



Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.)

Salinas Zapata, Jessith Alexander

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de Integración Curricular, previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología

Flores Flor, Francisco Javier PhD

15 de febrero del 2022



Tesis Jesith Salinas Biotecnologia ESPE 2022.txt

Scanned on: 17:45 February 15, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	339
Words with Minor Changes	27
Paraphrased Words	419
Ommited Words	0



Website | Education | Businesses



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

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de integración curricular, “**Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.)**” fue realizado por el señor **Salinas Zapata Jessith Alexander** el cual ha sido revisado y analizado en su totalidad por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 17 de febrero de 2022



Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C. C. 1713443479



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

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Salinas Zapata Jessith Alexander**, con cédula de ciudadanía n°1754722096, declaro/declaramos que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: **Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.)** es de mi autoría y responsabilidad, cumpliendo con los requisitos legales, teóricos, científicos, técnicos, y metodológicos establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, respetando los derechos intelectuales de terceros y referenciando las citas bibliográficas.

Sangolquí, 7 de febrero de 2022

Salinas Zapata, Jessith Alexander

C. C. 1754722096



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

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo **Salinas Zapata Jessith Alexander**, con cédula de ciudadanía n°1754722096, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.)** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 7 de febrero de 2022

Salinas Zapata, Jessith Alexander

C. C. 1754722096

Dedicatoria

A mis padres María Augusta y Javier quienes siempre me han apoyado y guiado

A mi hermano Mateo, mi mejor amigo

A toda mi familia y amigos

Jessith Alexander Salinas Zapata

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitirme cumplir mis metas y tomar las mejores decisiones, enseñarme a confiar en el en todos los momentos difíciles.

Quiero agradecer a mi mamá, María Augusta por toda su confianza y cariño, por ese ejemplo diario de fortaleza, por sus consejos en cada momento de dificultad y ese interminable amor con que hace las cosas.

A mi hermano Mateo por su apoyo, sus consejos, compañía.

A mi familia por estar preocupada siempre por mi bienestar, por su apoyo y cariño incondicional en cada paso de mi vida. Su guía para ser una persona de bien.

Al Dr. Francisco Flores por toda su guía y direccionamiento en el desarrollo de este proyecto, además por su apertura al Laboratorio de diagnóstico Molecular IDgen en el desarrollo de la parte práctica del trabajo de integración curricular.

Al técnico del laboratorio Francisco Garrido por sus consejos y ayuda en el desarrollo de la parte práctica del trabajo.

A todas las personas que formaron parte de esta etapa, por todos los momentos y experiencias a lo largo de la carrera.

Índice de contenido

Resultados de análisis Copyleaks.....	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria.....	6
Agradecimientos.....	7
Índice de tablas.....	12
Índice de figuras.....	13
Listado de abreviatura.....	16
Resumen	17
Abstract.....	18
Capítulo I: Introducción	18
Formulación del problema	19
Justificación del problema.....	20
Objetivos.....	21
Objetivo general.....	21
Objetivos específicos	21
Capítulo II: Marco teórico.....	22

Generalidades de la Chirimoya	22
Descripción taxonómica.....	22
Características botánicas y morfológicas.....	23
Formas botánicas del fruto	23
Generalidades del cultivo	24
Importancia agrícola	25
Producción en Ecuador	26
Enfermedades reportadas.....	26
Antecedentes	26
Etiología de las enfermedades.....	27
Identificación Molecular.....	30
Extracción de ADN	30
Secuenciación Sanger	31
Análisis filogenético	33
Postulados de Koch	34
Hipótesis	34
Capítulo III: Materiales y Métodos.....	35
Muestreo y sintomatología	36
Identificación Morfológica	37
Aislamiento en Medio de cultivo	37
Caracterización macroscópica	37
Caracterización microscópica	38

	10
Identificación molecular.....	38
Extracción y cuantificación de ADN	38
Amplificación y cuantificación por PCR	39
Secuenciación y Análisis de secuencias	39
Análisis filogenético	40
Postulados de Koch	41
Capítulo IV: Resultados.....	43
Descripción de los síntomas.....	43
Aislamiento de muestras con síntomas	43
Identificación Morfológica	44
Aislado (CHT2).....	44
.....	44
Figura 8 Colonia de aislado CHT2 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento de micelio. (B) Vista posterior del cultivo.....	45
Aislado (CHT3).....	46
Aislado (CHT4).....	48
Aislado (MG01).	49
Nota. Circulo de color amarillo: clamidosporas	53
Identificación Molecular.....	53
Amplificación y secuenciación	53
Análisis filogenético	56
Postulados de Koch	57

Nota. Circulo de color amarillo: mancha de color café.....	58
Nota. Circulo de color amarillo: mancha de color café.....	59
Nota. Circulo de color amarillo: mancha de color café.....	60
Capítulo V: Discusión	65
Capítulo VI: Conclusiones	71
Capítulo VII: Recomendaciones	72
Capitulo VIII: Bibliografía	73

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de fruto de chirimoya en función de la forma	24
Tabla 2. Ubicaciones de muestreo	36
Tabla 3. Secuencias para análisis filogenético obtenidas del Genbank	40
Tabla 4. Medidas de conidióforos en micrografías.	51
Tabla 5. Medidas de conidios en micrografías.	51
Tabla 6. Resultados de identidad de las secuencias consenso con la base de datos BLAST	54
Tabla 7. Resultados de la secuenciación y similitud con base de datos de material tipo.	55

Índice de figuras

Figura 1. Morfología del <i>Alternaria</i> sp, (A) Forma de conidióforos (B) Células conidiógenas (C) Cadenas de conidios maduros (D) Germinación conidial.	28
Figura 2. Morfología de <i>Botrytis cinerea</i> , (A) Forma de conidióforos a partir de esclerocio (B) Conidióforo (C) Conidios	29
Figura 3. Principio de secuenciación de Sanger.	33
Figura 4. Flujo de trabajo de integración curricular	35
Figura 5. Ubicación geográfica de lugar de muestreo	36
Figura 6. Muestras con sintomatología. (A) Hoja con síntomas de enfermedad. (B) Fruto con síntomas de enfermedad	43
Figura 7. Aislados de muestras con sintomatología. (A) Cultivo de cortes de 5x5 mm de hojas. (B) Cultivo de cortes de 5x5 mm de fruto	44
Figura 8. Colonia de aislado CHT2 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento de micelio. (B) Vista posterior del cultivo	45
Figura 9. Aislado CHT2. (A) Conidióforos marcados con un círculo. (B) Conidios con tinción de azul de metileno.....	45
Figura 10. Colonia de aislado CHT3 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de micelio. (B) Vista posterior del cultivo.	46
Figura 11. Conidiomas o picnidios a los 28 días de crecimiento	47
Figura 12. Aislado CHT3. Conidios marcados con un círculo, tinción con azul de metileno.	47
Figura 13. Colonia de aislado CHT4 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento de micelio. (B) Vista posterior del cultivo.	48
Figura 14. Aislado CHT4. (A) Conidióforos marcados con un círculo. (B) Conidios con tinción de azul de metileno.....	49

Figura 15. Colonia de aislado MG01 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento radial de las hifas. (B) Vista posterior del cultivo.	50
Figura 16. Aislado MG01. (A) Conidióforos en círculo (B) Conidios con tinción de azul de metileno.	50
Figura 17. Colonia de aislado MG02 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento radial de las hifas. (B) Vista posterior del cultivo.	52
Figura 18. Aislado MG02, hifas y clamidosporas con azul de metileno. Lente 40X.	53
Figura 19. Electroforesis con los cebadores ITS 1, ITS 4	54
Figura 20. Árbol de Máxima verosimilitud de <i>Alternaria</i> sp, basado en el locus ITS.	57
Figura 21. Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado CHT2 (<i>Alternaria</i> sp). (A) Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta. (B) Bloque de agar con crecimiento. (C) Tratamiento Con herida (TCH) (D) Tratamiento sin herida (TSH).....	58
Figura 22. Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado CHT4 (<i>Alternaria</i> sp). (A) Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta (B) Bloque de agar con crecimiento. (C) Tratamiento con herida (TCH), (D) Tratamiento sin herida (TSH).	58
Figura 23. Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado MG01 (<i>Alternaria</i> sp). (A)	60
Figura 24. Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado CHT3 (<i>Diaporthe</i> sp). (A) Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta. (B) Bloque de agar con crecimiento. (C) Tratamiento con herida (TCH). (D) Tratamiento sin herida (TSH).	61
Figura 25. Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado MG02 (<i>Fusarium</i> sp). (A) Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta. (B) Bloque de agar con rápido crecimiento. (C) Tratamiento con herida (TCH). (D) Tratamiento sin herida (TSH).	62

Figura 26. Análisis de síntomas a los 7 días de la inoculación del aislado CHT4 (<i>Alternaria</i> sp). (A) crecimiento con bloque de agar. (B) Control.....	63
Figura 27. Colonia de reaislado CHT4 con un tiempo de desarrollo de 12 días en PDA (A) Vista frontal, de micelio.(B) Vista posterior del cultivo.	64
Figura 28. Reaislado CHT4 (A) conidióforos (B) conidios con tinción de azul de metileno. Barra de escala 20um.	64

Listado de abreviatura

ITS: Internal Transcribed Spacer

ADN: Ácido Desoxirribonucleico Ribosomal

TCH: Tratamiento con herida

TSH: Tratamiento sin herida

°C: Grados centígrados

μm: Micrómetros

μL: Microlitro

sp.: Especie

ppm: Partes por millón

r.p.m: Revoluciones por minuto

INIAP: Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

NCBI: National Center for Biotechnology Information

pb: Pares de Bases

Resumen

Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) es un árbol perteneciente a la familia de las *anonáceas*. En noviembre del 2021, se observó necrosis en el borde de la hoja y pudrición de frutos en las localidades de Tumbaco y Guayllabamba. Para identificar el agente causal de los síntomas se colectaron muestras de hojas y frutos. Se tomaron cortes del margen de los tejidos enfermos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,25% durante 45 seg y 3 lavados con agua destilada estéril, se sembró en PDA, y se incubaron a 25°C. Se obtuvieron 5 aislados CHT2, CHT3, CHT4, MG01, MGO2. Morfológicamente se caracterizaron los aislados CHT2, CHT4 y MG01 como colonias con aspecto algodonoso, con bordes definidos de color gris, café claro y verde oliva, conidióforos de 24 a 33 x 3 a 4 µm, y conidios de 17 a 24 x 6 a 9 µm. El aislado CHT3 presentó un crecimiento ramificado irregular de color blanco, con picnidios globosos de 2mm, conidios septados, bigutulados de 8,5 µm. El aislado MG02 presentó micelio aéreo, velloso de color blanco, hifas con clamidosporas terminales. El análisis BLAST de las secuencias ITS con los cebadores ITS1/ITS4 mostraron que los aislados CHT2, CHT4 y MG01 presentan un 100% de identidad con *Alternaria* (N° accesión KP052778.1), el aislado CHT3 un 98,08% con *Diaporthe* (N° accesión KY511328.1) y el aislado MG02 un 99,38% con *Fusarium* (N° accesión KX196808.1). El gen ITS no permitió identificar a nivel de especie los aislados. Las pruebas de patogenicidad realizadas con el tratamiento con herida y tratamiento sin herida mostraron síntomas de necrosis en frutos y hojas, se comprobaron los postulados de Koch al re aislar y observar la morfología de *Alternaria* en los aislados.

Palabras clave:

- CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA
- CARACTERIZACIÓN MOLECULAR
- *ALTERNARIA SP.*

Abstract

Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) is a tree belonging to the Annonaceae family. In November 2021, leaf edge necrosis and fruit rot were observed in Tumbaco and Guayllabamba. To identify the causal agent of the symptoms, leaf and fruit samples were collected. Slices were taken from the margin of the diseased tissues, disinfected with 0.25% sodium hypochlorite for 45 sec and 3 washes with sterile distilled water, sown on PDA, and incubated at 25°C. Five isolates were obtained: CHT2, CHT3, CHT4, MG01, MGO2. Morphologically, isolates CHT2, CHT4 and MG01 were characterized as colonies with cottony appearance, with defined gray, light brown and olive-green edges, conidiophores of 24 to 33 x 3 to 4 µm, and conidia of 17 to 24 x 6 to 9 µm. Isolate CHT3 presented an irregular branched growth of white color, with globose pycnidia of 2 mm, aseptate, bigutulate conidia of 8.5 µm. Isolate MGO2 presented aerial mycelium, white hairy, hyphae with terminal chlamydospores. BLAST analysis of ITS sequences with primers ITS1/ITS4 showed that isolates CHT2, CHT4 and MG01 had 100% identity with *Alternaria* (accession no. KP052778.1), isolate CHT3 had 98.08% identity with *Diaporthe* (accession no. KY511328.1) and isolate MGO2 had 99.38% identity with *Fusarium* (accession no. KX196808.1). The ITS gene did not allow the isolates to be identified to species level. The pathogenicity tests carried out with the wounded and unwounded treatments showed symptoms of necrosis in fruits and leaves, and Koch's postulates were proved by reisolating and observing the morphology of *Alternaria* in the isolates.

Key words:

- **MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION.**
- **MOLECULAR CHARACTERIZATION**
- **ALTERNARIA SP.**

Capítulo I: Introducción

Formulación del problema

Ecuador, en el 2019, registró exportaciones por un valor de \$89 millones de dólares de frutas tropicales y subtropicales, de lo cual \$890 mil dólares corresponden al 1% de la producción de frutas tropicales y subtropicales del País (Corporación Financiera Nacional, 2020). En el país la siembra de chirimoya para el año 2019 corresponde a 72,642 árboles, con una producción de 1,853.12 toneladas y un rendimiento de 0.03 tm/árboles (Corporación Financiera Nacional, 2020). Su producción se encuentra distribuida en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Azuay, Loja (INIAP, 2014a).

La Chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) pertenece al Orden *Magnoliidae*, Familia *Annonaceae*, es originaria de la parte sur del Ecuador, específicamente de la provincia de Loja. Se distribuye en las regiones tropicales de América, Asia, y Madagascar, se caracteriza por el interés económico de sus frutos (M. E. G. Vega, 2013). Reportes fitosanitarios en frutas y hojas de chirimoya indican que existen varios géneros de hongos asociados como causantes de enfermedades, como *Alternaria*, *Botrytis* y *Colletotrichum* (Villanueva-Arce et al., 2008).

Botrytis cinerea, identificado como el agente causal de necrosis y pudrición de frutos en varias especies de plantas, es un patógeno necrotrófico que ocasiona grandes pérdidas económicas en un gran número de cultivos importantes en todo el mundo (Williamson et al., 2007). Causa una infección generalizada en varios órganos de la planta como hojas, flores, frutos y bulbos (Benito-Pescador et al., 2016). El proceso de infección de *B. cinerea* se produce en dos etapas, primero con lesiones locales en una fase temprana, continuando con una propagación rápida. La enfermedad de moho gris ocasiona pudriciones, causando varias pérdidas en la producción y pos cosecha (Castro, 2007).

Justificación del problema

En Ecuador existe poca información de los problemas fitosanitarios en chirimoya, específicamente de las enfermedades relacionadas con hongos, la cual es necesaria para establecer un buen manejo del cultivo, con el objetivo de desarrollar productos con calidad comercial y competitivos en mercados internacionales, evitando pérdidas económicas en procesos productivos (Villanueva-Arce et al., 2008).

El objetivo de este proyecto es caracterizar a nivel morfológico y molecular el agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). Se aislaron potenciales patógenos a partir de muestras sintomáticas, los microorganismos que causaron sintomatología congruente con la observada en campo se identificaron morfológica y molecularmente con la técnica de barcoding utilizando los fragmentos ITS y RPB2. Finalmente, con los genes secuenciados se construyó la filogenia de los microorganismos identificados para determinar su relación con homólogos previamente descritos.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.).

Objetivos específicos

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

Capítulo II: Marco teórico

Generalidades de la Chirimoya

Descripción taxonómica

La chirimoya se clasifica de la siguiente manera (M. E. G. Vega, 2013).

Reino:	Plantae (Vegetal)
Subreino:	Embriophyta
División:	Spermatophyta
Clase:	Dicotyledoneae
Subclase:	Magnoliidae
Orden:	Ranales
Familia:	Annonaceae
Género:	<i>Annona</i>
Especie:	<i>Annona cherimola</i> Mill
N. común:	Chirimoya

La chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) es un árbol semicaducifolio de frutos carnosos, su ciclo de desarrollo fisiológico se caracteriza por presentar etapas continuas entre el crecimiento, madurez, reposo y crecimiento, como árboles de hoja caduca (Yáñez, 2018).

Existen de 120 a 130 géneros de los cuales se cultivan únicamente 3 por la importancia de sus frutos, *Annona*, *Rollinia* y *Asimia*, siendo el género *Annona* el más importante, por incluir a los frutales *Annona cherimola* (chirimoya), *Annona muricata* (guanábana) y *Annona squamosa* (anón) (Mamani, 2018).

Características botánicas y morfológicas

La Chirimoya es un árbol erecto de poco desarrollo perteneciente a la familia de las Anonáceas, de aspecto arbustivo y extendido. Su tamaño medio, alcanza una altura entre 5 a 9 metros, presenta un follaje grande y una copa globosa, sus ramas cubiertas de vello (FAO, 2006). Su sistema radicular es superficial y ramificado con dos o tres niveles de raíces. Presentan un tallo cilíndrico con una gran corteza de color gris (Mamani, 2018).

Sus hojas son simples, enteras y lisas, con dimensiones de 10 a 20 cm de largo y 8 a 12 cm de ancho, de forma ovoide, elíptica o lanceolada ligeramente vellosas en la parte superior y aterciopeladas en la parte inferior, con disposición alteró opuesto al tallo (Gardiazabal & Rosenberg, 1993). El pecíolo cubre las yemas que se caracterizan por ser mixtas, con flores y tallos vegetativos. Tiene una longevidad de 15 años y entra en actividad productiva en tres o cuatro años de desarrollo (FAO, 2006)

El fruto es una baya, tiene una forma cordiforme o cónica de 10 a 20 cm de longitud y 10 cm de ancho, presenta semillas duras, brillantes, de color negro con medidas de 1 a 2 cm de longitud (FAO, 2006). Es un fruto complejo formado por la unión de los pistilos con el receptáculo, del tipo denominado sincarpus. Su epicarpio es duro de color verde y su mesocarpio de color blanco (Mamani, 2018).

Formas botánicas del fruto

La forma de su epicarpio y de sus carpelos en su exterior puede clasificarse de la siguiente manera.

Tabla 1*Clasificación de fruto de chirimoya en función de la forma*

Forma del fruto	Descripción
Forma lisa	Fruto con la piel lisa y borde de carpelos fundidos.
Forma impresa	Fruto con depresiones suaves como placas, forma acorazonada y algo arriñonada.
Forma umbonata	Frutos con piel reticulada con numerosos carpelos y protuberancias.
Forma tuberculata	Frutos con una cubierta fuertemente reticulada, con protuberancias marcadas, forma globosa o redondeada.
Forma mammillata	Frutos con piel lisa en su parte media y distal. y sección basal con marcas y protuberancias.

Nota. Yáñez (2018)***Generalidades del cultivo***

Para el cultivo de chirimoya existen ciertos requerimientos climáticos y edáficos, la altura óptima se ubica entre los 1800 a 2500 msnm a una temperatura de 15 a 20° C. Se desarrollan bien en suelo franco y franco arenoso, con niveles de precipitación de 675 a 1000 mm/año, para un buen desarrollo radical (INIAP, 2014b). El pH recomendable se debe ubicar entre 6.6 a 8.5. Existen variedades Cumbe y Fino de Jete, las cuales sus cultivares se ubican en las localidades de San José de Minas, Tumbaco, Loja, Fabulosa y Paute (INIAP, 2014a).

El establecimiento del cultivo se realiza en huertos de alta y mediana densidad, con distanciamientos que oscilan entre 3 x 5 m, ubicando 667 plantas/ha. En alta densidad se

prefieren sistemas de conducción piramidales (INIAP, 2014c). Existen limitaciones en la producción de chirimoya, principalmente por las condiciones de temperatura y humedad que ocasionan daños físicos a los árboles, trastornos fisiológicos y una incidencia mayor de enfermedades (Damme & Scheldeman, 1993).

Importancia agrícola

Las frutas tropicales representan el 3% de las exportaciones mundiales de productos alimenticios agrícola (Orrego et al., 2020). “Se estima que el mercado americano de frutas en el 2017 llegó a las 19.3 millones de toneladas y que hacia el 2021 supere las 20.5 millones de toneladas” (PROMPERÚ, 2017). Estados Unidos ha venido importando 15 millones anuales, un total de 152,186 toneladas de importación anual (PROMPERÚ, 2017).

Un 65% de las importaciones de chirimoya provienen de México, Chile, Guatemala, India, Honduras, en los últimos años existe la participación de fruta procedente de Sudamérica principalmente de países como Argentina (407 tm), Colombia (30 tm) y Ecuador (187 tm) (PROMPERÚ, 2017).

La chirimoya es un frutal que se comercializa a nivel mundial, existe de forma comercial en Perú, España, Chile, Bolivia, Ecuador, Estados Unidos, Colombia, Sudáfrica, Israel, Argentina, Bolivia, Brasil y México (G. Vega & Esther, 2013). España es el principal productor de chirimoya, cultivando más de 3600 ha una producción cercana a 40,000 toneladas valoradas en alrededor de \$52 millones (PROMPERÚ, 2017).

En Chile se cultiva una superficie de mil hectáreas para los mercados internacionales, como Estados Unidos y Japón (G. Vega & Esther, 2013). En Estados Unidos de América se cultiva en el sur de California para abastecer a los mercados nacionales y de exportación, pero la

demanda supera a la oferta en los mercados (PROMPERÚ, 2017). La chirimoya (*Annona cherimola* M.), se encuentra dentro de las Anonáceas más apreciadas a nivel mundial.

Producción en Ecuador

El Ecuador cuenta con alrededor 1000 ha de chirimoya distribuidos principalmente en Guayllabamba, Tumbaco, Vilcabamba, Malacatos, Gualaceo, Paute, Patate, Mira (Yáñez, 2018). En 2019 la chirimoya alcanzó una producción de 72,642 árboles cosechados con una producción de 1853.12 tm con un rendimiento de 0,03 tm/ árboles, su producción representa el 1% de la producción nacional de frutas tropicales y subtropicales (Corporación Financiera Nacional, 2020). En el 2019 el sector de cultivo de frutas tropicales sumó alrededor de \$2,797.64 millones con una participación sobre el PIB del 3,90% con un crecimiento del 0,77% respecto al 2018 (Corporación Financiera Nacional, 2020).

En el 2019, Ecuador registró exportaciones por un valor FOB de \$89.08 millones, con un crecimiento del 3% respecto al año anterior, según el Banco central del Ecuador de enero a agosto del 2020, se registran exportaciones por el valor de \$30.0 millones, con una participación de los países de destino, Estados Unidos (48%), Chile (16%), Bélgica (9%), Países bajos (7%) (Corporación Financiera Nacional, 2020).

Enfermedades reportadas

Antecedentes

Con respecto a los agentes causales asociados a las enfermedades en cultivos de chirimoya en Ecuador se reportan diferentes géneros como *Alternaria*, *Botrytis* y *Colletotrichum*. Se han reportado dos enfermedades la mancha de la hoja causada por el hongo *Ascochyta* sp., presentando una sintomatología con manchas en el limbo foliar de color café oscuro (INIAP,

2014d) y antracnosis del fruto causada por *Colletotricum gloeosporioides* con manchas pardas en el fruto, en estados avanzados se agrieta y profundiza (Yáñez, 2018).

Botrytis cinerea ha sido descrito como agente causal del moho gris, la temperatura es uno de los aspectos que influye en el desarrollo de pudriciones, las bajas temperaturas provocan estrés por congelamiento aumentando la susceptibilidad de la planta, mientras las temperaturas altas llevan a la ruptura de los tejidos del hospedero (Verónica Cotroneo & Besoain, 1998). Otro factor que contribuye al desarrollo del hongo es la humedad, favoreciendo la infección por periodos largos si la planta permanece mojada a bajas temperaturas (Cheung et al., 2020).

Etiología de las enfermedades

La enfermedad de la mancha parda causada por *Alternaria* sp., causa síntomas en hojas y frutos. En hojas se presenta como lesiones necróticas de color negro y marrón bordeadas con tejido clorótico ubicado comúnmente en la nervadura central y el ápice (Guevara et al., 2019). Mientras que en frutos se presenta como manchas hundidas, necróticas, circulares a ovaladas, de color marrón (Latinović et al., 2014).

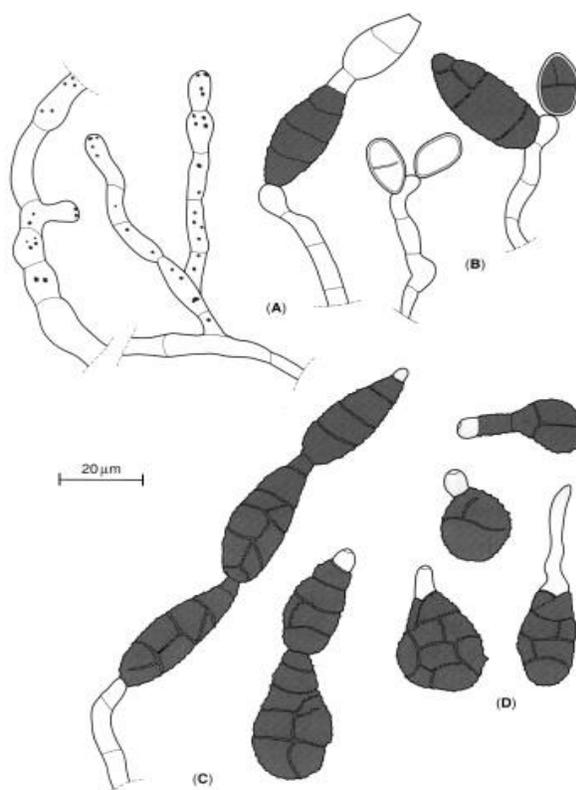
Se puede observar macroscópicamente, las colonias planas y algodonosas, el micelio inmerso o parcialmente superficial, de coloración blanca grisácea inicialmente y posteriormente se observa su superficie de color café o verde oliva oscura, el reverso de la colonia es café oscuro a negro, como resultado del depósito de pigmento dihidroxinaftaleno-melaninas (Rivas & Mühlhauser, 2014).

Microscópicamente conidióforos macronematosos, mononematosos, simples o irregulares y ramificados, *conidio* catenada o solitaria, seca, ovoide, ovoide, cilíndrica, estrechamente elipsoide u obclavada, marrón oliváceo pálido o medio a marrón, lisa, con tabiques transversales y con o sin tabiques o longitudinales (Woudenberg et al., 2013). Los

tabiques pueden ser gruesos, oscuros y rígidos y se puede formar una estructura interna similar a una célula, los conidios se presentan en cadenas individuales o ramificadas, con conidióforos cortos (López & Cabral, 1999).

Figura 1

Morfología del Alternaria sp, (A) Forma de conidióforos (B) Células conidiógenas (C) Cadenas de conidios maduros (D) Germinación conidial.



Nota. Tomado de López & Cabral. (1999).

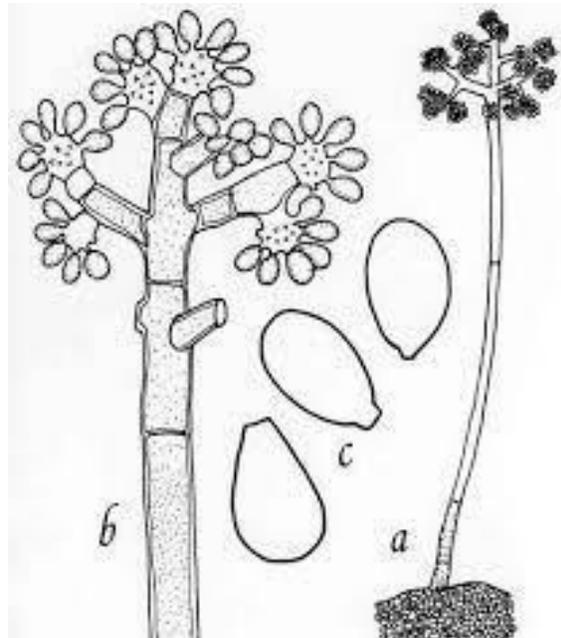
La enfermedad de moho gris causada por *Botrytis cinerea* ataca a los botones florales, flores y en los frutos, como un moho de color café claro, en condiciones de humedad cubre todo el fruto (Verónica Cotroneo & Besoain, 1998). Es responsable de una amplia gama de síntomas,

las pudriciones blandas y una rápida aparición de masas grises de conidios, en hojas y frutos blandos (Williamson et al., 2007).

Macroscópicamente las colonias son de color blanco, a los 7 días cambia a colonias grises en PDA a 20°C. Los conidios unicelulares, de forma elipsoide u ovoide, los conidióforos se presentan solitarios o en grupos, rectos o flexuosos, lisos, ramificados dicó o tricotómicamente, con ramas en las secciones apicales (Aktaruzzaman et al., 2021). Los esclerocios son redondos de color negro, su tamaño es de 0,5 a 3,0 mm, crecen de forma individual o en conglomerados (Mamo de Ally et al., 2021).

Figura 2

Morfología de Botrytis cinerea, (A) Forma de conidióforos a partir de esclerocio (B) Conidióforo (C) Conidios



Nota. Tomado de Gray, (1990)

Diaporthe sp.; ocasiona varios síntomas como la necrosis del follaje, tomando una coloración castaño-anaranjada de las hojas, con un posterior oscurecimiento, un bronceado del tejido interval de las hojas (Sánchez et al., 2015). Morfológicamente se caracterizan por presentar micelio color blanco, de aspecto comprimido y apelmazado, posteriormente de tipo algodonoso con tonalidades grises, luego de 15 a 20 días el envés de las colonias es de color ocre o crema (Guarnaccia et al., 2018). Existe la formación de picnidios de aspecto costroso e irregular distribuidos irregularmente, se desarrollan agrupados o solitarios (Hernández et al., 2015). Microscópicamente se observan conidios aceptados, bigutulados, hialinos, fusoides y elipsoides, lisos , ápice subredondeado a redondeado (Chaisiri et al., 2021). Las especies *de Diaporthe* están asociadas con podredumbres de raíces y frutos, muerte súbita, canchros de tallo, manchas foliares y descomposición de semillas de una amplia gama de huéspedes (Guarnaccia et al., 2018)

Identificación Molecular

Extracción de ADN

Para un estudio de identificación molecular mediante técnicas de PCR y secuenciación, que hacen posible analizar el ADN y las relaciones filogenéticas de comunidades microbianas (Hudson, 2008). La aplicación de técnicas moleculares inicia con la extracción de ADN de calidad y puro (Schlötterer, 2004). La extracción de ADN consiste en cinco etapas principales: homogeneización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y resuspensión del ADN (Sambrook et al., 1989).

Para la homogeneización del tejido y lisis celular se usan tubos de propileno con perlas de vidrio, con soluciones de lisis que contiene EDTA, que forma un complejo con los iones de Mg en impiden el funcionamiento de DNAsas, el B-mercaptoetanol inhibe la actividad de DNAsas y

Rnasas (Sambrook et al., 1989). Para la separación de proteínas y lípidos, se usan solventes orgánicos como cloroformo, fenol, alcohol isoamílico, haciendo uso de la tendencia hidrofílica de los grupos fosfato para obtener una fase acuosa y una orgánica la cual se separa mediante centrifugación (Stulnig & Amberger, 1994).

En la fase de precipitación para recuperar el ADN se adiciona etanol y soluciones con altas concentraciones de iones de sodio o amonio los cuales se unen a los grupos fosfato, reduciendo las fuerzas repulsivas entre cadenas y permitiendo que el ADN se pliega sobre sí mismo y sea insoluble, finalmente se elimina el etanol y se hidrata el ADN para mantenerlo en solución (Velázquez, 2010).

Para determinar la pureza del ADN se considera la absorbancia a 260nm, 280nm y 230 nm, los valores óptimos para la relación 260/280 se establece en un rango de 1.8 a 2.0 y para la relación 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2,0 a 2,2, si la relación es menor indica contaminación por proteínas y contaminación por carbohidratos y fenoles respectivamente (Leninger, 1975).

Secuenciación Sanger

La secuenciación Sanger, es una técnica de secuenciación dirigida que utiliza cebadores de oligonucleótidos para buscar regiones específicas de ADN, desarrollado por Lurenate Frederick Sanger en 1977 (Gomes & Korf, 2018). Se basa en la polimerización del ADN y el uso de dideoxinucleótidos que funcionan como terminadores de la reacción (Pareek et al., 2011).

La secuenciación de Sanger comienza con la desnaturalización del ADN de doble cadena. Se usa la secuencia de fragmentos de ácido desoxirribonucleico (ADN) de interés o amplicones previamente amplificados (*targeted sequencing*) como molde para una PCR de terminación de

cadena, al cual se adicionan nucleótidos modificados (dNTP): ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP) llamados desoxirribonucleótidos (ddNTP) (Solomon, 2018).

En la extensión de PCR estándar la ADN polimerasa agrega una mezcla de trifosfato de desoxinucleótidos (dNTP) que proporcionan los nucleótidos de adenina (A), citosina (C), timosina (T), y guanina (G). a una hebra de ADN en crecimiento mediante la formación de un enlace fosfodiéster entre el grupo 3'-OH libre del último nucleótido y el 5'-fosfato del siguiente nucleótido (Gomes & Korf, 2018).

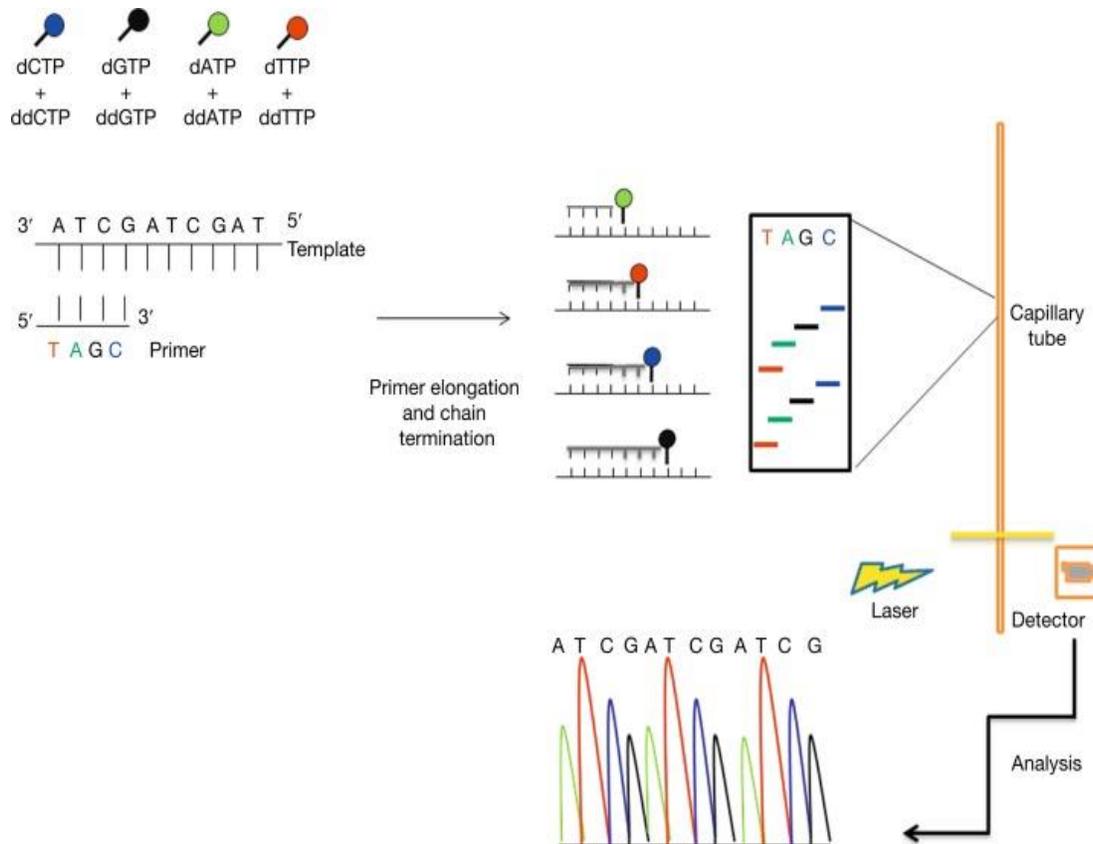
En la PCR de terminación de cadena, se agregan ddNTP, los cuales carecen de del grupo 3'-OH, por lo cual se detiene la extensión. El resultado son miles de copias de oligonucleótidos de ADN determinado por 5'-ddNTP (Merck, 2022).

En la secuenciación automática de Sanger, una computadora lee cada banda de gel capilar, en orden, usando fluorescencia para llamar a la identidad de cada terminal ddNTP. Los ddNTP se encuentran marcados con una etiqueta fluorescente diferente, un láser excita las etiquetas fluorescentes en cada banda y una computadora detecta una intensidad fluorescente que se traduce en un pico (Zhang et al., 2014). El resultado es un cromatograma que muestra el pico fluorescente de cada nucleótido a lo largo de la plantilla de ADN.

Cuando se produce una variante heterocigótica dentro de una secuencia, los loci serán capturados por dos tintes fluorescentes de igual intensidad (Gomes & Korf, 2018). Cuando hay una variante homocigótica el color esperado se reemplaza por el color de nuevo par de bases. Las dNTP marcadas con fluorescencia se agregan a los amplicones a medida que se sintetizan y la información se traduce a una secuencia en un electroferograma (Zhang et al., 2014

Figura 3

Principio de secuenciación de Sanger.



Nota. Tomado de (Zhang et al., 2014).

Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos se han utilizado para analizar los límites de las especies en varios géneros fúngicos (Cannon et al., 2012). La región interna del espaciador transcrito (ITS) ha sido aceptada como el código de barras universal para hongos debido a la facilidad de amplificación y su amplia utilidad en todo el reino, pero a menudo, solo se puede utilizar para su colocación hasta el nivel del género (Schoch et al., 2012).

Con el desarrollo de la identificación molecular, se han desarrollado análisis filogenéticos multilocus combinados con caracterización morfológica para identificar especies.

Para los análisis de filogenia Se pueden emplear métodos de inferencia bayesiana, máxima verosimilitud y máxima parsimonia, entre otros, con el fin de establecer relaciones filogenéticas entre especies (Chaisiri et al., 2021).

Postulados de Koch

Los postulados de Koch permiten determinar si un aislado es capaz de causar daños en el huésped en las plantas (Ross & Woodward, 2016). Los postulados de Koch se publicaron en 1890 por Robert Koch como método confiable para establecer si un microorganismo es la causa de la enfermedad (Ross & Woodward, 2016). Se basan en conceptos básicos establecidos: el patógeno ocurre en cada aparición de la enfermedad; el patógeno no ocurre en otras enfermedades como agente fortuito y no patógeno; y después de estar completamente aislado y cultivado repetidamente en cultivo puro, el patógeno puede inducir la enfermedad nuevamente (Evans, 1976).

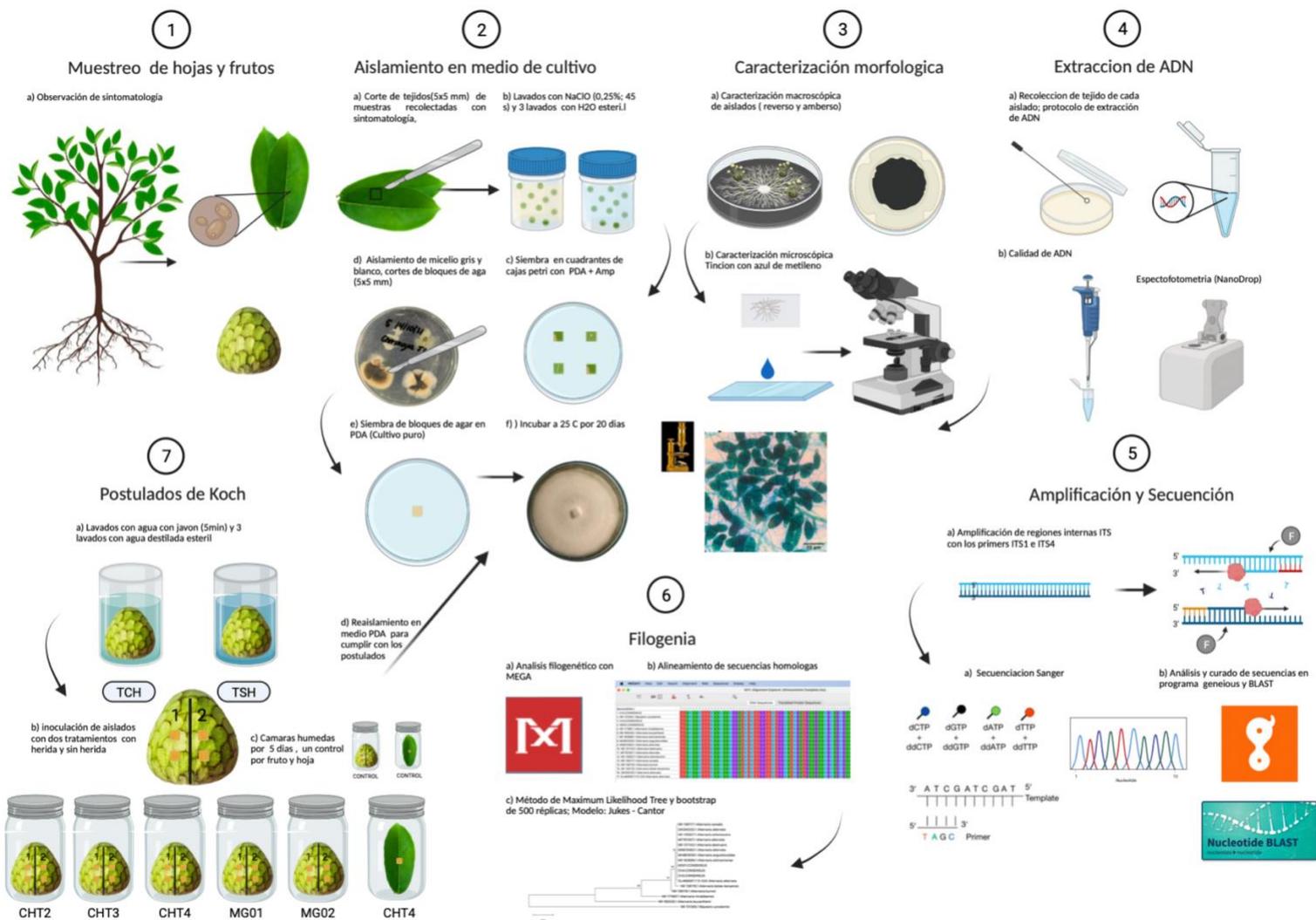
Hipótesis

El agente causal de los síntomas de necrosis en hojas y pudrición del fruto en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) pertenece al género *Botrytis*.

Capítulo III: Materiales y Métodos

Figura 4

Flujo de trabajo de integración curricular



Nota. Creado en BioRender.c

Muestreo y sintomatología

Se recolectaron muestras de dos diferentes ubicaciones (Tabla 2), en las instalaciones de Agrocalidad de Tumbaco y Guayllabamba, el once de noviembre del 2021. En campo se tomaron muestras de hojas que presentaban síntomas de necrosis desde el margen o limbo hacia la nervadura y en el caso de frutos, los que presentaban síntomas de pudrición y moho en la superficie del epicarpio. Las muestras se recolectaron en fundas ziploc y se almacenaron en refrigeración a -4 °C para su mantenimiento.

Tabla 2

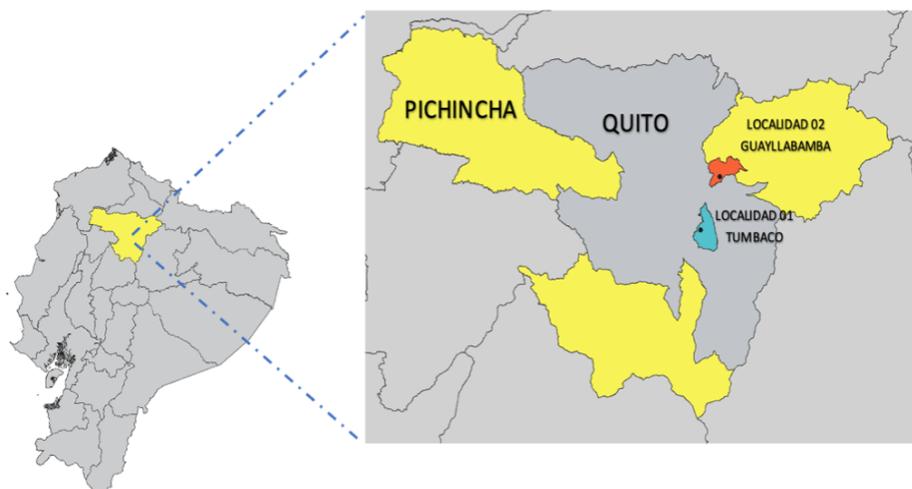
Ubicaciones de muestreo

Localidad	Ubicación	Coordenadas
1	Agrocalidad Tumbaco	0°12'56.3"S 78°24'42.6"W
2	Guayllabamba	°04'25.2"S 78°21'16.7"W

Nota. Tomadas con GPS

Figura 5

Ubicación geográfica de lugar de muestreo



Nota. Creado en QGIS v3.20.1

Identificación Morfológica

Aislamiento en Medio de cultivo

Se colocaron hojas completas y frutos de las muestras recolectadas, de cada localidad, sin desinfección previa en cámaras húmedas. Después de 5 días se tomó el micelio de cada muestra y se sembró en cajas Petri con papa–dextrosa–agar (PDA), suplementado con 1 μ L/ml de antibiótico (Ampicilina).

Se tomaron trozos de tejido de las muestras recolectadas, de cada localidad. Los tejidos de interés se obtuvieron con la ayuda de un bisturí estéril, cortando fragmentos de tejido cerca de posibles síntomas de la enfermedad, aproximadamente de 5x5 mm. Estos fragmentos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 0,25% durante 45 seg, se lavaron con agua destilada estéril, se secaron en una caja Petri previamente esterilizada para eliminar los residuos de humedad que puedan contribuir con la contaminación del aislado. Finalmente se sembraron cuatro cortes por caja, uno en cada cuadrante de las cajas Petri con papa–dextrosa–agar (PDA) suplementado con 1 μ L/ml de antibiótico (Ampicilina). Se sembraron 3 cajas Petri con cortes de hojas y tres con cortes de fruto. Las placas de agar se incubaron a 25° C , posteriormente cada aislado con micelio gris fue sembrado en placas de PDA por separado con el fin de establecer un cultivo puro.

Caracterización macroscópica

Para la descripción macroscópica se tuvieron en cuenta criterios como el color, forma (esponjoso, algodonoso o vellosa), borde, densidad del micelio y penetración en el medio mediante observación directa de los aislados.

Caracterización microscópica

Se realizaron observaciones al microscopio en los objetivos de 10x y 40X, se realizó una tinción con azul de metileno, para verificar la morfología de las hifas, conidios, el micelio y características específicas del patógeno (Woudenberg et al., 2013). En cuanto a la descripción microscópica se basa en la forma y tamaño de las conidios, estructura y disposición de las hifas.

Identificación molecular

Extracción y cuantificación de ADN

El ADN genómico se extrajo del micelio cultivado en agar papa–dextrosa–agar (PDA), mediante un protocolo estándar. Se tomaron aproximadamente 50 mg de muestra en un tubo de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio, estériles, se adicionaron 500 uL de buffer de extracción (2,5% w / v CTAB, 1.4 M NaCl, EDTA 20 mM, Tris HCl 100 mM [pH 8,0]) y 2 ul de B-mercaptoetanol. Posteriormente se agitaron los tubos para macerar la muestra vigorosamente usando un vortex, hasta que el tejido quede pulverizado. Se incubó en baño maría a 60 ° C por 30 min y se mezcló invirtiendo cada 10 minutos. Se añadió 500 uL de cloroformo frío y se homogeneizó en Vortex por 30 segundos, luego se centrifugó a 14.500 xg 5 10 min. Se tomó 300 uL de sobrenadante, en un nuevo tubo estéril de 1.5 mL. Se añadió 300 uL de etanol absoluto frío, 150µL de Acetato de sodio 3M y 300 uL de etanol 70% filtrado, para precipitar el ADN. Se almacenó a -20° C toda la noche. Se centrifugó a 14.500 xg durante 15 min y se eliminó el sobrenadante. En cámara de flujo se realizaron 2 lavados con 200 uL de etanol al 70%, se centrifugó durante 1 min descartando el etanol por inversión. Finalmente se secó el pellet durante 15 a 20 min, y resuspendió en 35µL de agua DEPC, añadiendo 1ul RNAsa en incubando por 30 min a 37 ° C. Posteriormente se cuantificó la concentración del ADN en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ Espectrofotómetros NanoDrop™ 2000/2000c).

Amplificación y cuantificación por PCR

Para la identificación molecular de *B. cinerea* se definió la región ITS y los genes G3PDH, y RPB2 (White et al., 1990); (Staats et al., 2005). Para la amplificación de las regiones internas ITS1 e ITS2 se usaron los iniciadores universales ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). La mezcla de reacción de PCR constó de: agua ultra pura estéril, 9,5 μ L; cebadores ITS1 e ITS4 1 μ L; Taq-DNA polimerasa 12,5 μ L; y 1 μ L muestra problema de ADN con una concentración de 182 ng/ μ L, con volumen final de 25 μ L. La reacción se efectuó en un termociclador (nombre de equipo) con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 95 °C, 1 min (1 ciclo) ; desnaturalización a 95 °C, 30 seg ; alineamiento a 55 °C, 1 min; una extensión inicial a 68 °C, 90s (35 ciclos); extensión final a 68 °C, 7 min (White et al., 1990). Para amplificar los fragmentos de genes RPB2 se usaron los cebadores universales RPB2-F (GATGATCGTGATCATTCGG), RPB2-R (CCCATAGCTTGCTTACCCAT) y la reacción se efectuó en con el siguiente perfil, desnaturalización inicial a 95 °C, 2 min (1 ciclo) ; desnaturalización a 95 °C, 30 seg ; alineamiento a 58°C, 1 min; una extensión inicial a 68 °C, 4 min (30 ciclos); extensión final a 68 °C, 10 min (Staats et al., 2005). Los amplicones se observaron mediante electroforesis en un gel de agarosa de concentración de 1 %, a 90V por 35 min en TBE. Se visualizó el producto de amplificación en un transiluminador (nombre del equipo) (Notte et al., 2021).

Secuenciación y Análisis de secuencias

Los productos de PCR se secuenciaron con el método de PCR de terminación de cadena (Sanger), servicio prestado por MacroGen Incorporated (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se curaron utilizando el programa Geneious Prime® 2022.0.1 y se compararon con la base de

datos curadas del GenBank mediante el programa BLAST, para determinar la identidad de los aislados

Análisis filogenético

Para inferir la historia evolutiva de los aislados se hizo un análisis filogenético utilizando el programa MEGA 11 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11) con el método de Maximum Likelihood Tree y bootstrap de 500 réplicas. La distancia evolutiva se calculó mediante el modelo matemático de dos parámetros Jukes - Cantor. En el análisis se incluyeron las secuencias obtenidas de Genbank (Tabla 3).

Tabla 3

Secuencias para análisis filogenético obtenidas del Genbank

N Accesoión	Especie	Origen
OL468587.1	<i>Alternaria alternata</i>	Corea
OK345332.1	<i>Alternaria alternata</i>	Egipto
MF767407.1	<i>Alternaria alternata</i>	Ecuador
MN610563.1	<i>Alternaria alternata</i>	Ecuador
NR_136118.1	<i>Alternaria betae-kenyensis</i>	EE.UU
MH861939.1	<i>Alternaria angustiovoidea</i>	Egipto
NR_137143.1	<i>Alternaria destrudens</i>	EE.UU
NR_163686.1	<i>Alternaria alstroemeriae</i>	EE.UU
NR_135927.1	<i>Alternaria arborecens</i>	EE.UU
NR_136117.1	<i>Alternaria cerealis</i>	EE.UU
NR_136120.1	<i>Alternaria leucanthemi</i>	EE.UU

N Accesoión	Especie	Origen
NR_136119,1	<i>Alternaria bursni</i>	EE.UU
NR_171997.1	<i>Alternaria mirabibensis</i>	EE.UU
NR_131305.1	<i>Bipolaris cynodontis</i>	España

Postulados de Koch

Las pruebas se desarrollan con el objetivo de observar la capacidad patogénica de los aislados, de generar síntomas de alguna enfermedad sobre los frutos y hojas sanas de chirimoya. Se seleccionaron frutos entre 7 y 8 cm de diámetro. Los frutos seleccionados se lavaron en agua corriente y jabón durante 3-5 minutos, posteriormente dos lavados con agua estéril, y finalmente se secaron con papel toalla. En el caso de las hojas se lavaron en agua corriente y jabón durante 3-5 minutos, posteriormente se lavaron en cloro al 0,25% durante 1 minuto, finalmente se realizaron 2 lavados con agua estéril. Con el fin de mantener un ambiente de alta humedad y favorecer el crecimiento y penetración del hongo, se usaron recipientes como cámara húmeda, mediante la adición de agua destilada estéril por medio de tiras en los costados del recipiente, evitando el contacto directo con el fruto. Cada fruto fue dividido longitudinalmente con un marcador para diferenciar los dos tratamientos. Se establecieron dos tratamientos, con 5 aislados y dos repeticiones más el control. En el tratamiento número 1 se colocaron bloques de agar con crecimiento micelial, sobre heridas realizadas en la superficie del fruto, mientras que en el tratamiento 2 se colocaron bloques de agar de crecimiento micelial sobre la superficie del fruto sin heridas. Se estableció como control negativo bloques de PDA en la superficie del fruto con heridas y sin heridas. Para todos los tratamientos se usaron bloques de 5x5 mm de agar con micelio, extraídos de cajas Petri con la colonia de cada aislado. Luego de la inoculación, las cámaras húmedas se revisaron diariamente por un periodo de tiempo de 5

días, para determinar la aparición de los síntomas, o crecimiento superficial del micelio. En el caso de las hojas se observaron síntomas hasta 7 días. Finalizado el periodo de incubación se aislaron en medios PDA y se comprobaron los postulados de Koch al observar las características morfológicas de las colonias obtenidas.

Capítulo IV: Resultados

Descripción de los síntomas

Se observó que las hojas presentan manchas necróticas desde el borde hacia el limbo a las cuales se les realizó el aislamiento correspondiente

Figura 6

Muestras con sintomatología. (A) Hoja con síntomas de enfermedad. (B) Fruto con síntomas de enfermedad



Aislamiento de muestras con síntomas

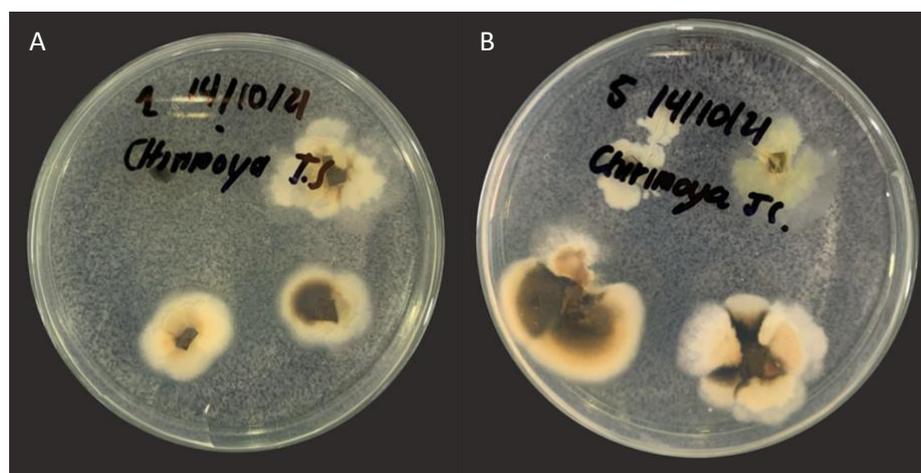
Se observó a los cuatro días un crecimiento de los aislados de las muestras de hojas (Figura 7A) y frutos que presentaron síntomas (Figura 7B). Se re aislaron en nuevas cajas Petri con PDA, suplementado con ampicilina aquellos que presentaron micelio gris, y blanco.

Se obtuvieron 3 aislados provenientes de la localidad de Tumbaco, dos aislados a partir de hojas (CHT2 y CHT3) y uno a partir de fruto (CHT4). Además, dos aislados a partir de muestras de hoja MGO1 y MGO2 provenientes de la localidad de Guayllabamba. A los 25 días, existió un crecimiento completo y cubrió todo el medio de cultivo. Se describieron las características

macroscópicas y microscópicas de los aislados con tinción con azul de metileno, en donde se observó estructuras como hifas, conidióforos y conidios.

Figura 7

Aislados de muestras con sintomatología. (A) Cultivo de cortes de 5x5 mm de hojas. (B) Cultivo de cortes de 5x5 mm de fruto



Identificación Morfológica

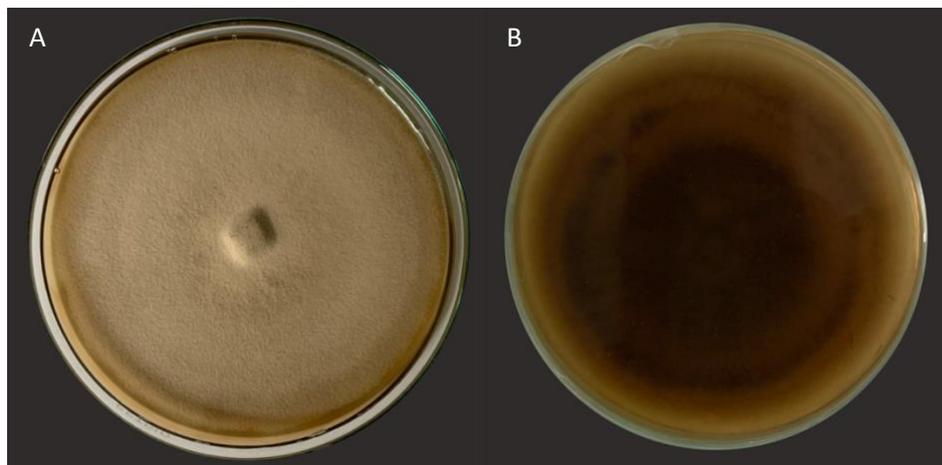
Aislado (CHT2)

Descripción macroscópica

A partir del aislamiento de manchas café sobre las hojas se observó crecimiento de colonias de color café claro, de aspecto ligeramente algodónoso y borde definido (Figura 8A). Inicialmente el micelio fue de color blanco a los 5 días, posteriormente tomó una tonalidad gris a los 10 días de crecimiento. En el reverso se observa un crecimiento ramificado de color café claro y oscuro, el medio con una tonalidad café oscuro (Figura 8B).

Figura 8

Colonia de aislado CHT2 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento de micelio. (B) Vista posterior del cultivo.

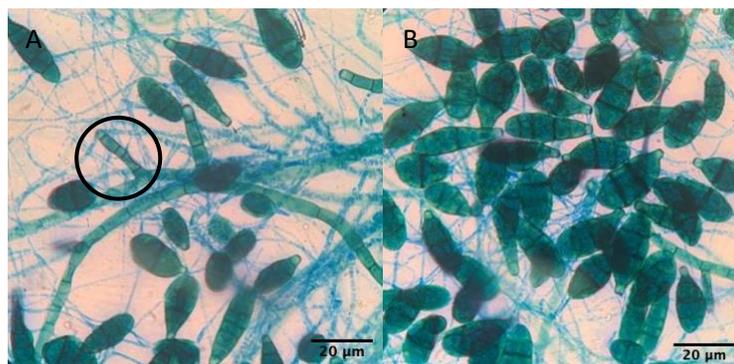


Descripción microscópica

Se observan hifas alargadas con ramificación alternada con conidióforos con valores medios de $(31,39 \times 3,29) \mu\text{m}$ (Figura 9A), existió la presencia de conidios elipsoidales alargadas en promedio de $(22,51 \times 9,24) \mu\text{m}$ (Figura 9B) y $(22,50 \times 8,08) \mu\text{m}$ (Figura 9C) con 2 a 7 septos longitudinales y algunos con 1 a 3 transversales, los conidios tienen prolongación apical.

Figura 9

Aislado CHT2. (A) Conidióforos marcados con un círculo. (B) Conidios con tinción de azul de metileno.



Aislado (CHT3)**Descripción macroscópica**

El aislado CHT3 presentó un crecimiento ramificado irregular, en un inicio existió una coloración blanca, conforme su crecimiento se torno a una colonia con tintes grisáceos (Figura 10A). En el reverso se observo ramificaciones de color crema, con tonalidades de color café de forma irregular (Figura 10B). Se observó conidiomas o picnidios a partir de los 28 días, de aspecto globoso, con una distribución irregular, agrupados y solitarios, de color negro con un tamaño de 2mm (Figura 11).

Figura 10

Colonia de aislado CHT3 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de micelio. (B) Vista posterior del cultivo.

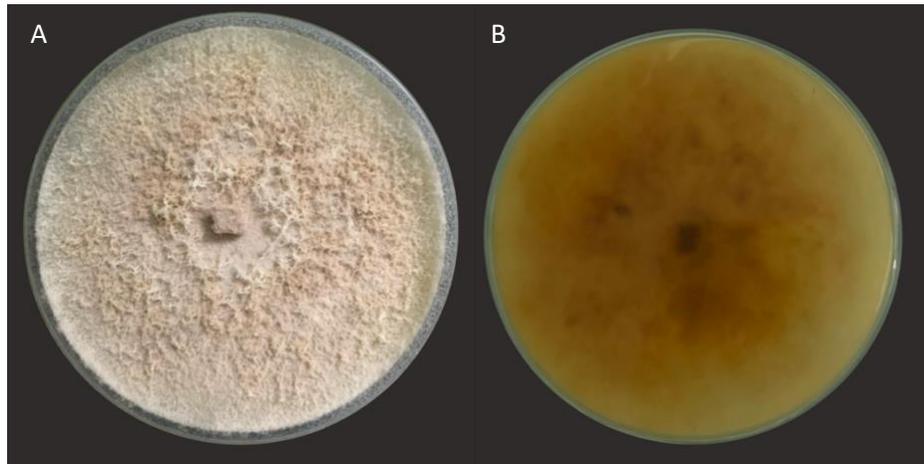


Figura 11

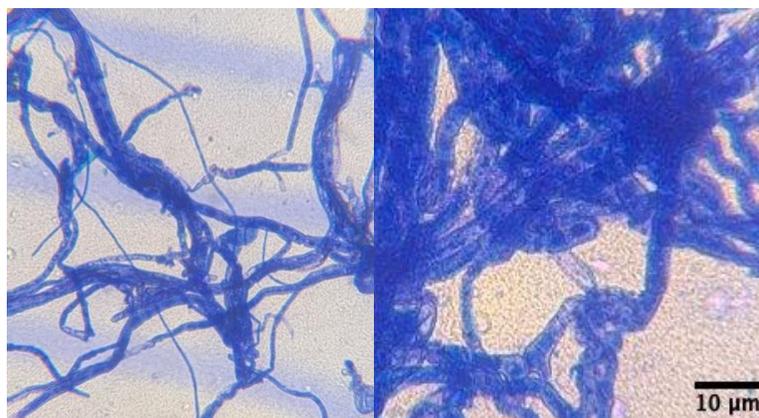
Conidiomas o picnidios a los 28 días de crecimiento

**Descripción microscópica**

En el aislado CHT3 se observan hifas alargadas con ramificación irregular, no se puede diferenciar una ramificación constante, existió la presencia de conidios aceptados, bigutulados, hialinos, elipsoides, lisos, de forma redonda, se observan en cadenas individuales o ramificadas.

Figura 12

Aislado CHT3. Conidios marcados con un círculo, tinción con azul de metileno.



Aislado (CHT4)

Descripción macroscópica

En el aislado proveniente de cortes de fruto con la sintomatología. Se observó a los 5 días un crecimiento de micelio de color blanco, se tornó de color grisáceo a los 10 días. El micelio es de color gris verdoso con bordes definidos y aspecto algodonoso, en la parte externa presenta una coloración más oscilara, en la parte central del crecimiento es de color gris (Figura 13A). En el reverso existe un crecimiento radial de café oscuro y café claro, en el centro se tornó de color negro por la acumulación de micelio (Figura 13B).

Figura 13

Colonia de aislado CHT4 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento de micelio. (B) Vista posterior del cultivo.

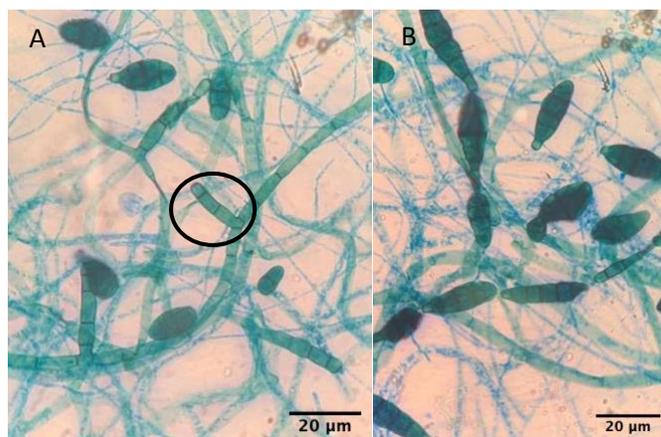


Descripción microscópica

Se observan hifas alargadas con ramificación alternada con conidióforos cortos con valores medios de $(33,07 \times 3,90) \mu\text{m}$ (Figura 14A). Los conidios son elipsoides o largos ovoides, en promedio de $(21,98 \times 7,49)$ (Figura 14B) y $(21,19 \times 58,89) \mu\text{m}$ (Figura 14C) con múltiples tabiques transversales y longitudinales. Se observaron conidios en cadenas individuales o ramificadas que salen de conidióforos cortos (Figura 14B).

Figura 14

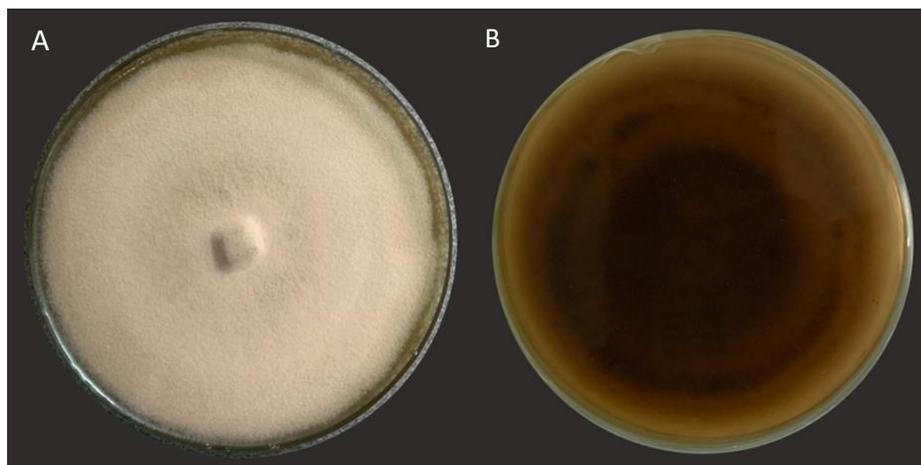
Aislado CHT4. (A) Conidióforos marcados con un círculo. (B) Conidios con tinción de azul de metileno.

***Aislado (MG01).*****Descripción macroscópica**

En el aislado proveniente de cortes de fruto con la sintomatología observada en la ciudad de Guayllabamba. Se observó a los 5 días un crecimiento de micelio de color blanco, se tornó de color grisáceo a los 10 días. El micelio es de color gris con bordes definidos y aspecto algodonoso, en la parte externa presenta una coloración ms oscura, en la parte central el crecimiento es de color claro (Figura 15A). En el reverso existe un crecimiento radial de color café oscuro, en el centro se tornó de color negro (Figura 15B).

Figura 15

Colonia de aislado MG01 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento radial de las hifas. (B) Vista posterior del cultivo.



Descripción microscópica

Se observan hifas alargadas con ramificación alterna con conidióforos cortos con valores medios de $(24,48 \times 3,19) \mu\text{m}$ (Figura 16A). Los conidios son elipsoides o largos ovoides, en promedio de $(17,26 \times 5,78) \mu\text{m}$ (Figura 16B) y $(16,490 \times 5,06) \mu\text{m}$ (Figura 16C). Se observan en cadenas individuales o ramificadas, sujetas a un conidióforo (Figura 16C).

Figura 16

Aislado MG01. (A) Conidióforos en círculo (B) Conidios con tinción de azul de metileno.

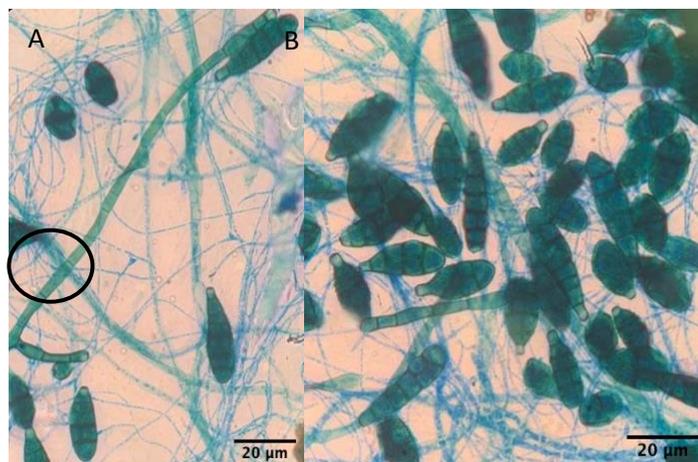


Tabla 4*Medidas de conidióforos en micrografías.*

CHT2		CHT4		MG01	
Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
27.104	3.824	28.841	3.750	23.293	3.400
22.984	2.574	29.010	4.000	26.751	2.236
44.103	3.473	41.371	3.953	23.405	3.953
31.397	3.290	33.074	3.901	24.483	3.196

Nota. Medidas tomadas en el programa ImageJ, unidad de medida μm **Tabla 5***Medidas de conidios en micrografías.*

CHT2				CHT4				MG01			
A		B		A		B		A		B	
Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho	Largo	Ancho
29.559	8.085	30.320	5.957	29.278	6.070	22.134	7.915	22.897	7.752	32.494	10.976
27.169	9.866	18.883	7.619	27.980	9.536	22.789	10.048	16.858	6.585	29.544	6.477
15.357	10.714	18.931	7.915	17.276	6.667	19.755	5.429	34.488	7.915	25.755	7.915
17.438	10.373	27.819	8.575	23.533	7.269	16.213	7.567	31.519	7.454	23.002	6.970
19.286	9.289	21.668	7.079	20.405	10.487	26.484	10.926	17.440	7.335	23.814	8.333
26.162	9.200	20.141	7.752	18.240	7.253	21.620	8.657	19.590	6.263	23.260	8.732
23.079	9.273	18.571	8.347	18.616	8.337	20.511	8.781	17.621	9.060	23.527	6.190
23.159	10.337	20.716	8.109	26.041	5.523	14.506	12.049	22.700	5.967	18.172	7.529

23.099	5.995	16.824	10.714	22.638	7.163	25.490	8.858	27.742	8.032	14.383	5.719
20.802	9.286	31.184	8.732	15.869	6.620	21.553	8.755	29.524	5.476	34.088	7.147
22,511	9.242	22.506	8.080	21.988	7.493	21.106	8.899	24.038	7.184	24.804	7.599

Nota. Medidas tomadas en el programa ImageJ, unidad de medida μm

Aislado (MG02)

Descripción macroscópica

Se observó a los 5 días micelio aéreo, velloso de color blanco, tornándose amarillo en el centro del cultivo. El micelio no tiene bordes definidos y se desarrolló de forma irregular (Figura 17A). En el reverso existe un crecimiento radial de color blanco, crema y un poco amarillento (Figura 17B).

Figura 17

Colonia de aislado MG02 con un tiempo de desarrollo de 25 días en PDA (A) Vista frontal, de crecimiento radial de las hifas. (B) Vista posterior del cultivo.

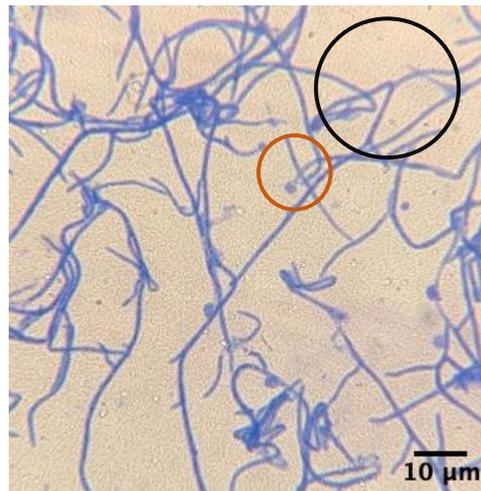


Descripción microscópica

Se observa la presencia de células conidiógenas monofiliales y polifialides, alargadas y delgadas con clamidosporas sencillas y terminales, se observan de forma redondeada al final de las células conidiógenas (Figura 18).

Figura 18

Aislado MG02, hifas y clamidosporas con azul de metileno. Lente 40X.



Nota. Circulo de color amarillo: clamidosporas

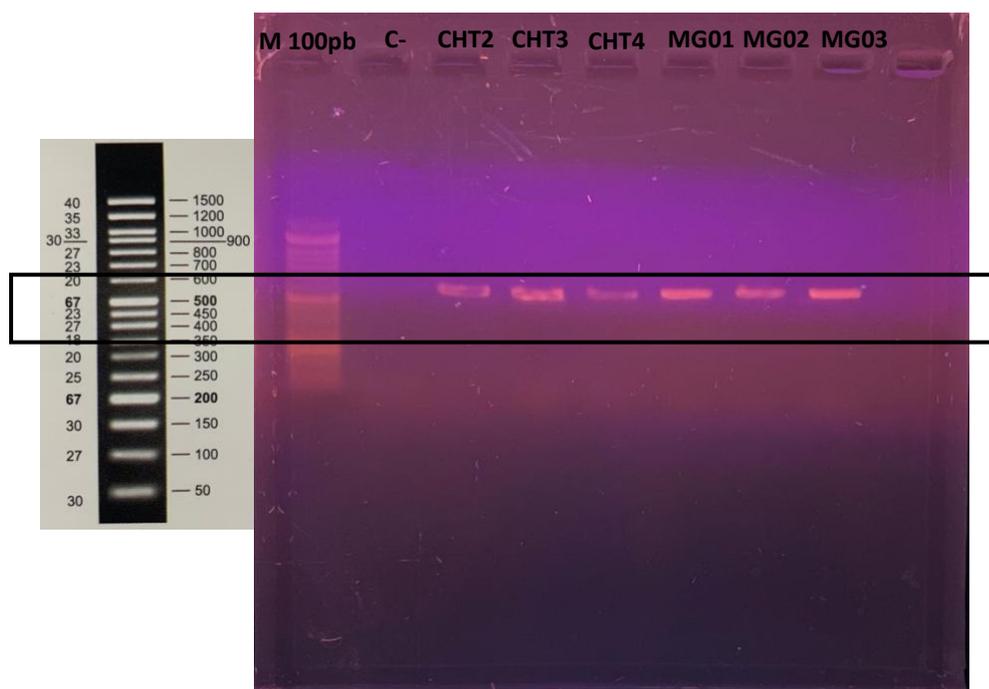
Identificación Molecular

Amplificación y secuenciación

Se obtuvieron amplicones de más de 500pb al comparar con las bandas del marcador de 100pb, se obtuvieron secuencias consenso, las cuales confirman los géneros de las muestras CHT2 como *Alternaria* sp., CHT3 como *Diaphorte* sp., CHT4 como *Alternaria* sp., MG01 como *Alternaria* sp., MG02 como *Fusarium* sp. (Tabla 20).

Figura 19

Electroforesis con los cebadores ITS 1, ITS 4



Nota. Bandas en el siguiente orden, Marcador de peso molecular de 100 pb, control negativo (C) aislados (CHT2, CHT3, CHT4, MG01, MG02).

Tabla 6

Resultados de identidad de las secuencias consenso con la base de datos BLAST

Muestra	Marcador	Especie	Query cover	Ident	Número de accesión
CHT2	ITS	<i>Alternaria alternata</i>	100%	100%	OL457258.1
CHT3	ITS	<i>Diaporthe foeniculina</i>	100%	98,08%	KY511328.1

CHT4	ITS	<i>Alternaria alternata</i>	100%	100%	OM049821.1
MG01	ITS	<i>Alternaria alternata</i>	100%	100%	OM022026.1
MG02	ITS	<i>Fusarium equiseti</i>	97%	99,38%	KX196808.1

Tabla 7

Resultados de la secuenciación y similitud con base de datos de material tipo.

Muestra	Marcador	Especie	Q. Cover	Ident	Número de accesión
		<i>Alternaria alternata</i>	100%	100%	OL457258.1
CHT2		<i>Alternaria angustiovoidea</i>	100%	100%	MH861939.1
CH4	ITS	<i>Alternaria destrudens</i>	99%	100%	NR_137143.1
MG01		<i>Alternaria alstroemeriae</i>	100%	99,8%	NR_163686.1
		<i>Alternaria arborecens</i>	99%	99,8%	NR_135927.1

<i>Alternaria</i>	97%	99,79%	NR_136117,1
<i>cerealis</i>			
<i>Alternaria</i>	97%	99,57	NR_136120.1
<i>iridaustralis</i>			
<i>Alternaria</i>	96%	99,79%	NR_136119,1
<i>bursni</i>			

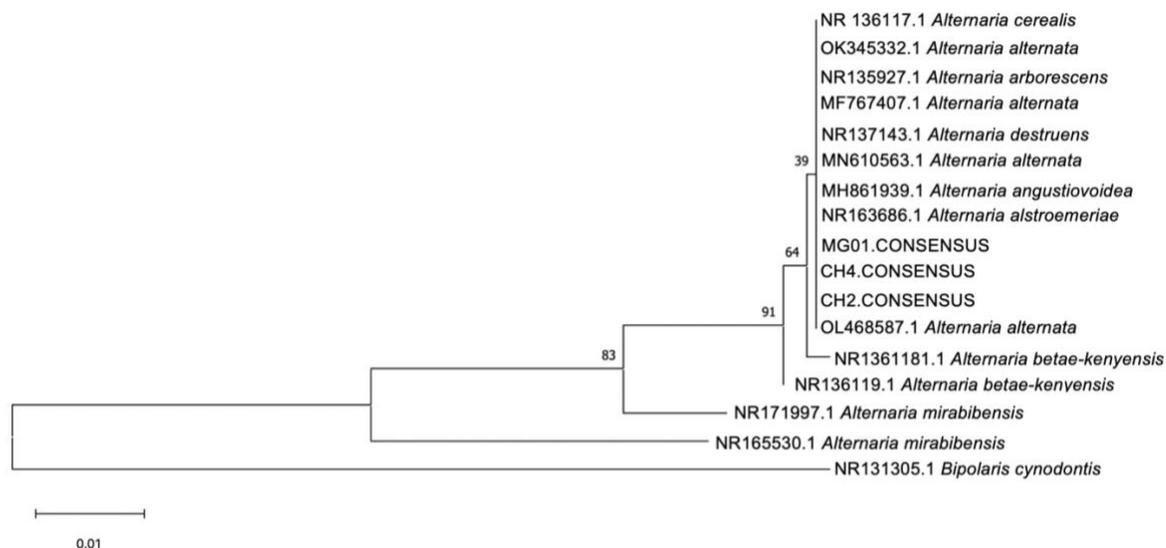
Análisis filogenético

El árbol filogenético se construyó con las secuencias consenso de los aislados CHT2, CHT4, MG01 del gen ITS, junto con las secuencias de las bases de datos del Genbank que presentaron identidad tomando en cuenta las secuencias con identidad de material tipo (Tabla 21). El árbol de máxima verosimilitud se construyó en base al modelo matemático de Jukes – Cantor, con apoyo de bootstraps para 500 repeticiones (Figura 22).

El árbol muestra que los aislados CHT2, CHT4, MG01, se agrupan en un solo clado junto con cuatro secuencias de *Alternaria alternata*, *Alternaria betae-kenyensis*, *Alternaria angustiovoidea*, *Alternaria destrudens*, *Alternaria alstroemeriae*, *Alternaria arborecens*, *Alternaria cerealis*, *Alternaria bursni*, con valores de soporte de 91. Y valores mas bajos en los nodos más profundos con valores de 64 y 39 (Figura 22A).

Figura 20

Árbol de Máxima verosimilitud de *Alternaria* sp, basado en el locus ITS.



Nota. Creado en MEGA 11. *Bipolaris cynodontis* se utilizó como outgroup. Se usó el modelo matemático de Jukes – Cantor. Los porcentajes en los nodos indican en apoyo de bootstraps para 500 repeticiones.

Postulados de Koch

Los resultados de la inoculación de los aislados CHT2, CHT4, MG01 variaron en los dos tratamientos con y sin heridas; después del periodo de incubación se observó un crecimiento del microorganismo inoculado sobre los bloques de agar. En los FCH (frutos con herida) el micelio del hongo inoculado, proliferó internamente en toda el área de la herida donde fue colocado el bloque de agar. En los FSH (frutos sin herida), se observaron manchas de color café en la superficie del fruto, al retirar el bloque de agar inoculado. El microorganismo desarrolló micelio visible sobre los tejidos afectados, característica de la enfermedad por *Alternaria* sp. bajo condiciones húmedas. No existió crecimiento en los controles.

Figura 21

Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado CHT2 (Alternaria sp). (A) Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta. (B) Bloque de agar con crecimiento. (C) Tratamiento Con herida (TCH) (D) Tratamiento sin herida (TSH).



Nota. Circulo de color amarillo: mancha de color café

Figura 22

Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado CHT4 (Alternaria sp). (A)

Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta (B) Bloque de agar con crecimiento. (C) Tratamiento con herida (TCH), (D) Tratamiento sin herida (TSH).



Nota. Circulo de color amarillo: mancha de color café

Figura 23

Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado MG01 (Alternaria sp). (A) Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta. (B) Bloque de agar con crecimiento. (C) Tratamiento con herida (TCH). (D) Tratamiento sin herida (TSH).



Nota. Circulo de color amarillo: mancha de color café

En el caso del aislado CHT3 después del periodo de incubación; se observó crecimiento de micelio sobre los bloques de agar. En los FCH (frutos con herida) el micelio del hongo inoculado, prolifera internamente en toda el área de la herida donde fue colocado el bloque de agar. Mientras que en el caso del aislado MG02, existe un crecimiento rápido cubriendo casi en

su totalidad la superficie de la cara en la que se inocularon los bloques de agar, sin embargo, en el tratamiento sin herida existe un crecimiento más lento.

Figura 24

Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado CHT3 (Diaporthe sp). (A)

Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta. (B) Bloque de agar con crecimiento. (C)

Tratamiento con herida (TCH). (D) Tratamiento sin herida (TSH).



Figura 25

Análisis de síntomas a los 5 días de la inoculación del aislado MG02 (Fusarium sp). (A)

Crecimiento de micelio en la superficie de la fruta. (B) Bloque de agar con rápido crecimiento. (C)

Tratamiento con herida (TCH). (D) Tratamiento sin herida (TSH).

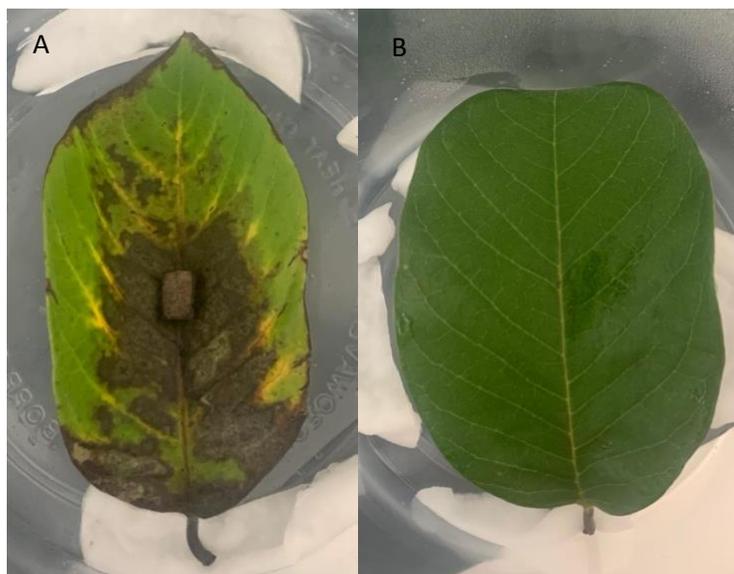


Nota. Circulo de color amarillo: mancha de color café

Se realizaron inoculaciones de bloques de agar en hojas. Trascurrido 7 días se observó el crecimiento de una mancha de color café con bordes definidos que se extendió desde el bloque de agar hacia el borde de la hoja (Figura 28A). No existió crecimiento en el control (Figura 28B).

Figura 26

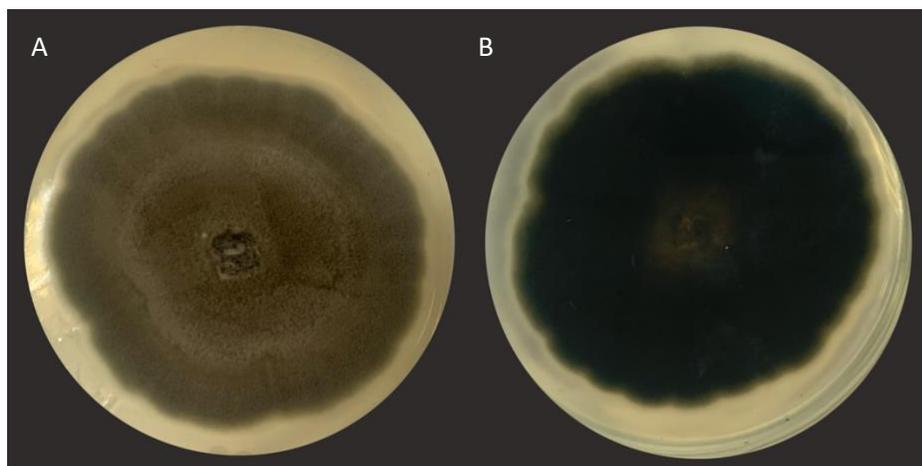
Análisis de síntomas a los 7 días de la inoculación del aislado CHT4 (Alternaria sp). (A) crecimiento con bloque de agar. (B) Control



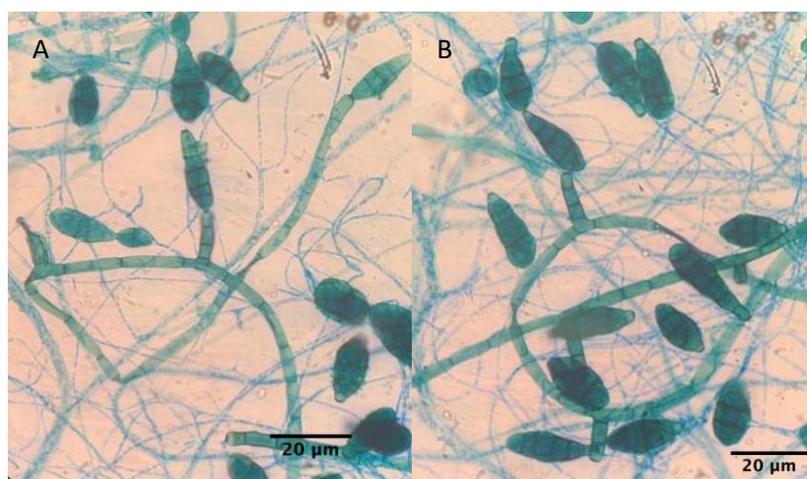
Se pudo reaislar el hongo que producía síntomas, en el tratamiento sin herida (TSH) en el cual se inoculó el aislado CHT4 (Figura 22D), mediante un corte de la superficie del fruto en la que se presentaron manchas negras. Se observó una colonia de color gris a los 5 días y de color verde oliva a los 20 días de crecimiento (Figura 28A), al reverso se observa un crecimiento de color negro (Figura 28B). Se observó al microscopio la presencia conidióforos ramificados con un valor medio de $(27,83 \times 3,93) \mu\text{m}$ (Figura 29A) y conidios elipsoidales o largos ovoides, en promedio de $(21,10 \times 7,67) \mu\text{m}$ (Figura 29B). Concuerta con la identificación morfológica de los aislados CHT2, CHT4, MG01.

Figura 27

Colonia de reislado CHT4 con un tiempo de desarrollo de 12 días en PDA (A) Vista frontal, de micelio.(B) Vista posterior del cultivo.

**Figura 28**

Reislado CHT4 (A) conidióforos (B) conidios con tinción de azul de metileno. Barra de escala 20um.



Capítulo V: Discusión

Este estudio tuvo como objetivo caracterizar morfológica y molecularmente el agente causal de síntomas de necrosis en hojas y pudrición en frutos. en plantas de chirimoya. Se había establecido como hipótesis que *Botritis cinerea* es el causante de necrosis foliar y pudrición del fruto. La toma de muestras se baso en la presencia de un atizonamiento o necrosis de color café desde el margen hacia el limbo de la hoja, síntomas descritos por Cotroneo y colaboradores (1998). De igual manera Williamson y colaboradores (2007) describen los síntomas en hojas maduras como una lesión de color marrón castaño con margen amarillo.

La caracterización macroscópica mostro a los aislados CHT2, CHT4, CHT3, como colonias de color gris, verde oliva y café claro con bordes definidos y aspecto algodonoso, al reverso un crecimiento radial de color café claro y negro, consistente con Rivas y Mühlhauser (2014) con el genero *Alternaria* quien describe como el desarrollo de colonias planas y algodonosas de coloración blanca grisácea inicialmente y posteriormente de color café o verde oliva oscuro y el reverso lo describe de color café oscuro a negro, como resultado del depósito de pigmento dihidroxinaftaleno-melaninas. Woudenberg y colaboradores (2013) coinciden con una descripción de colonias de color gris, marrón negruzco oscuro o negro. Latinović y colaboradores (2014), describen que los aislamientos tienen un crecimiento radial al reverso, de color negro hollín, concordando con nuestra descripción de las colonias.

En cuanto al aislado CHT3, se desarrollaron colonias con crecimiento ramificado irregular, de color blanco con tintes grisáceos, y amarillentos. Lo cual concuerda con la descripción de Chaisiri y colaboradores (2021). Guarnaccia y colaboradores (2018) muestra las colonias de *Diaporthe* blancas ligeramente algodonosas con márgenes lisos y al reverso de apariencia cremosa de color amarillo y café. Se observó conidiomas (picnidios) a partir de los 20

días, de aspecto globoso, con una distribución irregular, agrupados y solitarios, de color negro, de 2mm lo cual concuerda con Chaisiri y colaboradores (2021). En el aislado MG02 durante el crecimiento de la colonia no tiene bordes definidos y se desarrolló de forma irregular. En el reverso existe un crecimiento radial de color blanco, crema y un poco amarillento, lo cual se menciona en otro estudio de Özarslandan y Akgül (2020) en *Fusarium*, describen un crecimiento de colonias blancas, aéreas y de rápido crecimiento.

Los aislados crecieron en medio PDA suplementado con ampicilina a una temperatura de 25 °C, en un periodo de 10-25 días, en oscuridad Woudenberg y colaboradores (2013) incubaron los cultivos a temperatura de 22 °C en un periodo de 5-7 días, con un fotoperiodo de 8 horas. *Alternaria* también se desarrolla a una temperatura de 24 °C, en un periodo de 7 días en oscuridad (Kurt et al., 2010). Los medios de cultivo PDA se suplementaron con ampicilina para inhibir el crecimiento bacteriano (Guevara et al., 2019). En las observaciones microscópicas de los aislados, se realizaron tinciones con azul de metileno para observar estructuras fúngicas, como hifas, conidios, conidios (Parker et al., 2020).

En los aislados CHT2, CHT4 Y MG01 se observaron hifas alargadas y tabicadas con ramificación alterna con conidióforos cortos, Los conidios son elipsoides o largos ovoides, con múltiples tabiques transversales y longitudinales, concordando con lo descrito en un estudio de *Alternaria alternata* en fruta en la higuera (*Ficus carica*) realizado por Latinović y colaboradores (2014). Se observa otra característica presente en los conidios, un pico cónico corto, como lo describen en un estudio de *Alternaria alternata* en frutos Kurt y colaboradores (2010). Los conidióforos se describieron como tabicados y cortos, con medidas en promedio de (31,39 x 3,29) μm , para el aislado CHT2, (33,07 x 3,90) y (15,47 x 5,440) μm para el aislado CHT4 y (24,48 x 3,19) μm para el aislado MG01, los cuales están dentro del rango (30 a 65 x 3 a 4,5) μm establecido por Latinović y colaboradores (2014). Los conidios también se presentan en cadenas

de 3 a 7 y presentan de 2 a 5 tabiques transversales y algunos tabiques longitudinales, lo cual concuerda con Latinović y colaboradores (2014) y Guevara y colaboradores (2019).

Los conidios presentaron valores medios de (22,51 x 9,24) y (22,50 x 8,08) μm , para el aislado CHT2, (15,04 x 6,32) y (15,47 x 5,440) μm para el aislado CHT4 y (15,04 x 6,32) y (15,47 x 5,440) μm para el aislado MG01, los cuales están dentro del rango (10 a 35 x 5 a 9) μm establecido por Latinović y colaboradores (2014), (18 a 32 x 5 a 14) μm establecido por Kurt y colaboradores (2010), (16 a 43 x 9 a 13) μm descrito por Guevara y colaboradores (2019) y (9 a 25 x 5 a 10) μm (Anwaar et al., 2021). Los resultados de medidas de conidios permiten determinar diferencias de una especie de otra, pero no de manera precisa.

En el aislado CHT3, se observan conidios aceptados, bigutulados, hialinos, elipsoides, lisos, de forma redonda, se observan en cadenas individuales o ramificadas, con una dimensión de (7,98 x 3,26) μm , lo cual concuerda con el rango de (7,2–8 x 3,1–4,1) μm establecido por Chaisiri y colaboradores (2021).

La caracterización molecular basado en técnicas como la amplificación por PCR la amplificación usando cebadores específicos, seguido de secuenciación, son estrategias confiables para la identificación y detección de especies de hongos (Rivas & Mühlhauser, 2014). Por lo que es necesario caracterizar molecularmente los aislados CHT2, CHT3, CHT4, MG01, MG02 para su identificación de manera más precisa. Se logró generar secuencias consenso para análisis BLAST a partir de la secuenciación usando los cebadores ITS1/ITS4 de la región del espaciador transcrito interno (ITS). Latinović y colaboradores (2014) mencionan que el análisis BLAST de las secuencias ITS1/ITS4 permite la determinación de identidad con especies de *Alternaria sp.*

El análisis BLAST de las secuencias consenso mostró que los aislados CHT2, CHT4 y MG01 tienen un 100% de identidad con *Alternaria alternata*, y una búsqueda de homólogos con material tipo se obtuvo identidad con las especies *Alternaria alternata* (100%), *Alternaria angustiovoidea* (100%), *Alternaria destrudens* (100%), *Alternaria alstroemeriae* (99,8%), *Alternaria arborecens* (99,8%), *Alternaria cerealis* (99,79%), *Alternaria iridaustralis* (99,59%), *Alternaria bursni* (99,79%). En un estudio de clasificación de especies de *Alternaria* según la región ITS se informa que las longitudes de amplicón de las regiones ITS no varían entre el género *Alternaria* (Blagojević et al., 2020). De igual manera Kwon y colaboradores (2021) no encontraron diversidad de secuencias en la región ITS en 16 aislados de cuatro regiones diferentes de origen, con la excepción de una sustitución presente en un solo nucleótido, de T por C en uno de los aislados. En este estudio se tienen resultados consistentes con lo mencionado, en base a la identidad y a la variedad de especies que presentan altos porcentajes de identidad cercanos al 100%, con que impide identificar a nivel de especie los aislados obtenidos.

Según Woudenberg y colaboradores (2013), es necesario usar varios cebadores además de la según ITS como los de la región GAPDH con *gpd1* y *gpd2*, la región RPB2 con RPB2-5F2 y fRPB2-7cR y el gen TEF1 con los cebadores EF1-728F y EF1-986R, coincidiendo con Guevara y colaboradores (2019) quienes establecen el gen del factor de elongación 1 α (EF-1 α) usando los cebadores EF1-728F/EF1-986R para la identificación de la especie de *Alternaria alternata*.

El aislado CHT3 un 98,08% de identidad con *Diaporthe foeniculina*, y el aislado MG02 un 99,38% con *Fusarium equiseti*. Según Chaisiri y colaboradores (2021), la búsqueda MegaBlast para la región ITS en la base de datos de nucleótidos GenBank del NCBI, permite identificar el género *Diaporthe*.

El análisis filogenético mostró que los aislados CHT2, CHT4, MG01, se agrupan en un solo clado junto con cuatro secuencias de *Alternaria alternata*, *Alternaria betae-kenyensis*, *Alternaria angustiovoidea*, *Alternaria destrudens*, *Alternaria alstroemeriae*, *Alternaria arborecens*, *Alternaria cerealis*, *Alternaria bursni*, con valores de soporte de 91, y valores más bajos en los nodos más profundos, con valores de soporte de 64 y 39, esto es consistente con un estudio de Woudenberg y colaboradores (2013), en el que se realizó un árbol de filogenia con varias especies del género *Alternaria*. Las especies de *Alternaria* pueden cambiar y volverse más compleja debido a programas recientes de mejoramiento para cultivares resistentes a enfermedades (Kwon et al., 2021). Por lo cual no se puede definir de manera específica una sola especie de *Alternaria* para los aislados, solo se puede establecer que pertenecen al género de *Alternaria sp.*

Las pruebas de patogenicidad después de cinco días mostraron que los aislados CHT2, CHT4, MG01, generan necrosis en la superficie del tejido del fruto, observándose una mancha de color café en el TSH y un crecimiento del micelio en el TCH. En el estudio de Kurt y colaboradores (2010) se observaron manchas cafés y negras en la fruta inoculada 5 días después del tratamiento. De igual manera en un estudio de Guevara y colaboradores (2019) los síntomas se observaron en las frutas inoculadas con solución de esporas, después de 3 días, con manchas definidas de color café y negras en los sitios de inoculación. Los postulados se cumplen ya al reaislar en medio de cultivo un corte de la epidermis del fruto en la zona en la que se observó el síntoma, creció una colonia con las características descritas para *Alternaria*, y al observar al microscopio es consistente con la descripción y medidas de conidióforos y conidios.

El tiempo y síntomas podrían variar ya que en este estudio se usaron bloques de agar con micelio del hongo para la inoculación y en los estudios comparados soluciones de esporas. En cuanto al aislado CHT3 identificado dentro del género de *Diaporthe* no se observaron síntomas concluyentes con los descritos por otros estudios, ya que no existieron síntomas de melanosis en los frutos, síntomas descritos por Chaisiri y colaboradores (2021). En el caso del aislado MG02 se observó la presencia de manchas negras más definidas en el TSH y un crecimiento acelerado en el TCH y penetración del hongo en el fruto, estos resultados concuerdan con lo descrito en un estudio de *Fusarium* en frutos de Guanábana (*Annona muricata* L.), en el que se describen manchas negras en la superficie del fruto, y lo asocian con pudrición seca de frutos (Cambero-Ayón et al., 2019).

Sin embargo, *Alternaria* ha sido descrito como un género fúngico que incluye especies que actúan como fitopatógenos, parásitos facultativos débiles, saprofitos y endófitos, esto en gran medida se debe a la producción de fitotoxinas y micotoxinas (Lou et al., 2013). Se asocia con una variedad de síntomas en semillas, plantas, frutos, suelo y la atmósfera. Por lo cual las especies de *Alternaria* se ubican como patógenos vegetales graves, causan pérdidas relevantes en una amplia gama de cultivos (Kwon et al., 2021). Muchas de las especies son patógenas poscosecha importantes, causando efectos negativos, como la pudrición de frutos (Blagojević et al., 2020). Los productores de Carolina del Sur consideran que la mancha negra, o mancha foliar por *Alternaria*, es la enfermedad fúngica más importante a nivel de poscosecha (Keinath et al., 2021). Este estudio es relevante para el control fitosanitario durante la producción de chirimoya en las localidades de Tumbaco y Guayllabamba, ya que confirma la presencia de hongos del género *Alternaria* causando síntomas de necrosis en hojas y pudrición en frutos de este cultivo.

Capítulo VI: Conclusiones

Las características morfológicas macroscópicas de los aislados CHT2, CHT4 y MG01, es congruente con las descritas para *Alternaria*, incluyendo colonias con bordes definidos y de aspecto algodonoso de color gris, café claro o verde oliva, al reverso un crecimiento radial de tonalidad café o negro, desarrollándose en un lapso de tiempo de 10-25 días a 22 a 25 °C.

La morfología de los conidios de los aislados CHT2, CHT4 y MG01 coincide con la descrita para *Alternaria* mostrando conidios elipsoidales o largos ovoides de 3 a 7 tabiques transversales y 1 a 3 tabiques longitudinales con valores medios de (11,978 x 4,69) y (15,043 x 6,025); μm y conidióforos cortos con valores medios de (31,39 x 3,29) μm .

La amplificación, secuenciación y análisis BLAST mostraron que los aislados CHT2, CHT4 y MG01 pertenecen a *Alternaria*, pues sus secuencias presentaron un 100% de identidad con homólogos de especies de este género.

Los aislados de *Alternaria* son agentes causales de síntomas como necrosis en hojas y pudrición del fruto en plantas de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) en localidades de Tumbaco y Guayllabamba ubicados en la provincia de Pichincha

El análisis filogenético mostró que los aislados CHT2, CHT4, MG01, se agrupan en un solo clado con las especies *Alternaria alternata*, *Alternaria betae-kenyensis*, *Alternaria angustiovoidea*, *Alternaria destrudens*, *Alternaria alstroemeriae*, *Alternaria arborecens*, *Alternaria cerealis*, *Alternaria bursni*, con valor de soporte de 91.

Capítulo VII: Recomendaciones

Los síntomas de necrosis y pudrición del fruto de *Botritis* y *Alternaria* son similares, por lo que se recomienda tomar varias muestras de hojas, frutos y flores, y observar las características microscópicas con el fin de aislar el hongo de interés.

Establecer para el crecimiento de las colonias en futuros estudios varios fotoperiodos y temperaturas de incubación, para lograr que el hongo esporule en intervalos de tiempo más cortos.

Se recomienda utilizar más marcadores moleculares además de la región ITS, como GAPDH con los cebadores *gpd1* y *gpd2*, la región RPB2 con RPB2-5F2 y fRPB2-7cR, el gen TEF1 con EF1-728F y EF1-986R y el gen del factor de elongación 1 α (EF-1 α) usando los cebadores EF1-728F/EF1-986R, para una identificación y análisis filogenético más preciso.

Realizar los postulados de Koch en frutos inmaduros y maduros de Chirimoya, hojas y en plantas sanas para contrastar los síntomas y poder interpretar de manera más precisa los resultados. De igual manera probar con diferentes tipos de inoculación, como solución de esporas y punción en frutos.

Capítulo VIII: Bibliografía

- Aktaruzzaman, M., Afroz, T., Hong, S. K., Kim, B. S., & Choi, H.-W. (2021). First Report of Post-Harvest Gray Mold on Hyacinth bean (*Lablab purpureus*) Caused by *Botrytis cinerea* in Korea. *Plant Disease*. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-21-0457-PDN>
- Anwaar, H. A., Perveen, R., Chohan, S., Saeed, A., Cheema, M. T., Qadeer, A., Aslam, U. A., Ahmed, M. Z., Alam, M., Shafique, M. S., & Ali, A. (2021). First Report of *Alternaria alternata* Causing *Alternaria* Leaf Spot of Fig in Pakistan. *Plant Disease*, PDIS-05-21-0963-PDN. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-21-0963-PDN>
- Benito-Pescador, D., Santander, D., Arranz, M., Díaz-Mínguez, J. M., Eslava, A. P., van Kan, J. A. L., & Benito, E. P. (2016). Bcmimp1, a *Botrytis cinerea* Gene Transiently Expressed in planta, Encodes a Mitochondrial Protein. *Frontiers in Microbiology*, 7, 213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00213>
- Blagojević, J. D., Vukojević, J. B., & Ivanović, Ž. S. (2020). Occurrence and characterization of *Alternaria* species associated with leaf spot disease in rapeseed in Serbia. *Plant Pathology*, 69(5), 883-900. <https://doi.org/10.1111/ppa.13168>
- Camero-Ayón, C. B., Luna-Esquivel, G., Rios-Velasco, C., Díaz-Heredia, M., Rodríguez-Palomera, M., Betancourt-Aranguré, A., Camero-Campos, O. J., Camero-Ayón, C. B., Luna-Esquivel, G., Rios-Velasco, C., Díaz-Heredia, M., Rodríguez-Palomera, M., Betancourt-Aranguré, A., & Camero-Campos, O. J. (2019). Agentes causales de la pudrición de fruto de Guanábana (*Annona muricata* L.) en Nayarit, México. *Revista bio ciencias*, 6. <https://doi.org/10.15741/revbio.06.e538>
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). Colletotrichum – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73(1), 181-213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>

- Castro, J. (2007). *Cultivo de la Anona (Annona cherimola, Mill)*. Ministerio de Agricultura y Ganadería. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-9412.pdf>
- Chaisiri, C., Liu, X.-Y., Yin, W.-X., Luo, C.-X., & Lin, Y. (2021). Morphology Characterization, Molecular Phylogeny, and Pathogenicity of *Diaporthe passifloricola* on *Citrus reticulata* cv. Nanfengmiju in Jiangxi Province, China. *Plants*, 10(2), 218. <https://doi.org/10.3390/plants10020218>
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020). The Destructive Fungal Pathogen *Botrytis cinerea*—Insights from Genes Studied with Mutant Analysis. *Pathogens*, 9(11), 923. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>
- Corporación Financiera Nacional. (2020). *Ficha Sectorial: Otros cultivos frutales tropicales y subtropicales*. <https://www.cfn.fin.ec/wp-content/uploads/downloads/biblioteca/2020/ficha-sectorial-4-trimestre-2020/FS-Otros-Cultivos-de-Frutas-Tropicales-y-Subtropicales-4T2020.pdf>
- Damme, P. V., & Scheldeman, X. (1993). *El fomento del cultivo de la chirimoya en América Latina*. 50. <https://www.fao.org/3/x2450s/x2450s09.htm#TopOfPage>
- Evans, A. S. (1976). Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 49(2), 175-195.
- FAO. (2006). *Ficha técnica: Chirimoya (Annona Cherimola)*. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación. https://www.ipcinfo.org/fileadmin/user_upload/inpho/InfoSheet_pdfs/CHIRIMOYA.pdf
- Gardiazabal, I., & Rosenberg, M. (1993). *El cultivo del chirimoyo*. Ediciones Universitarias de Valparaíso. https://scholar.google.com.br/citations?view_op=view_citation&hl=es&user=hnwaLYUAAAAJ&citation_for_view=hnwaLYUAAAAJ:u5HHmVD_uO8C

- Gomes, A., & Korf, B. (2018). Chapter 5—Genetic Testing Techniques. En N. H. Robin & M. B. Farmer (Eds.), *Pediatric Cancer Genetics* (pp. 47-64). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-48555-5.00005-3>
- Gray, L. (1990). *Onion Leaf Blights (Downy Mildew, Botrytis Leaf Blight, and Purple Blotch)*. RPD No. 931, 5. [https://doi.org/Report on plant disease](https://doi.org/Report%20on%20plant%20disease)
- Guarnaccia, V., Groenewald, J. Z., Woodhall, J., Armengol, J., Cinelli, T., Eichmeier, A., Ezra, D., Fontaine, F., Gramaje, D., Gutierrez-Aguirregabiria, A., Kaliterna, J., Kiss, L., Larignon, P., Luque, J., Mugnai, L., Naor, V., Raposo, R., Sándor, E., Váczy, K. Z., & Crous, P. W. (2018). Diaporthe diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 40, 135-153.
<https://doi.org/10.3767/persoonia.2018.40.06>
- Guevara, F. E., Oviedo, M. A., Corral, M., Viera, W. F., Garrido, P. A., Leon-Reyes, A., & Flores, F. J. (2019). First Report of *Alternaria* Brown Spot in Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) Caused by *Alternaria alternata* in Ecuador. *Plant Disease*, 103(11), 2949.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-02-19-0416-PDN>
- Hernández, F. E., Pioli, R. N., Peruzzo, A. M., Formento, Á. N., Pratta, G. R., Hernández, F. E., Pioli, R. N., Peruzzo, A. M., Formento, Á. N., & Pratta, G. R. (2015). Caracterización morfológica y molecular de una colección de aislamientos de *Phomopsis longicolla*(teleomorfo desconocido: Diaporthales)de la región templada y subtropical de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 63(3), 871-884.
- Hudson, M. E. (2008). Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 3-17. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.02019.x>

- INIAP. (2014a). *Chirimoya* [Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria]. Chirimoya. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rchirimoya>
- INIAP. (2014b). *Chirimoya* [Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria]. Chirimoya. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rchirimoya>
- INIAP. (2014c). *Chirimoya* [Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria]. Chirimoya. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rchirimoya>
- INIAP. (2014d). *Chirimoya* [Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria]. Chirimoya. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rchirimoya>
- Keinath, A. P., Toporek, S. M., DuBose, V. B., Zardus, S. H., & Ballew, J. B. (2021). First Report of *Alternaria japonica*, a Causal Agent of Black Spot, on Kale in South Carolina, U.S.A. *Plant Disease*, 105(7), 2016. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0085-PDN>
- Kurt, Ş., Soyly, E. M., & Soyly, S. (2010). First Report of Black Spot Disease Caused by *Alternaria alternata* in Persimmon Fruits in Turkey. *Plant Disease*, 94(8), 1069-1069. <https://doi.org/10.1094/PDIS-94-8-1069C>
- Kwon, O.-K., Jeong, A.-R., Jeong, Y.-J., Kim, Y.-A., Shim, J., Jang, Y. J., Lee, G. P., & Park, C.-J. (2021). Incidence of *Alternaria* Species Associated with Watermelon Leaf Blight in Korea. *The Plant Pathology Journal*, 37(4), 329-338. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.02.2021.0018>
- Latinović, N., Radišek, S., & Latinović, J. (2014). First Report of *Alternaria alternata* Causing Fruit Rot on Fig (*Ficus carica*) in Montenegro. *Plant Disease*, 98(3), 424-424. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0770-PDN>
- Leninger, A. L. (1975). *Biochemistry*. Worth Publishers.
- Lopez, S. E., & Cabral, D. (1999). *Alternaria*. En R. K. Robinson (Ed.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (pp. 42-49). Elsevier. <https://doi.org/10.1006/rwfm.1999.0045>

Lou, J., Fu, L., Peng, Y., & Zhou, L. (2013). Metabolites from *Alternaria* Fungi and Their Bioactivities.

Molecules, 18(5), 5891-5935. <https://doi.org/10.3390/molecules18055891>

Mamani, V. (2018). *Producción de plantines de chirimoya (Annona cherimola miller) bajo*

tratamiento pregerminativo en diferentes sustratos en la comunidad de la lloja, municipio

de cairoma. Universidad Mayor de San Andrés.

<https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/20019/T->

2590.pdf?sequence=1&isAllowed=y

Mamode Ally, N., Neetoo, H., Ranghoo-Sanmukhiya, V. M., Hardowar, S., Vally, V., Gungoosingh-

Bunwaree, A., Maudarbaccus, F., Coutinho, T. A., Vojvodić, M., & Bulajić, A. (2021). First

Report of *Botrytis cinerea* Causing Gray Mold on Greenhouse-Grown Tomato Plants in

Mauritius. *Plant Disease*, 105(9), 2725. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-21-0219-PDN>

Merck KGaA. (2022). *Sanger Sequencing Steps & Method.*

<https://www.sigmaaldrich.com/EC/es/technical->

documents/protocol/genomics/sequencing/sanger-

sequencing?gclid=CjwKCAiA3L6PBhBvEiwAINIJ9AjITRrA-

qERS07S7JqTCX1Xe9c35H0yFgMM3gJKe00k8pDsJeQ_5xoC_H4QAvD_BwE

Notte, A.-M., Plaza, V., Marambio-Alvarado, B., Olivares-Urbina, L., Poblete-Morales, M., Silva-

Moreno, E., & Castillo, L. (2021). Molecular identification and characterization of *Botrytis*

cinerea associated to the endemic flora of semi-desert climate in Chile. *Current Research*

in Microbial Sciences, 2, 100049. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100049>

Orrego, C. E., Salgado, N., & Diaz, M. S. (2020). *Productividad y competitividad fruticola Andina.*

98.

- Pareek, C. S., Smoczynski, R., & Tretyn, A. (2011). Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*, *52*(4), 413-435. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0057-x>
- Parker, R. A., Gabriel, K. T., Graham, K., & Cornelison, C. T. (2020). Validation of methylene blue viability staining with the emerging pathogen *Candida auris*. *Journal of Microbiological Methods*, *169*, 105829. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105829>
- PROMPERÚ. (2017). *Perfil Producto Mercado: Chirimoya en Estados Unidos*. Departamento de Inteligencia de Mercados. <https://boletines.exportemos.pe/recursos/boletin/812508479rad43EA7.pdf>
- Rivas, L. M., & Mühlhauser, M. (2014). *Alternaria spp.* *Revista chilena de infectología*, *31*(5), 605-606. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000500013>
- Ross, L. N., & Woodward, J. F. (2016). Koch's postulates: An interventionist perspective. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, *59*, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2016.06.001>
- Sambrook, J., Fritsch, E. R., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (Cold Spring Harbor, Vol. 2). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, M. C., Ridao, A. del C., & Colavita, M. L. (2015). *Diaporthe caulivora*: Agente causal de cancro del tallo predominante en cultivos de soja del sudeste bonaerense. *Fave. Sección ciencias agrarias*, *14*(2), 0-0.
- Schlötterer, C. (2004). The evolution of molecular markers—Just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, *5*(1), 63-69. <https://doi.org/10.1038/nrg1249>
- Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, & Fungal Barcoding Consortium Author List. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for

- Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), 6241-6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Solomon, D. A. (2018). 5—Integrating Molecular Diagnostics With Surgical Neuropathology. En A. Perry & D. J. Brat (Eds.), *Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach (Second Edition)* (pp. 71-89). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44941-0.00005-9>
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. A. L. (2005). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22(2), 333-346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>
- Stulnig, T. M., & Amberger, A. (1994). Exposing contaminating phenol in nucleic acid preparations. *BioTechniques*, 16(3), 402-404.
- Vega, G., & Esther, M. (2013). Chirimoya (*Annona cherimola* Miller), frutal tropical y sub-tropical de valores promisorios. *Cultivos Tropicales*, 34(3), 52-63.
- Vega, M. E. G. (2013). CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Miller), FRUTAL TROPICAL Y SUB-TROPICAL DE VALORES PROMISORIOS. 34(3), 12.
- Velázquez, L. P. A. (2010). *Extracción y purificación de ADN*. 26.
- Verónica Cotroneo, & Besoain, X. (1998). Aspectos epidemiológicos de *botrytis cinerea* Pers. En *chirimoyos (Alllolla Cherimolia Mill.)*. 13(2), 7.
- Villanueva-Arce, R., Yáñez-Morales, M. de J., & Hernández-Anguiano, A. M. (2008). Especies de *Colletotrichum* en chirimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Agrociencia*, 42(6), 689-701.
- White, T. J., Bruns, T. D., Lee, S. B., & Taylor, J. W. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics* (Vol. 38). Academic Press.

- Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & Van Kan, J. a. L. (2007). *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75(1), 171-212. <https://doi.org/10.3114/sim0015>
- Yáñez, G. (2018). *Mejoramiento del amarre y obtención de frutos partenocárpicos en chirimoyo (Annona cherimola Mill.) mediante el uso de reguladores de crecimiento*. Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/15168/1/T-UCE-0004-A79-2018.pdf>
- Zhang, P., Seth, A., & Fernandes, H. (2014). Other Post-PCR Detection Technologies. En L. M. McManus & R. N. Mitchell (Eds.), *Pathobiology of Human Disease* (pp. 4074-4088). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07707-8>