reversible).

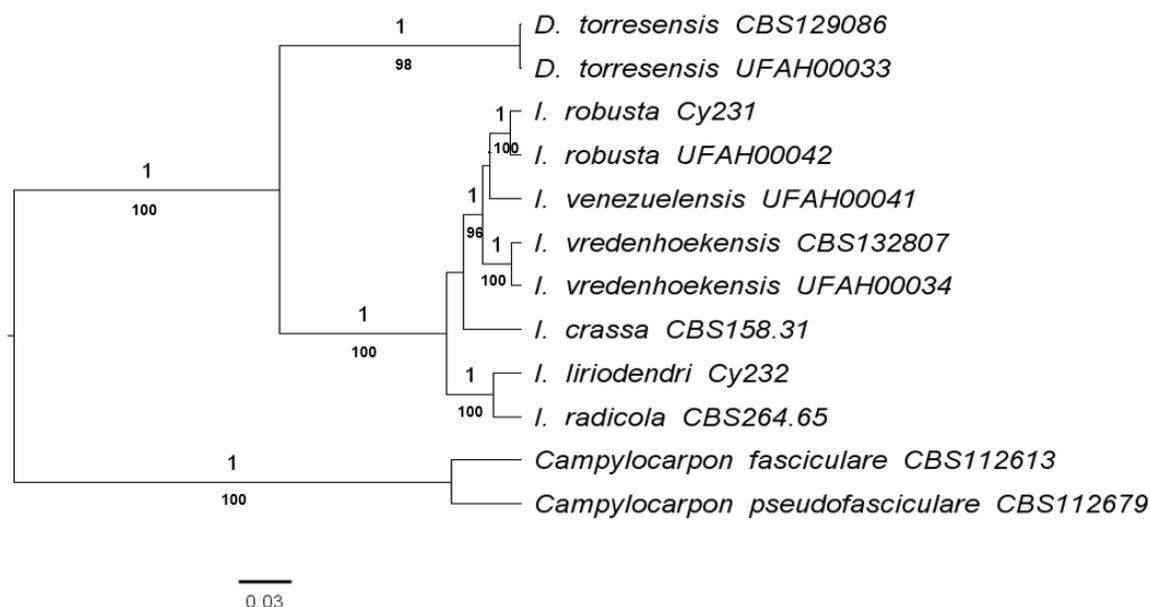


Figura 30. Árbol concatenado de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria* usando el loci HIS3, TEF e ITS. El árbol fue enraizado con *Campylocarpon fasciculare* y *Campylocarpon pseudofasciculare* como grupos externos. Los números en las ramas representan los valores “bootstraps” calculados a partir de 1000 replicaciones (se muestran solo valores superiores al 95%).

Al comparar el árbol bayesiano con el de máxima verosimilitud (ML) se confirmaron las topologías de los árboles, en la Figura 31 se muestra el árbol consenso con valores de soporte bootstrap en la parte superior y en la parte inferior se encuentra la probabilidad posterior. Los

aislados *I. robusta*, *vredenhoekensis* y *D. torresensis* se agruparon con las secuencias de referencia descargadas del NCBI con valores de soporte mayores a 98.

Las cepas de *Ilyonectria* son monofiléticas y están divididas en dos subclados, en el primer subclado incluye las especies: *I. crassa*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* e *I. vredenhoekensis* y en el segundo subclado: *I. liri dendri* e *I. radicola*.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

En este estudio se confirmaron las especies de los hongos de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria* obtenidos por Iturralde (2017), los cuales al ser reactivados en medio de cultivo PDA adicionado con cloranfenicol mostraron colonias algodonosas de coloración café claro hasta el marrón, lo que concuerda con lo descrito por Cabral y colaboradores (2012). Lombard (2013) menciona a los conidióforos de *Ilyonectria* de forma alargada, cilíndrica con los dos extremos redondos y la textura del micelio filamentoso con apariencia algodonosa. El PDA es un medio usado para el cultivo de hongos y levaduras y puede ser suplementado con antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano (Acumedia, 2015). Por lo tanto, al ser un medio de cultivo nutritivo no selectivo, se utilizó para el crecimiento y esporulación de *Ilyonectria* y *Dactylonectria*.

En la caracterización microscópica de los aislados se realizaron dos tinciones diferentes; la primera, con azul de lactofenol y la segunda, con ácido láctico. Estos reactivos se usan para la identificación de estructuras fúngicas, según la ficha técnica descrita por Himedia (2017). El azul de lactofenol está compuesto por ácido láctico que ayuda a la conservación de la estructura fúngica, fenol el cual desactiva las enzimas celulares evitando la lisis de las mismas y el azul de algodón tiñe la quitina presente en la pared celular de los hongos.

Los hongos *Ilyonectria* y *Dactylonectria* crecieron a una temperatura aproximada de 25 °C, en un periodo de 15-25 días. Cabral y colaboradores (2012) realizaron pruebas cardinales de temperatura, las colonias crecieron en una temperatura óptima entre 20 a 25 °C, mientras que a 30 °C no todos los aislados crecieron y finalmente a una temperatura de 35 °C no se evidenció crecimiento en ninguna de las colonias. Por su parte Halleen y colaboradores (2006) también coinciden en el rango antes descrito como la temperatura óptima de crecimiento para este tipo de hongos.

La especie *D. torresensis* presentó valores medios en las macroconidias de uno a tres septos de (28.36 x 6.11) μm , (31.12 x 6.01) μm , (37.26 x 6.12) μm . Para microconidias sin y con un septo presentaron valores medios de (10.01 x 3.34) μm y (13.79 x 3.87) μm , los cuales concuerdan dentro de los valores extremos establecidos por Cabral y colaboradores (2012). Los conidióforos pertenecientes a *D. torresensis* fueron de forma alargada, con un ensanchamiento ligero y curvas minuciosas concordando con lo descrito en un estudio realizado por Weber & Entrop (2017).

En este estudio la especie *I. robusta* presentó macroconidias de uno a tres septos con valores medios de (28.36 x 6.12) μm , (31.11 x 6.10) μm , (37.26 x 6.12) μm respectivamente. Los valores medios de las microconidias sin y con un septo fueron de (10.01 x 3.35) μm y (13.80 x 3.87) μm , los mismos que concuerdan con los obtenidos por Cabral y colaboradores (2012).

Los valores de las medias adquiridas en este estudio para las macroconidias de *I. vredenhoekensis* de uno a tres septos fueron (26.26 x 5.02) μm , (28.09 x 5.70) μm y (33.90 x 6.0) μm respectivamente y para microconidias sin y con un septo (6.8 x 2.62) μm y (16.06 x 4.40) μm ,

los cuales al comparar los valores de las medias coinciden con los de referencia establecidos por Lombard y colaboradores (2013).

La especie *I. venezuelensis* presentó valores medios para las macroconidias de uno a tres septos de (24.86 x 4.72) μm , (30.58 x 5.48) μm , (34.10 x 5.84) μm respectivamente y para las microconidias sin y con un septo los valores medios fueron (8.87 x 2.61) μm y (14.33 x 3.45) μm . Al comparar los valores de las medias con los valores de referencia establecidos por Cabral y colaboradores (2012) se determinó que se ajustan a lo mencionado en la bibliografía, sin embargo es necesario apoyarse en técnicas de identificación molecular como la PCR (Proaño, 2014) para la identificación de microorganismos.

Se observaron clamidosporas de forma globosa de tono café a marrón en *I. robusta* e *I. vredenhoekensis*, estas estructuras según Chaverri y colaboradores (2011) se encuentran generalmente en especies de *Ilyonectria* como una adaptación de supervivencia en el suelo y están ausentes en especies como *Neonectria*. Lombard y colaboradores (2014) establecieron que las especies de *Ilyonectria* son transmitidas por el suelo mediante estructuras de resistencia.

Los métodos moleculares basados en ácidos nucleicos para la identificación y detección de especies como *Ilyonectria* y *Dactylonectria* son cada vez más utilizados, debido a que otorgan mayor precisión, resolución y rapidez frente a las técnicas de identificación morfológicas (Proaño, 2014). Por lo tanto, en este estudio la caracterización morfológica de los aislados fue complementada con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para confirmar la identidad de los aislados: *D. torresensis*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* e *I. vredenhoekensis*.

De las cuatro secuencias amplificadas, con ITS 4 e ITS 5 se logró generar secuencias consenso las cuales fueron sometidas a un análisis en Blast. Altschul y colaboradores (1990) mencionan a Blast como una herramienta bioinformática que compara las secuencias de nucleótidos o proteínas con secuencias en la base de datos. De este modo se puede estimar el grado de similitud entre las secuencias de interés y las secuencias registradas en la base de datos

Para la identificación molecular de los aislados se utilizaron los primers ITS4 e ITS5, estos cebadores usan regiones conservadas del ARN ribosómico 18S, 5.8S y 28S (White et al., 1990). Para la caracterización molecular de *Cylindrocarpon* spp. Alaniz (2008) recurrió a los primers ITS1 e ITS4, los cuales amplifican la región 5,8S-ITS. El producto de amplificación de los cuatro aislados fue de 550 pb, confirmando la identidad de *I. vredenhoekensis* con un 99.59% de identidad, *I. robusta* con 99.63% de identidad y *D. torresensis* con un 99.08 % de identidad. Para la *I. venezuelensis*, la secuencia del ITS no está disponible en la base de datos, identificándose tan solo como un aislado del género *Ilyonectria*, por eso es necesario buscar cebadores que identifiquen a especies del género de modo más específico.

Según Cabral y colaboradores (2012) los primers EF1 y EF2 que amplifican la región del factor de transcripción y elongación TEF permiten identificar hongos del género *Ilyonectria* con un mayor porcentaje de identidad. Iturralde (2017) utilizó los primers EF1/EF2 para la identificación molecular de los aislados del género *Ilyonectria* ya que al usar los primers Dest1/Dest4, Efl α -983/Efl α -2218R no fue posible la identificación de este tipo de hongos.

Los hongos del género *Cylindrocarpon* y sus teleomorfos *Ilyonectria* y *Dactylonectria* son los principales causantes de la enfermedad del pie negro, en un estudio descrito por Halleen et al. (2006) se identificaron a *C. destructans* y *C. macrodidymum* como las especies que afectan los cultivos de vid. Posteriormente, Alaniz (2008) mediante análisis fenotípicos y moleculares identificó a *C. liriodendri* como otro agente causal de marchitez en viñedos. En cultivos de fresa y frambuesa al norte de Alemania se relacionó a *Cylindrocarpon* y sus teleomorfos como agentes causales de la pudrición de la raíz, en particular a *D. torresensis* (Weber & Entrop, 2017), por lo que en este estudio se consideró a *D. torresensis* como el control positivo para determinar los síntomas de pudrición de raíz en moras de castilla.

Las pruebas de patogenicidad después de cuatro meses de su inoculación demostraron que los aislados *D. torresensis*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* e *I. vredenhoekensis* ingresaron por el sistema radicular de la planta hasta infectar y necrosar el tejido de la raíz, concordando con lo descrito en la literatura (Alaniz, 2008; Cedeño et al., 2004; Halleen et al., 2006) porque se observó tejido a nivel del cuello de la raíz de un tono violeta y las hojas basales presentaron signos de marchitez.

El tejido del cuello de la raíz presentó lesiones necróticas de color violeta. Según Kluge (1966), esta coloración se da por una sustancia de naturaleza fenólica secretada por el hongo patógeno, en este caso los hongos de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria*. Por otro lado, Cedeño y colaboradores (2004) establecieron que la patogenicidad de *C. destructans* está relacionada por la producción de una toxina que debilita y mata el tejido radicular de las plantas afectadas por estrés, trasplante y poda a nivel de la raíz.

Alaniz (2008) y Oña (2018) sugieren una escala para determinar la severidad de cada uno de los aislados. En el ensayo de invernadero, las hojas basales mostraron diferencias significativas entre los tratamientos; el control negativo (T1) no presentó signos de marchitez, mientras que en las hojas basales de T2 (*D. torresensis*), T3 (*I. robusta*) y T4 (*I. venezuelensis*) los signos de marchitez fueron 28.14%, 27.43% y 22% respectivamente. En T5 (*I. vredenhoekensis*) las hojas basales presentaron clorosis y pérdida de turgencia, el porcentaje de marchitez en las hojas basales fueron más severos en comparación al resto de tratamientos, con un valor de 42.57%.

El porcentaje de infección en el cuello de la raíz en T1 (control negativo) tomó un valor de 0%, el tejido presentó coloración beige, sin signos de necrosis como lo describe Iturralde (2017). En T2 inoculado con *D. torresensis*, los haces vasculares se tornaron de una coloración violeta con un porcentaje infección de 40.71%, sin embargo Weber & Entrop (2017) y Oña (2018) determinaron porcentajes de infección en los cultivos mayores al 75%. En T3 y T4 inoculados con *I. robusta* e *I. venezuelensis* respectivamente, la necrosis avanzó hacia el centro de los haces vasculares, el tejido se volvió violeta. Según la escala propuesta por Alaniz (2018) el porcentaje de infección fue de 35.14% para *I. robusta* y 38.20% para *I. venezuelensis*. Finalmente, en T5 inoculado con *I. vredenhoekensis*, la necrosis cubrió cerca del 70.43% de los haces vasculares y la coloración violeta fue más intensa. *Cylindrocarpon* es sensible a la competencia en las raíces, por eso al ser dominante puede competir con otros hongos saprofitos, debilitando al hospedero hasta poder invadir totalmente el sistema radicular de la planta (Cedeño et al., 2004).

Cuando el suelo está equilibrado, es decir está aireado, ligero y permeable (posee fracciones finas y gruesas), *C. destructans* no es patógeno. Si la comunidad microbiana es alterada por fungicidas y acumulación de agua, las toxinas de los hongos se acumulan en niveles tóxicos favoreciendo la infección (Cedeño et al., 2004). Las plantas estresadas son más propensas a la infección debido a factores predisponentes como el uso inadecuado y continuo de pesticidas y exceso de agua que debilitan el sistema radicular (Cedeño et al., 2004). Entonces se podría decir que los aislados afectaron a las plantas en niveles inferiores al 75% debido a que el ensayo se encontraba bajo invernadero, sin estrés hídrico u otro factor predisponente a las plantas para su infección.

En un estudio realizado por Lombard et al. (2014) mediante análisis filogenéticos determinaron a *D. torresensis* como la especie con mayor rango de infección en plantas, de este modo se confirma que el control positivo utilizado para las pruebas de patogenicidad produce la enfermedad del pie negro.

Chaverri y colaboradores (2011) introdujeron el género *Ilyonectria* para ubicar a los anamorfos de *Cylindrocarpon*. El árbol consenso obtenido en este estudio proporciona información para determinar que los aislados de *Ilyonectria* y *Dactylonectria* tienen un ancestro en común; es decir, son monofiléticas. En este estudio se pudo determinar como un grupo externo a *Campylocarpon fasciculare* y *Campylocarpon pseudofasciculare*, especies más alejadas de los demás taxones, pero emparentados a ellos (Proaño, 2014).

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

- Los aislados de los géneros *Ilyonectria* y *Dactylonectria* presentan textura algodonosa con tonos que van desde el café claro hasta el marrón, crecen a una temperatura de 20 a 25° en un periodo de 15- 25 días.
- *D. torresensis* mostró macroconidias de uno a tres septos con valores medios en una relación largo/ancho de (29.28 x 4.24) μm , (29.94 x 3.92) μm y (37.13 x 4.44) μm . Los valores medios de las microconidias sin y con un septo en una relación largo/ancho fueron de (11.18 x 3.65) μm y (15.61 x 4.40) μm .
- *I. robusta* presentó valores medios para las macroconidias de uno a tres septos en una relación largo/ancho de (28.36 x 6.12) μm , (31.11 x 6.10) μm y (37.26 x 6.12) μm . Los valores medios para las microconidias sin y con un septo fueron de (10.02 x 3.34) μm y (13.79 x 3.87) μm respectivamente.
- Se determinó valores medios para las macroconidias de uno a tres septos en *I. vredenhoekensis* con una relación largo ancho de (29.27 x 4.23) μm , (29.94 x 3.92) μm , (11.17 x 3.65) μm . Los valores medios de las microconidias sin y con un septo fueron (11.17 x 3.64) μm y (15.61 x 4.4) μm .
- En *I. venezuelensis* los valores promedio de macroconidias de uno a tres septos fueron (24.86 x 4.73) μm , (30.58 x 5.48) μm , (34.02 x 5.84) μm respectivamente y para microconidias sin y con un septo los valores promedios fueron (8.87 x 2.61) μm , (14.33 x 3.45) μm respectivamente.

- Los primers ITS4 e ITS 5 permitieron confirmar la identidad de *I. vredenhoekensis* con un 99.59% de identidad, *I. robusta* con 99.63% de identidad y *D. torresensis* con un 99.08 % de identidad, sin embargo para la *I. venezuelensis* la secuencia del ITS no está disponible en la base de datos, identificándose tan solo como un aislado del genero *Ilyonectria*.
- El porcentaje de marchitez en las hojas basales para el control negativo (T1) fue 0%, T2 (*D. torresensis*) 28.14%, T3 (*I. robusta*) 27.43%, T4 (*I. venezuelensis*) 22% y en T5 (*I. vredenhoekensis*) las hojas basales presentaron clorosis, pérdida de turgencia, los signos de marchitez en las hojas fueron más severos que en el resto de tratamientos, con un valor de 42.57%.
- El porcentaje de infección en el cuello de la raíz para T1 (control negativo) fue de 0%, T2 (*D. torresensis*) 40.71%, T3 (*I. robusta*) 35.14%, T4 (*I. venezuelensis*) 38.20% y en T5 (*I. vredenhoekensis*) la necrosis cubrió cerca del 70.43% de los haces vasculares, la coloración violeta fue más intensa. .
- El análisis filogenético determinó a los hongos de los géneros *Dactylonectria* e *Ilyonectria* como especies monofiléticas. También las secuencias de referencia dieron valores de soporte aceptables mayores a 98 así como a *Campylocarpon fasciculare* y *Campylocarpon pseudofasciculare* como grupos externos.
- Las especies de *Ilyonectria* son monofiléticas y están divididas en dos subclados, en el primer subclado se identificaron a *I. crassa*, *I. robusta*, *I. venezuelensis* e *I. vredenhoekensis* y en el segundo subclado a *I. liriodendri* e *I. radicola*.

CAPÍTULO VII

RECOMENDACIONES

- En las pruebas de patogenicidad utilizar plantas de mora de castilla en una edad máxima de dos a tres meses. Para evaluar los síntomas de marchitez e infección a nivel de invernadero, se recomienda esperar más de cuatro meses.
- Repetir la prueba de patogenicidad con un mayor número de plantas.
- Realizar mediciones de las clamidosporas presentes en los aislados para una mejor descripción morfológica de las especies.
- Probar primers que permitan identificar a todas las especies de *Ilyonectria*.
- Tomar muestras de las principales provincias productoras de mora del Ecuador, con la finalidad de ampliar la zona de investigación, para determinar la incidencia del pie negro en cultivos de mora de castilla (*R. glaucus*).
- Investigar si la enfermedad del pie negro está presente en otros cultivos diferentes al de *R. glaucus* produciendo síntomas de marchitez.

CAPITULO VII

BIBLIOGRAFÍA

Acumedia. (2015). *Agar papa dextrosa* . ww.neogen.com.

Alaniz, S. (2008). *Caracterización y control de *Cylindrocarpon* spp. agente causal del pie negro de la vid. (Tesis doctoral)*. Valencia: Unuversidad politécnica de Valencia.

Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad-Campos, P., & Armengol, J. (2007). *Characterization of *Cylindrocarpon* Species Associated with Black Foot Disease of Grapevine in Spain*. España: Plant Dis. 91:1187-1193.

Alarcón, J. (2008). *Manejo Integrado de la mora*. Quindío, CO,: ICA. 37 p.

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). *Basic local alignment search tool*. J. Mol. Biol. Volume 215,Pages 403-410: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Ames, T. (1997). *Enfermedades fungosas y bacterianas de raíces y tubérculos andinos*. CIP.

Booth, C. (1996). *The Genus *Cylindrocarpon**. . Commonwealth Mycology Institute: Kew, Surrey, England.: 56pp.

Botha, A. (2002). *A study on the etiology and epidemiology of black root rot of strawberry in the western cape*. Stellenbosch University.

Brayford, D. (1993). *Cylindrocarpon*. In: *Methods for research on soilborne Phytopathogenic fungi*. APS Press: St. Paul - USA.

- Brayford, D., Honda, B., Mantiri, F., & Samuels, G. (2004). *Neonectria and Cylandrocarpon: the Nectria mammoidea group and species lacking microconidia*. . Mycologia 96: 572-597.
- Cabral, A., Groenewald, J., Rego, C., Oliveira, H., & Crous, P. (2012). *Cylandrocarpon root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the Ilyonectria radiculicola species complex*.
- Cabral, A., Rego, C., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J., & Crous, P. (2012). *Multi-gene analysis and morphology reveal novel Ilyonectria species associated with black foot disease of grapevines*.
- Cedeño, L., Carrero, C., Quintero, K., & Pino, H. &. (2004). *Cylandrocarpon destructans var. destructans AND Neonectria discophora var. rubi associated with black foot rot on blackberry (Rubus glaucus Benth) in Mérida, Venezuela*. Interciencia, 29(8), 455-460. : http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004000800011&lng=es&tlng=en.
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A., & Samuels, G. (2011). *Delimitation of Neonectria and Cylandrocarpon (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with Cylandrocarpon-like anamorphs P. Studies in Mycology,68,57-78*. <http://doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>.
- Clark, J., Stafne, E., Hall, H., & Finn, C. (2007). *Blackberry Breeding and Genetics*. Plant Breeding Reviews, Volume 29.
- Darrow, G. (1952). *Rubus glaucus, the Andes blackberry of Central America and northern South America*. Ceiba 3:97–101.
- Delgado, F. (2012). *Manejo orgánico del cultivo de mora (Rubus sp.)*. Cuenca: Universidad de Cuenca.

- Drummond, A., & Rambaut, A. (2007). *BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*. BMC Evolutionary Biology: vol. 7 pg. 214.
- Drummond, A., Suchard, M., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). *Bayesian Phylogenetics with BEAUti and the BEAST*. Molecular Biology and Evolution, Volume 29, Pages 1969–1973.
- Franco, G., & Giraldo, M. (1998). *El cultivo de la mora*. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA: <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/handle/11348/4039>.
- French, E., & Herbert, T. (1980). *Inóculo e inoculación*. Métodos de investigación fitopatológica.: San Jose: Editorial IICA.
- Grasso, S. (1984). *Infezioni di Fusarium oxysporum e di Cylindrocarpon destructans associate a una moria di giovani piante di vite in Sicilia*. . Italia: Informatore Fitopatologico 1, 59–63.
- Grasso, S., & Magnano Di San Lio, G. (1975). *Infections of Cylindrocarpon obtusisporum on grapevines in Sicily*. Vitis 14, 36–39.
- Halleen, F. S., Rego, C., Oliveira, H., & Crous, P. (2006). *Neonectria liriodendri sp. nov., the main causal agent of black foot disease of grapevines*. Studies in mycology: 227–234. 2006.
- Halleen, F., Fourie, P., & Crous, P. (2006). *A review of black foot disease of grapevine*.
- Himedia. (2017). *Lactophenol Cotton Blue*. <http://himedialabs.com/TD/S016.pdf>.
- ICA. (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (Rubus glaucus benth)*. Instituto Colombiano Agropecuario: Bogotá, Colombia.
- INEC: Instituto Nacional De Estadísticas Y Censos, E. (2000). *III Censo Nacional Agropecuario*. Quito, EC.: 255 p.
- INIAP. (2016). *El cultivo de la mora en el Ecuador*. Quito.
- INIAP. (2018). *Informe de Fucultura*. <http://www.iniap.gob.ec/pruebav3/frucultura/#>.

- Iturralde, P. (2017). *Estandarización de una metodología de inoculación de Ilyonectria sp., agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla (Rubus glaucus)*. Quito.
- Kluge, E. (1966). *Pathogenität gegenüber kiefern sämlingen und toxinbildung bei Cylindrocarpon radicola Wr. Phytopathol. Z. 55:368 - 388.*
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets*. *Molecular Biology and Evolution*, Volume 33, Pages 1870–1874.: doi.org/10.1093/molbev/msw054.
- Lombard, L., Bezuidenhout, C., & Crous, P. (2013). *Ilyonectria black foot rot associated with Proteaceae*. *Australasian Plant Pathology*: DOI 10.1007/s13313-012-0188-5.
- Lombard, L., Van Der Merwe, N., Groenewald, Z., & Crous, P. (2014). *Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of Ilyonectria and allied genera*. doi:10.14601/Phytopathol_Mediterr-14976.
- MAGAP. (2013). *La mora de castilla*. Quito - Ecuador.
- Malapi-Wight, M., Salgado-Salazar, C., Demers, J., Veltri, D., & Crouch, J. (2015). *Draft Genome Sequence of Dactylonectria macrodidyma, a Plant - Pathogenic Fungus in the Nectriaceae*. *Genome Announc* 3(2):e00278-15: doi:10.1128/genomeA.00278-15.
- Martinez, A., Vásquez, W., Viteri, P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). *Ficha técnica de la variedad de mora sin espinas (Rubus glaucus B.) INIAP-ANDIMORA-2013*. Quito-Ecuador: INIAP, Programa Nacional de Fruticultura .
- Martínez, D. (2014). *Identificación de hongos fitopatógenos relacionados con la marchitez de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en la provincia de Tungurahua mediante la microscopia óptica y PCR. (Tesis de postgrado)*. Universidad de las Fuerzas Armadas.

- Mosquera, V., Alwang, J., Andrango, G., Domínguez, J., & Escudero, L. (2017). *Tipificación de los productores de mora de Ecuador para optimizar sus estrategias de medios de vida*. INIAP, Programa Nacional de Fruticultura.
- Natural resources Conservation Service, N. U. (1996). Baton Rouge: LA 70874-4490 USA. : <http://plants.usda.gov>.
- Oña, C. (2018). *Evaluación de la eficacia de productos convencionales y alternativos para el control de marchitez descendente (*Ilyonectria torresensis*) en mora de castilla*.
- Osorio, C., Hurtado, N., Dawid, C., Hofman, T., Heredia, F., & Morales, A. (2012). *Chemical characterisation of anthocyanins in tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) and Andes berry (*Rubus glaucus* Benth.) fruits*. Sevilla, España: doi:10.1016/j.foodchem.2011.12.026.
- Patiño, V. (2002). *Historia y dispersión de los frutales nativos del neotrópico*. Cali, Colombia: CIAT.
- Paucar, A. (2011). *Organogénesis directa in vitro a partir de explantes de hojas de mora (*Rubus glaucus* Benth)*. Quito: ESPE-IASA.
- Petit, E., & Gubler, W. (2005). *Characterization of *Cylindrocarpon* Species, the Cause of Black Foot Disease of Grapevine in California*. California: University of California, Department of Food and Agriculture.
- Proaño, M. (2014). *Relación filogenética de cepas de *Pythium irregulare* sensu lato de Long Island, New York en base al análisis de secuencias del gen β -TUBULINA*. Stillwater, EE.UU.
- Rossmann, A., Samuels, G., Rogerson, C., & Lowen, R. (1999). *Genera of Bionectriaceae, Hypocreaceae and Nectriaceae (Hypocreales, Ascomycetes)*. Stud. Mycol. 42:1-248.
- Scheck, H., Vasquez, S., & Gubler, W. (1998). *First report of black-foot disease, caused by *Cylindrocarpon obtusisporum*, of grapevine in California*. Plant Disease 82, 448.

- Stamatakis, A. (2014). *RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies*. *Bioinformatics*, Volume 30, Issue 9, Pages 1312–1313: doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033.
- Strik, B., Clark, J., Finn, C., & Banados, M. (2006). *World production of blackberries*. *Acta Hort* (in press).
- Strong, F. a. (1931). *Investigations on the black root rot of strawberries*. *Phytopathology* 21: 1041 - 1060.
- Weber, R., & Entrop, A. (2017). *Dactylonectria torresensis as the Main Component of the Black Root Rot Complex os Strawberries and Raspberries in Northern Germany*.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K., & Kahl, G. (2005). *DNA Fingerprint in plants and fungi. Principles, Methods, and Applications*. Boca Raton, U.S.A.: CRC Press Inc. Segunda edición.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic*. In M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, & T. White (Eds.), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). San Diego: Academic Press.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for Phylogenetics*.
- Wingfield, M., Wilhelm de Beer, Z., Slippers, B., Wingfield, B., Groenewald, J., Lombard, L., & Crous, P. (2012). *One fungus, one name promotes progressive plant pathology*. *Molecular Plant Pathology*.