



**Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad
cercosporiosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)**

Alulema Pullupaxi, María Belén

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Flores Flor, Francisco Javier Ph.D.

17 de febrero del 2022

Informe Urkund



Tesis_Belen_Alulema_ESPE_2022.txt

Scanned on: 16:58 February 7, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	114
Words with Minor Changes	0
Paraphrased Words	201
Ommited Words	0





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 cercosporiosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)**" fue realizado por la señorita **Alulema Pullupaxi María Belén** 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



Firmado digitalmente por:
**FRANCISCO
JAVIER FLORES
FLOR**

Flores Flor, Francisco Javier PhD.

C.C. 1713443479



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

RESPONSABILIDAD DE AUTORÍA

Yo, **Alulema Pullupaxi María Belén**, con cédula de ciudadanía N° 1805189444, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "**Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad cercosporiosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)**" 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, 17 de febrero de 2022

Alulema Pullupaxi María Belén

C.C. 1805189444



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

AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN

Yo, **Alulema Pullupaxi María Belén**, con cédula de ciudadanía N° 1805189444, 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 cercosporiosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.)”** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 17 de febrero de 2022

Alulema Pullupaxi María Belén

C.C. 1805189444

Dedicatoria

A mi madre, por su amor infinito, paciencia y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida, quien me enseñó la resiliencia y el empoderamiento femenino.

A mi padre, por su gran ejemplo de responsabilidad y amor por la familia.

A mis hermanos mayores, Pauli y Víctor por ser mi guía durante toda mi formación académica y motivarme a lograr siempre la excelencia.

Agradecimientos

A mis padres Luis y Laura por ser luz en mi vida, este logro es gracias a su apoyo y motivación diaria, mi admiración hacia ustedes.

A mi hermana Paulina gracias por enseñarme a ser valiente, por su ejemplo de dedicación y perseverancia.

A Francisco Flores PhD. por su guía durante el desarrollo de este proyecto y por permitirme realizar la parte práctica del mismo en las instalaciones del laboratorio IDgen.

Gracias a José Ochoa y María Luisa Insuasti, investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Ecuador (INIAP), por permitirme desarrollar una parte de mi investigación en el Laboratorio de Fitopatología.

A Fernando por motivarme siempre y acompañarme en los momentos difíciles, por su amor y apoyo incondicional desde primer semestre, por ser un gran compañero de aventuras, por seguir soñando y creciendo juntos, gracias por transmitir paz a mi vida.

A Cindy gracias por tu bonita amistad, por darme ánimos en cada semestre, por tus consejos y apoyo durante esta etapa.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Informe Urkund.....	2
Certificación docente	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenido	8
Índice de tablas	11
Índice figuras.....	12
Resumen.....	14
Abstract.....	15
Capítulo I: Introducción.....	16
Planteamiento de problema.....	16
Justificación del problema	16
Objetivos	17
Objetivo general.....	17
Objetivos específicos	17
Hipotesis	18
Capítulo II: Marco Teórico	19

Cultivo de naranjilla en Ecuador	19
Descripción botánica.....	19
Características del cultivo	20
Enfermedades fúngicas en naranjilla	22
Enfermedades cercosporoides	25
Métodos de identificación del agente causal	26
Identificación macro y microscópica.....	26
Identificación molecular	28
Test de patogenicidad	29
Capítulo III: Metodología	31
Áreas de investigación y muestreo	31
Descripción de los síntomas visibles	31
Observación de la muestra al microscopio.....	32
Aislamiento del agente causal	32
Siembra en medios de cultivo	32
Descripción macroscópica y microscópica	34
Características del cultivo y estructuras de diagnóstico	34
Identificación molecular	34
Extracción de ADN.....	34
Amplificación por PCR	35
Secuenciación	37

	10
Análisis filogenético	38
Postulados de Koch	38
Capítulo IV: Resultados.....	40
Descripción de los síntomas visibles	40
Observación de la muestra al microscopio.....	41
Obtención de aislados del agente causal	43
Descripción macroscópica y microscópica	43
Identificación molecular	51
Secuenciación	52
Análisis filogenético	53
Postulados de Koch	56
Capítulo V: Discusión	58
Capítulo VI: Conclusiones	65
Capítulo VII: Recomendaciones	66
Capítulo VIII: Bibliografía	67
Anexos	78

Índice de tablas

Tabla 1 Condiciones agroecológicas del cultivo de naranjilla en Ecuador	20
Tabla 2 Enfermedades que afectan al cultivo de naranjilla causadas por hongos y oomicetos, reportadas en Ecuador	23
Tabla 3 Sitios de muestreo en la provincia de Pichincha	31
Tabla 4 Preparación de medios de cultivo	33
Tabla 5 Primers utilizados para la amplificación por PCR de las regiones target establecidas	36
Tabla 6 Preparación del máster mix para la PCR	36
Tabla 7 Primers utilizados y sus respectivas condiciones de amplificación por PCR	37
Tabla 8 Características del cultivo y microscópicas del hongo perteneciente al género <i>Pseudocercospora</i>	44
Tabla 9 Características del cultivo y microscópicas de los hongos correspondientes a <i>Cladosporium</i> sp.	47

Índice de figuras

Figura 1 Hojas sintomáticas muestreadas, (A) manchas observadas en el haz; (B) machas observadas en el envés de la hoja	40
Figura 2 Hojas sintomáticas muestreadas, (A) manchas observadas en el haz; (B) machas observadas en el envés de la hoja	41
Figura 3 Observación de conidióforos (A) y conidios (B) en la muestra tomada de manchas foliares en naranjilla, lente 40X.....	42
Figura 4 Presencia de esporas de otros hongos acumuladas en los tricomas de las hojas, lente 40X	42
Figura 5 Cultivos de los aislados D1 y D2 en medio PGA a 25 °C de 20 días de crecimiento	45
Figura 6 Estructuras correspondientes a <i>Pseudocercospora</i> sp. observadas en el microscopio, (A) conidióforos y (B) conidios, lente 40x	46
Figura 7 Cultivos de los aislado C1 y C2 en medio PDA a 25 °C de 8 días de crecimiento.....	48
Figura 8 Estructuras del aislado C1 observadas en el microscopio.....	49
Figura 9 Estructuras del aislado C2 observadas en el microscopio.....	50
Figura 10 Visualización mediante electroforesis de los amplicones obtenidos por PCR, (A) amplicones de ITS, (B) de ACT y (C) de HIS 3.....	51
Figura 11 Árbol de máxima verosimilitud obtenido con la información de especies de <i>Pseudocercospora</i> y el grupo externo	54
Figura 12 Cladograma obtenido para <i>Pseudocercospora</i> spp. y el grupo externo	55
Figura 13 Síntomas de cercosporiosis observados en las plantas de naranjilla inoculadas	56

Figura 14 Cultivos de los aislados D1 y D2 y estructuras fúngicas observadas en el microscopio, correspondientes a *Pseudocercospora* sp.57

Resumen

El cultivo de naranjilla tiene gran potencial económico debido a la excelente aceptación del fruto en el mercado. Sin embargo, se ha visto afectada por plagas y enfermedades fúngicas principalmente, tal es el caso de la cercosporiosis que ataca a las hojas. La presente investigación proporciona la descripción macroscópica, microscópica y la identificación molecular del agente causal de la cercosporiosis en naranjilla, revelando que los aislados D1 y D2 obtenidos de muestras recolectadas en el sector de Tandapi (Pichincha) corresponden a *Pseudocercospora* sp. El comportamiento *in vitro* del hongo fitopatógeno se caracterizó por un lento crecimiento en el medio de cultivo, alcanzando un diámetro de 17 a 19 mm después de 20 días de incubación. La descripción de las características macro y microscópicas, la identificación molecular y análisis filogenético sugieren que los aislados D1 y D2 pertenecen a una nueva especie de *Pseudocercospora*, considerando la especificidad del huésped que presentan generalmente las especies de este género. Los postulados de Koch permitieron comprobar la patogenicidad de D1 y D2, confirmando que *Pseudocercospora* sp. es el agente causal de la cercosporiosis en naranjilla. Esta investigación representa la primera actualización de esta enfermedad en más de 10 años, por lo que servirá como referencia para futuros estudios de *Pseudocercospora* spp. y de hongos cercosporoides tanto a nivel nacional como regional.

Palabras clave:

- **NARANJILLA**
- **CERCOSPORIOSIS**
- **AGENTE CAUSAL**
- ***PSEUDOCERCOSPORA* SP.**

Abstract

The naranjilla crop has great economic potential due to the excellent acceptance of the fruit in the market. However, it has been affected mainly by pests and fungal diseases, such as cercosporiosis that attacks the leaves. This research provides the macroscopic and microscopic description and molecular identification of the causal agent of cercosporiosis in naranjilla, revealing that isolates D1 and D2 obtained from samples collected in the area of Tandapi (Pichincha) correspond to *Pseudocercospora* sp. The *in vitro* behavior of the phytopathogenic fungus was characterized by slow growth in the culture medium, reaching a diameter of 17 to 19 mm after 20 days of incubation. The description of macro- and microscopic characteristics, molecular identification and phylogenetic analysis suggest that isolates D1 and D2 belong to a new species of *Pseudocercospora*, considering the host specificity that species of this genus generally present. Koch's postulates allowed us to prove the pathogenicity of D1 and D2, confirming that *Pseudocercospora* sp. is the causal agent of cercosporiosis in naranjilla. This research represents the first update of this disease in more than 10 years, so it will be useful as reference for future studies of *Pseudocercospora* spp. and cercosporoid fungi at both national and regional levels.

Key words:

- **NARANJILLA**
- **CERCOSPORIOSIS**
- **CAUSAL AGENT**
- ***PSEUDOCERCOSPORA* SP.**

Capítulo I: Introducción

Planteamiento de problema

La naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) perteneciente a la familia Solanaceae, es un frutal nativo de las estribaciones de los Andes de Ecuador y Colombia (Ramírez et al., 2018). En la actualidad se cultiva en zonas que alcanzan los 600 a 1700 msnm, con temperaturas entre 14 y 29 °C. Durante muchos años su cultivo ha representado una fuente de ingresos económicos para varias familias ecuatorianas, pues el fruto es muy apetecido por su gran valor nutricional, además la pulpa es aromática y de sabor agridulce (Vásquez et al., 2011). Por lo tanto su cultivo tiene gran potencial económico debido a la excelente aceptación en el mercado.

Uno de los principales problemas que afectan a este frutal es la susceptibilidad del cultivo a enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos, lo cual puede resultar en importantes pérdidas en la producción si no se realiza un diagnóstico oportuno de las mismas (Dávila et al., 2018). Dentro de las enfermedades fúngicas que afectan a las hojas de naranjilla, destaca la cercosporiosis, cuyo agente causal no ha sido oficialmente identificado y descrito en el país, únicamente se tiene evidencia de la sintomatología que presenta el tejido vegetal afectado. Por tal razón el estudio de esta enfermedad y del hongo patógeno asociado es fundamental para el manejo adecuado de este cultivo.

Justificación del problema

La cercosporiosis en naranjilla se presenta como pequeñas manchas foliares de color café, con bordes oscuros distintivos, irregulares y limitados por las nervaduras. De acuerdo a Świdarska-Burek et al. (2020) la taxonomía de los hongos cercosporoides se

considera problemática, por lo tanto solo las características morfológicas de las estructuras reproductivas asexuales no bastan para distinguir una especie. Es por ello que las técnicas de diagnóstico molecular se han utilizado ampliamente para superar los problemas taxonómicos. Sin embargo, los síntomas de infección y la morfología *in vivo* del hongo fitopatógeno siguen siendo relevantes, por lo que la clasificación de estos hongos se basa en una combinación entre las características morfológicas, especificidad del huésped y análisis moleculares.

Por medio de la caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la cercosporiosis en naranjilla, se aportará información acerca del hongo fitopatógeno que está afectando a este cultivo en el territorio ecuatoriano. Además, esta enfermedad no ha sido descrita en los países vecinos tales como Colombia, Perú y Panamá, donde también se cultiva naranjilla. Por lo que el presente estudio no solo tendrá impacto a nivel de país sino que servirá de referente a nivel regional para la identificación de hongos cercosporoides, ya sea en naranjilla o en cualquier otro cultivo perteneciente a la familia Solanaceae.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar a nivel morfológico y molecular el agente causal de la enfermedad cercosporiosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

Objetivos específicos

- Aislar los microorganismos asociados con la sintomatología de la enfermedad cercosporiosis en plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

- Identificar macro y microscópicamente a los microorganismos aislados a partir de las muestras de plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) con sintomatología de la enfermedad cercosporiosis.
- Identificar a nivel molecular a los microorganismos aislados a partir de las muestras de plantas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) con sintomatología de la enfermedad cercosporiosis.
- Completar los postulados de Koch en plantas sanas de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.).

Hipotesis

El agente causal de las manchas foliares de color café, con bordes irregulares y limitados por las nervaduras, observadas en naranjilla corresponde al género *Cercospora*.

Capítulo II: Marco Teórico

Cultivo de naranjilla en Ecuador

Descripción botánica

La naranjilla es una planta arbustiva perenne que alcanza hasta 2 m de altura (Revelo et al., 2010), el tallo es verde, robusto, ramificado, veloso y leñoso con la edad (Ramírez et al., 2018; Revelo et al., 2010). Las hojas tienen forma oblonga - ovalada, bordes ondulados, una disposición alterna, con venación púrpura, son densamente pubescentes (Ramírez, 2020) y alcanzan hasta 60 cm de largo por 45 cm de ancho de acuerdo a Ramírez et al. (2018). Además, dependiendo de la variedad de naranjilla pueden o no tener espinas en las hojas.

Por otra parte, las flores son de color blanco, con un diámetro de 4 a 5 cm, tienen 5 sépalos y pétalos, se agrupan en corimbos conformados por flores estaminadas y hermafroditas distribuidas en diferentes posiciones en las inflorescencias (Bonet & Cardenas, 2012; Jaime et al., 2021). En la naranjilla tiene lugar la polinización cruzada, por efecto del viento e insectos del orden Hymenóptera (Revelo et al., 2010).

Por último, los frutos son redondos, alcanzan un diámetro de 4 a 6cm, la piel tiene aspecto liso, cubierta de una suave pilosidad y adquiere un color amarillo a naranja en la madurez (Ramírez et al., 2018; Revelo et al., 2010). La pulpa es verdosa, presenta 4 divisiones con numerosas semillas, tiene un sabor agridulce y gran aroma por lo que se considera un producto exótico (Revelo et al., 2010).

Se han reconocido dos variedades botánicas de naranjilla, aquella que no tiene espinas se conoce como quitoense (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) y se encuentra

en el sur de Colombia y Ecuador, por el contrario aquella que presenta espinas se conoce como septentrionale (*Solanum quitoense* var. *septentrionale*), es considerada más resistente y crece en Colombia, Panamá y Costa Rica principalmente (Jaime et al., 2021; Ramírez, 2020). La naranjilla representa un cultivo económicamente importante de la familia Solanaceae, con origen en las estribaciones de los Andes de Ecuador y Colombia (Ramírez et al., 2018) y ha sido descrito como “el fruto dorado de los Andes”.

Características del cultivo

Las condiciones agroecológicas del cultivo de naranjilla se resumen en la Tabla 1, en la cual se describen los requerimientos climáticos y edáficos de acuerdo al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP (2014) y Revelo et al. (2010).

Tabla 1

Condiciones agroecológicas del cultivo de naranjilla en Ecuador

Característica	Descripción
Clima	Tropical y subtropical húmedo
Temperatura	14 – 29 °C
Altitud	600 a 1700 msnm
Precipitación	1800 a 4000 mm durante el año, lo óptimo es de 2500 mm/año.
Humedad relativa	78 – 92%
Radiación	Plena exposición solar
Vientos	Zonas libres de vientos fuertes o protegidas con la vegetación
Suelo	Textura franca, franco arcillosa o franco arenosa, profundos (> 60 cm), rico en materia orgánica, con buen drenaje y ligeramente inclinado a inclinado (< 40%)
pH	5.3 - 6
Tiempo de cosecha	8 a 9 meses después del trasplante

Los cultivos de naranjilla en Ecuador se distribuyen en las provincias de Napo, Pastaza, Morona Santiago, Zamora Chinchipe, Santo Domingo de los Tsáchilas, Tungurahua, Pichincha, Imbabura y Carchi (INIAP, 2014). De acuerdo con los últimos datos publicados por el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) en 2019, Carchi concentra la mayor superficie sembrada, con el 32% del cultivo total a nivel nacional, seguido de Zamora Chinchipe con el 15%, Pichincha con el 14%, Morona Santiago con 10%, y el resto de provincias comprenden en conjunto el 29% restante. Además, para el año 2019 se registró un aumento de la superficie plantada de naranjilla a nivel nacional, en un 7% en comparación con el año pasado. Así mismo, el rendimiento en dicho año alcanzó un valor de 5.60 toneladas (t)/hectárea (ha), evidenciando una variación porcentual positiva de 150% con respecto a 2018.

Las exportaciones de naranjilla durante el año 2019, según los datos del MAGAP tuvieron un crecimiento significativo, al pasar de 33.22 toneladas a 204.44 t, siendo Estados Unidos (92%) y España (6%) los dos principales países de destino de este producto ecuatoriano. Por lo tanto, este cultivo ha demostrado tener gran potencial económico debido a su rentabilidad y aceptación en el mercado (Silva et al., 2016).

En el Ecuador se cultiva principalmente la naranjilla común (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) tanto la variedad agria y dulce, y en menor cantidad la variedad espinosa (*Solanum quitoense* var. *septentrionale*). También en años anteriores se han obtenido nuevos materiales genéticos de naranjilla, que surgieron de cruzamientos entre especies silvestres y las variedades agria y dulce (*S. sessiliflorum* x *S. quitoense* var. *quitoense*), el primero corresponde el híbrido Puyo y el segundo al híbrido INIAP Palora; siendo este último más tolerante a nemátodos, insectos y enfermedades

(Revelo et al., 2010). Además, con estos híbridos se ha logrado mejorar las características de calidad de la fruta y rendimiento del cultivo (INIAP, 2014).

Enfermedades fúngicas en naranjilla

La susceptibilidad de los cultivares comerciales de naranjilla a enfermedades causadas por diversos organismos patógenos tales como virus, bacterias, hongos, nemátodos e insectos plaga representa un problema fitosanitario a pesar de las defensas mecánicas naturales de la planta, el uso de fertilizantes, fungicidas, agentes de biocontrol, entre otros (Dávila et al., 2018; Revelo et al., 2010). En el caso de los hongos patógenos, estos infectan las plantas en cualquier fase, desde la etapa de plántula hasta la etapa de maduración de la semilla en condiciones ambientales naturales, ya sea solos o junto con otros tipos de fitopatógenos (Hariharan & Prasannath, 2021), afectando gravemente a la producción y productividad de los cultivos.

En Ecuador, varios estudios han reportado las enfermedades de mayor importancia para la naranjilla, causadas por hongos y pseudohongos que afectan principalmente al tallo, hojas y frutos. En la Tabla 2 se presenta una lista de las enfermedades descritas en años anteriores, junto con el agente causal respectivo, que ha sido identificado ya sea a nivel de género y/o especie de acuerdo a Revelo et al. (2010) y Rogg (2000).

Tabla 2

Enfermedades que afectan al cultivo de naranjilla causadas por hongos y oomicetos, reportadas en Ecuador

Enfermedad	Agente causal	Órgano afectado
Tizón tardío	<i>Phytophthora infestans</i> ⁽²⁾	hojas, pecíolos, brotes tiernos, tallos, ramas y frutos
Antracnosis del fruto	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ⁽¹⁾	frutos
Marchitez vascular	<i>Fusarium oxysporum</i> ⁽¹⁾	inicia en la raíz y se propaga por el sistema vascular
Pudrición algodonosa	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ⁽¹⁾	ramas y tallo
Mancha clorótica	<i>Cladosporium</i> sp. ⁽¹⁾	hojas
Muerte de ramillas	<i>Hypomyces</i> sp. ⁽¹⁾	ramas
Mancha de la hoja	<i>Septoria solanicola</i> ⁽¹⁾	hojas
Manchas foliares	<i>Cercospora</i> sp. ⁽¹⁾	hojas
Muerte de plántulas	<i>Pythium</i> sp. ⁽²⁾	plántulas
Mal del talluelo	<i>Rhizoctonia</i> sp. ⁽¹⁾	base del tallo en plántulas
Mildiu	<i>Peronospora</i> sp. ⁽²⁾	hojas y tallos principalmente

Nota. ⁽¹⁾ Hongos fitopatógenos, ⁽²⁾ Pertenece al grupo de los oomicetos.

También en Colombia se han reportado otras enfermedades fúngicas precosecha y postcosecha, como la pudrición de la raíz (*Pythium* sp.), mancha negra de los tallos (*Phoma* sp. y *Gloeosporium* sp.), gota (*Phytophthora infestans*) que afecta al fruto y tallos, moho gris (*Botrytis cinerea*) que afecta a la flor y ocasionalmente al fruto, pudrición blanda del fruto (*Rhizopus* sp.), entre otras (Angulo, 2006).

En otro estudio realizado por Dávila et al. (2018) identificaron la comunidad de hongos que habitan los tejidos foliares sintomáticos de naranjilla, específicamente manchas necróticas o cloróticas de las hojas, en la región amazónica ecuatoriana.

Mediante técnicas moleculares basadas en la secuenciación de la región espaciadora interna transcrita (ITS) del ADN ribosomal lograron identificar 68 hongos filamentosos, distribuidos en 14 taxones, de las cuales, las especies *Diaporthe citri*, *D. schini*, y *Xylaria berteri* fueron más abundantes, además alrededor del 90% de los taxones recuperados en este estudio se reportaron por primera vez en naranjilla. De acuerdo a los mismos autores, dichos resultados sugieren que los tejidos sintomáticos representan un reservorio moderadamente diverso para comunidades de hongos, sin embargo no se comprobó el rol ecológico de los hongos identificados, por lo que no se determinó cuales especies son patógenas y cuales endófitas o saprófitas.

Para el control de las enfermedades foliares, Vásquez et al. (2011) recomiendan la aplicación de productos preventivos a base de cobre y carboxamida (captan). Por otra parte, como control químico para las diferentes enfermedades descritas anteriormente se puede utilizar fungicidas como mancozeb, metalaxil, difenoconazol, triadimefón, azoxistrobín, pirimetanil, carbendazim, propamocarb, hexaconazol y propineb (Angulo, 2006). Sin embargo, el enfoque actual es obtener nuevos materiales genéticos de naranjilla con resistencia/tolerancia a varias plagas importantes y la utilización de hongos antagónicos, por ejemplo de los géneros *Trichoderma* y *Penicillium* como control biológico de las enfermedades, para disminuir el uso de fungicidas.

Otras recomendaciones importantes son las podas frecuentes de hojas, brotes y frutos en mal estado, sin embargo si el estado de la enfermedad es avanzado, lo ideal es retirar e incinerar las plantas afectadas para evitar que el resto del cultivo se contamine. Finalmente el suelo debe ser desinfectado al igual que las herramientas de trabajo (Angulo, 2006; Revelo et al., 2010; Vásquez et al., 2011).

Enfermedades cercosporoides

Los hongos cercosporoides representan uno de los grupos más grandes e importantes de hongos patógenos de plantas que causan manchas en las hojas y frutos, las cuales en su mayoría presentan un margen más oscuro distintivo y generalmente están limitados por las nervaduras (Świdarska-Burek et al., 2020). Además dentro de las manchas se producen sus estructuras fúngicas de diagnóstico: conidióforos y conidios.

De acuerdo a Crous & Braun (2003) estos hongos pertenecen a la familia Mycosphaerellaceae, orden Capnodiales, clase Dothideomycetes y división Ascomycota. Se han distinguido cuatro géneros cercosporoides verdaderos, *Cercospora* Fresen., *Passalora* Fr., *Pseudocercospora* Speg., y *Stenella* Syd., así como varios otros que son morfológicamente similares.

En Ecuador se han realizado pocos estudios de hongos cercosporoides asociados a manchas foliares en cultivos de importancia económica pertenecientes a la familia Solanaceae u otras familias. En una investigación reciente, Paredes et al. (2021) identificaron a *Cercospora beticola* como el agente causal de la mancha gris en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana*) ubicados en la localidad de El Tingo, provincia de Pichincha. En otra investigación, Rodríguez et al. (2017) reportaron la presencia de *Pseudocercospora griseola*, agente causal de la mancha angular en cultivos de fréjol común (*Phaseolus vulgaris*) ubicados en las provincias de Imbabura y Carchi. Por otra parte, también se ha reportado que *Pseudocercospora fijiensis* (anamorfo) y *Mycosphaerella Fijiensis* (teleomorfo) corresponden el agente causal de la sigatoka negra en banano (*Musa paradisiaca*) (Asitimbay, 2019; Martillo & Solano, 2003). De acuerdo a Tumbaco (2011), el primer reporte de esta enfermedad foliar fue en la

provincia de Esmeraldas en 1987 y se ha propagado hacia las provincias de Pichincha, Los Ríos, Cotopaxi, Guayas y El Oro en las últimas décadas.

A nivel de Sudamérica existen reportes en varios países, por ejemplo en Colombia, también se ha reportado la sigatoka negra y su agente causal en la zona bananera de este país (Aguirre et al., 2012). En Bolivia, Morante (2016) describió la presencia de varias manchas foliares en cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), identificando cinco agentes causales, entre ellos *Cercospora solanicola* y *Passalora concors*. Por otra parte, Silva et al. (2016) realizaron una reevaluación de *Pseudocercospora* spp. en Brasil, en base a una combinación de datos morfológicos, de cultivo y datos moleculares, revelando una gran diversidad de especies y varios registros nuevos de organismos huéspedes vinculados a este género.

Métodos de identificación del agente causal

Identificación macro y microscópica

La identificación de las plantas afectadas es uno de los primeros pasos durante el diagnóstico de sus enfermedades, para ello es importante comparar entre plantas sanas y enfermas, esto permitirá conocer cuáles son las partes afectadas y posteriormente evaluar síntomas y signos. Los primeros corresponden a la reacción del huésped, por ejemplo, manchas foliares o marchitez, por el contrario los signos se determinan a partir de la observación microscópica del patógeno o estructuras del mismo, por ejemplo presencia de micelio o esporas en el caso de los hongos, dentro del tejido vegetal sintomático (The American Phytopathological Society, 2022).

De acuerdo con Riley et al. (2002) los síntomas más notorios pueden ser la necrosis o muerte de partes de la planta, manchas foliares y pudrición de frutos. Además se debe tomar en cuenta que las enfermedades involucran una progresión de síntomas, siendo una de las características más importantes asociadas con problemas fitosanitarios causados por agentes bióticos. Sin embargo, los signos son más específicos que los síntomas observables; por lo tanto, ambos son útiles en el diagnóstico de las enfermedades.

En el caso de los hongos presentes en tejidos vegetales enfermos, para determinar si son patógenos o saprófitos, primero deben ser aislados en medios de cultivo apropiados. Según Agrios (2005), para algunos hongos se pueden utilizar medios nutritivos especiales que permitan el aislamiento selectivo o la promoción de la esporulación. Además se debe considerar las condiciones de temperatura, humedad y luz más favorables durante el periodo de incubación. Por otra parte, las cámaras húmedas también pueden estimular la formación de micelio y esporas en el tejido afectado (Riley et al., 2002).

La identificación microscópica de los hongos consiste en la observación y descripción de la morfología de su micelio, estructuras de fructificación, conidióforos y conidios, considerando su forma, tamaño y agrupación (Ownley & Trigiano, 2017). Además, Agrios (2005) recomienda tomar como referencia un libro apropiado de micología o patología vegetal para ver si el hongo identificado de manera preliminar ha sido reportado como patógeno, especialmente en la planta en la que se encontró.

Identificación molecular

La identificación morfológica de los hongos ha resultado ser insuficiente debido a que algunas de las características de una especie son muy similares a las de otra dentro de un mismo género (Abedy et al., 2022). Por lo tanto, varias técnicas de diagnóstico molecular han sido utilizadas para una identificación precisa en las últimas décadas, entre ellas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) que permite la amplificación de diversos marcadores fúngicos, tales como el espaciador transcrito interno (ITS), considerado el código de barras universal de los hongos (Schoch et al., 2012).

Sin embargo, la secuencia de ITS a menudo no permite diferenciar especies estrechamente relacionadas en base a similitudes morfológicas dentro de los complejos debido a la baja variación genética dentro de estos fragmentos genómicos (Kuzdraliński et al., 2017), por tal razón, la estrategia actual consiste en la amplificación y secuenciación de ADN de fragmentos internos de varios genes codificantes, entre ellos actina (ACT), calmodulina (CAL), factor de elongación-1 α (TEF-1 α) e histona H3 (HIS 3) porque en conjunto muestran una alta discriminación de especies (El-Dawy et al., 2021; Meghvansi et al., 2013).

Una vez con la información de las secuencias de ADN de los marcadores moleculares, se realiza el análisis filogenético, el cual permite estimar las relaciones entre taxones y sus ancestros comunes hipotéticos (Felsenstein, 2003; Nei & Kumar, 2000). La incorporación de datos filogenéticos moleculares revolucionaron la clasificación de hongos a través de inferencias genealógicas sólidas, resolviendo así, la relación de anamorfos - teleomorfos, especies sinónimas o mal identificadas (Crous et al., 2013; Kurtzman et al., 2011). Actualmente, los enfoques de locus múltiples o el uso

de genomas completos son el estándar para inferir procesos evolutivos robustos en hongos, ya que maximizan la información filogenética en comparación con el uso de un solo gen marcador (Yarza et al., 2017)

De acuerdo a Hall (2013), la construcción de un árbol filogenético requiere primero identificar y acceder a un conjunto de secuencias homólogas de ADN o proteínas, con las cuales se genera un alineamiento múltiple para a partir de ello estimar un árbol que será presentado de tal manera que transmita claramente la información relevante que se desea.

Test de patogenicidad

Una vez que el organismo ha sido aislado, la patogenicidad del mismo se demuestra mediante los postulados de Koch, los cuales fueron desarrollados por Robert Koch a fines del siglo XIX (Ownley & Trigiano, 2017). Este ensayo involucra la inoculación de plantas sanas con el organismo aislado para comprobar que se trata del agente causal de la enfermedad en estudio (Agrios, 2005). Es útil especialmente si el organismo no ha sido reportado previamente como un fitopatógeno de un huésped determinado (Riley et al., 2002).

De acuerdo con Ownley & Trigiano (2017) los cuatro pasos para cumplir los postulados de Koch, adaptados a los patógenos de plantas, son los siguientes:

1. El microorganismo debe encontrarse en toda planta enferma, pero no en las sanas.

2. El microorganismo debe aislarse a partir del huésped y obtener un cultivo puro, posteriormente se describen las características del mismo.

3. El microorganismo cultivado debe causar síntomas de enfermedad cuando se inocula en una planta huésped sana, dichos síntomas deben ser similares a los que se observaron en las plantas enfermas originales.

4. El microorganismo debe ser aislado a partir de la planta experimental enferma, en consecuencia debe tener características idénticas a las del aislado original.

Capítulo III: Metodología

Áreas de investigación y muestreo

El material vegetal se obtuvo de 2 cultivos en la zona de Tandapi, parroquia rural del cantón Mejía de la provincia de Pichincha. En la Tabla 3 se describen los datos de los sitios muestreados. En Nuevo Machachi se muestreó la variedad quiteña (*Solanum quiteñoense* var. *quiteñoense*), y en el sector de La Espedie, la variedad septentrional (*Solanum quiteñoense* var. *septentrionale*). Se recolectaron hojas de naranjilla que presentaron manchas foliares de color café en ambos sitios de muestreo y se almacenaron en fundas plásticas hasta su posterior uso.

Tabla 3

Sitios de muestreo en la provincia de Pichincha

Sector	Latitud	Longitud	Altitud
Nuevo Machachi	0° 20' 44" S	78° 52' 23" W	1462 m
La Espedie	0° 22' 39" S	78° 49' 40" W	1275 m

Nota. El primer sector se considera la zona alta y el segundo corresponde a la zona baja de Tandapi.

Descripción de los síntomas visibles

La descripción de los síntomas visibles se realizó mediante observación del haz y envés de las hojas muestreadas, se consideró el tamaño, color, tipo de borde, extensión de las lesiones y presencia de micelio en el envés.

Observación de la muestra al microscopio

Se tomó una pequeña muestra de las lesiones observadas en las hojas muestreadas, para ello se utilizó cinta adhesiva, la cual se colocó en un portaobjetos con una gota de agua y se observó en el microscopio (en 40x) para identificar estructuras de diagnóstico del posible agente causal de la enfermedad en estudio.

Aislamiento del agente causal

Siembra en medios de cultivo

Se aplicaron 3 métodos para obtener aislados puros del posible agente causal de la enfermedad en estudio, los cuales se describen a continuación.

En el primer método, se realizó un lavado rápido de varios pedazos de lesiones esporulantes para eliminar polvo principalmente. A continuación se colocaron en un vaso con 10 mL de agua estéril y 1 gota de tween 20 durante 10 minutos, tiempo en el que se realizaron enjuagues de las manchas utilizando una pipeta Pasteur, con la finalidad de capturar en el agua las esporas de los microorganismos presentes en la muestra, después del tiempo transcurrido se agregó 2 gotas de ácido láctico para evitar el crecimiento de bacterias, por último se inoculó una gota de la solución en el medio de cultivo, para ello se puede utilizar una asa bacteriológica, un hisopo o un triángulo estéril.

En el segundo método, se utilizó una pestaña sintética estéril para capturar conidios de la solución obtenida en el método anterior, de inmediato fueron transferidos al medio de cultivo, esto se realizó bajo un estereomicroscopio con un aumento de 10x.

En el tercer método, el material vegetal fue desinfectado con etanol al 70% por 3 minutos, hipoclorito de sodio al 1% por 1 minutos y 3 enjuagues con agua estéril, de acuerdo a la metodología descrita por Park et al. (2020). Después, los trozos de hoja se colocaron en el medio de cultivo.

Se utilizaron los siguientes medios de cultivo, en cajas Petri: PDA (agar papa dextrosa) y PGA (agar papa glucosa) (Tabla 4). Las condiciones de crecimiento fueron 25 °C, en oscuridad (Park et al., 2017; Silva et al., 2016). Se evaluó el crecimiento a partir del tercer día después de la inoculación, las colonias de interés fueron transferidas a nuevas cajas Petri para obtener aislados puros.

Tabla 4

Preparación de medios de cultivo

Medio de cultivo	Componentes	Cantidad
PDA	PDA (comercial)	39 g
PGA	PGA (comercial)	39 g

Nota. La cantidad de cada componente de los medios de cultivo se establecieron para 1 L de agua, para su disolución se calentaron con agitación constante hasta ebullición y fueron autoclavados. Se agregaron 50 gotas de ácido láctico/L medio.

Después del tiempo de incubación establecido, los hongos en desarrollo se identificaron morfológicamente en base a sus características macro y microscópicas.

Descripción macroscópica y microscópica

Características del cultivo y estructuras de diagnóstico

Dentro de las características macroscópicas se consideró el color, forma, borde de las colonias aisladas en los medios de cultivo utilizados y se tomaron fotografías de la parte frontal y el reverso de la caja Petri.

Por otra parte para describir las características microscópicas de las colonias aisladas, se tomó una pequeña muestra del micelio de cultivos de 1 semana o más, con una cinta adhesiva que fue colocada en un portaobjetos con una gota de agua para observar en el microscopio, se identificaron y describieron las estructuras de diagnóstico, considerando la forma, coloración de conidióforos y conidios. Además se tomaron varias mediciones de largo y ancho de los conidios, utilizando el programa ImageFocus Alpha.

Identificación molecular

Extracción de ADN

La extracción de ADN del hongo aislado se realizó con el protocolo de extracción de ADN IDgen, modificado de Berrendero et al. (2008). Se tomó aproximadamente 50 mg de muestra del micelio en un tubo estéril de 1.5 mL con 3 perlas de vidrio y se adicionó 500 μ L de buffer de extracción (2,5 % w/v CTAB, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCL [pH 8.0]) y 2 μ L de β -mercaptoetanol. A continuación se agitó vigorosamente la muestra usando el vórtex hasta que el tejido quede pulverizado y se incubó en baño María a 60 °C por 30 minutos, mezclando por inversión cada 10 minutos. Luego se añadieron 500 μ L de cloroformo previamente descongelado, se

homogenizó en vórtex por 30 segundos y se dejó reposar por unos minutos. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14500 xg por 10 minutos. Se transfirieron aprox 300 μ L del sobrenadante a un nuevo tubo estéril de 1.5 mL, en el mismo tubo se añadió un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 μ L de acetato de sodio 3M y 300 μ L de etanol al 70% filtrado, para precipitar el ADN. Al finalizar este paso las muestras se dejaron en reposo a -20 °C toda la noche.

Al siguiente día las muestras fueron centrifugadas a 14500 xg por 17 minutos, se eliminó el sobrenadante, enseguida se realizó un lavado con etanol al 70% y se descartó el mismo por inversión. Finalmente se dejó secar el pellet de ADN durante 15-20 minutos, posteriormente el pellet de ADN fue resuspendido con 25 μ L de agua DEPC, añadiendo además 1 μ L de RNAsa y se dejó incubar 30 minutos a 37 °C. Las muestras se almacenaron a -20 °C para su posterior uso.

Amplificación por PCR

Para obtener los amplicones de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizaron los primers o cebadores listados en la Tabla 5, de acuerdo a El-Dawy et al. (2021) y Meghvansi et al. (2013). En cada caso, primero se preparó el master mix, sus componentes se describen en la Tabla 6. Los reactivos se agregaron en el orden que se indica, además la concentración de ADN utilizada fue de 100 a 150 ng/ μ L, cuando fue necesario se realizó una dilución de las muestras para alcanzar dicha concentración. Cada reacción se ajustó a un volumen final de 25 μ L en tubos de PCR estériles de 0.2 mL.

El termociclador fue programado a diferentes condiciones de amplificación de acuerdo a los primers utilizados (Tabla 7). Por último, los amplicones se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, a 100 V x 30 min.

Tabla 5

Primers utilizados para la amplificación por PCR de las regiones target establecidas

Región target	Primer ⁽¹⁾	Secuencia
Espaciador transcrito interno (ITS)	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
Actina (ACT)	ACT-512F	ATGTGCAAGGCCGGTTTCGC
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
Histona H3 (HIS 3)	CyIH3F	AGGTCCACTGGTGGCAAG
	CyIH3R	AGCTGGATGTCCTTGGACTG

Nota. ⁽¹⁾ Cebador o iniciador, es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se utiliza para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región que será amplificada. La concentración de cada primer fue de 10 pmol/μL.

Tabla 6

Preparación del máster mix para la PCR

Componentes	Volumen μL (1x)
Agua ultrapura	8.5
Taq polimerasa (comercial, incluye DNTPs ⁽¹⁾ MgCl ₂ , buffer)	12.5
Primer Forward	1
Primer Reverse	1
ADN	2
Total	25

Nota. ⁽¹⁾ dNTP: Deoxinucleósido trifosfato, se distinguen el dATP, dCTP, dTTP y dGTP, son nucleótidos que sirven para generar las nuevas cadenas de ADN.

Tabla 7

Primers utilizados y sus respectivas condiciones de amplificación por PCR

Región target	Primer	Condiciones
ITS	ITS1	desnaturalización inicial: 94 °C, 3 min
	ITS4	30 ciclos de desnaturalización: 94 °C, 30 seg annealing ⁽¹⁾ : 53.5 °C, 30 seg extensión: 72 °C, 45 seg extensión final: 72 °C, 10 min
ACT	ACT-512F	desnaturalización inicial: 94 °C, 3 min
	ACT-783R	35 ciclos de desnaturalización: 94 °C, 30 seg annealing: 58 °C, 30 seg extensión: 72 °C, 45 seg extensión final: 72 °C, 4 min
HIS 3	CyIH3F	desnaturalización inicial: 94 °C, 3 min
	CyIH3R	35 ciclos de desnaturalización: 94 °C, 30 seg annealing: 58 °C, 30 seg extensión: 72 °C, 45 seg extensión final: 72 °C, 4 min

Nota. ⁽¹⁾ Se refiere a la unión de los primers a la hebra de ADN monocatenario, cuando desciende la temperatura. Las condiciones de amplificación para ITS son estándar en el laboratorio IDgen, en cambio para ACT e HIS3 se tomaron de Caicedo et al. (2017).

Secuenciación

Los productos de amplificación obtenidos mediante PCR fueron secuenciados en el laboratorio comercial Macrogen (Seúl, Corea del Sur), mediante el método Sanger para obtener la secuencia de ADN de las muestras enviadas.

Las secuencias forward y reverse de los amplicones de la región ITS, ACT e HIS3 fueron ensambladas en el programa BioEdit v7.2.5 (Hall T. , 1999) para obtener una secuencia de ADN consenso de cada marcador. A continuación se realizó una búsqueda de homólogos en el programa en línea The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponible en The National Center for Biotechnology Information (NCBI)

(Altschul et al., 1990) para identificar la similitud de los aislados obtenidos en este estudio con aquellos que se encuentran en la base de datos.

Análisis filogenético

El primero paso fue realizar el alineamiento múltiple, mediante la opción Clustal W en el programa MEGA X (Kumar et al., 2018) para las secuencias de ITS y ACT, incluyendo las secuencias de los aislados obtenidos en este estudio y aquellas recuperadas de la base de datos GenBank del NCBI, también utilizadas en anteriores análisis de filogenia para *Pseudocercospora* spp. (Bakhshi et al., 2014; Crous et al., 2013; Silva et al., 2016). Como grupo externo se utilizaron las secuencias de *Septoria provencialis* (CPC 12226), también utilizadas por Meghvansi et al. (2013). Cabe mencionar que la secuencia de HIS 3 se descartó para este análisis debido a que en la base de datos había muy pocos registros de secuencias de este marcador para el género en estudio.

Una vez finalizado el alineamiento, se eliminaron regiones de mala calidad, utilizando el servidor en línea Transitive Consistency Score for MSA evaluation (TCS) (Chang et al., 2014). Después las secuencias de ITS y ACT fueron concatenadas en el programa SequenceMatrix (Vaidya et al., 2011). Finalmente, para el análisis de máxima verosimilitud (ML) se utilizó el programa Randomized Axelerated Maximum Likelihood (RAxML), (Stamatakis, 2014) en el portal web CIPRES Science Gateway.

Postulados de Koch

Para probar la patogenicidad del hongo aislado se utilizó su micelio, el cual fue recortado de cultivos frescos en agar. Se colocaron pequeños trozos (3 x 3 mm) de micelio sobre el haz de las hojas, y se agregó una gota de agua estéril para humedecer

la zona. La inoculación se realizó en 3 hojas por cada planta de naranjilla, las cuales fueron colocadas en una cámara de crecimiento a 25 °C, humedad relativa del 80%, con ciclos de 12/12 h de luz y oscuridad. El día de la inoculación las plantas se regaron con una solución de nitrógeno (1g/L) para favorecer la infección del hongo, pues las plantas se vuelven más suculentas.

El ensayo se realizó por triplicado, se probaron 2 aislados en medio PGA, en un total de 6 plantas. Por otra parte, las plantas de control fueron inoculadas con agar sin cultivo. Se evaluó la aparición de síntomas a partir de los primeros 7 días después de la inoculación.

También se realizó la identificación microscópica de las estructuras fúngicas presentes en las manchas formadas en las hojas inoculadas y se obtuvieron colonias aisladas a partir de las manchas foliares mediante el primer método utilizado para obtener los aislados fúngicos iniciales.

Capítulo IV: Resultados

Descripción de los síntomas visibles

Se identificaron 2 tipos de manchas mediante la observación del haz y envés de las hojas de naranjilla muestreadas, las primeras se presentan como pequeñas manchas (3 a 7 mm de largo x 3 a 5 mm de ancho), con forma subcircular a poligonal, de color café, con bordes oscuros distintivos, irregulares y limitados por las venas foliares, las manchas se distribuyen a lo largo de toda la hoja (Figura 1). Estas características coinciden con las descripciones de los síntomas causados por hongos cercosporoides (Crous & Braun, 2003; Crous et al., 2013; Silva et al., 2016; Świdarska-Burek et al., 2020).

Figura 1

Hojas sintomáticas muestreadas, (A) manchas observadas en el haz; (B) manchas observadas en el envés de la hoja



El segundo tipo de mancha es de mayor tamaño, de color café en el centro y bordes amarillos o cloróticos, poco definidos e irregulares, a diferencia de las primeras no están limitados por las venas foliares, las manchas se distribuyen a lo largo de toda la hoja, además se observa la presencia de micelio en el envés (Figura 2). Las manchas observadas generalmente son causadas por *Cladosporium* sp. (Revelo et al., 2010).

Figura 2

Hojas sintomáticas muestreadas, (A) manchas observadas en el haz; (B) machas observadas en el envés de la hoja



Observación de la muestra al microscopio

Se logró identificar estructuras fúngicas de diagnóstico, tales como conidióforos y conidios mediante observación de la muestra en el microscopio óptico a 40X. Dichas estructuras son típicas de hongos cercosporoides (Figura 3). También en la misma muestra se observaron estructuras de otros hongos principalmente acumuladas en los

tricomas de las hojas (Figura 4), esto es común debido a que el tejido afectado puede contener uno o mas organismos saprófitos que habitan dentro del mismo.

Figura 3

Observación de conidióforos (A) y conidios (B) en la muestra tomada de manchas foliares en naranjilla, lente 40X

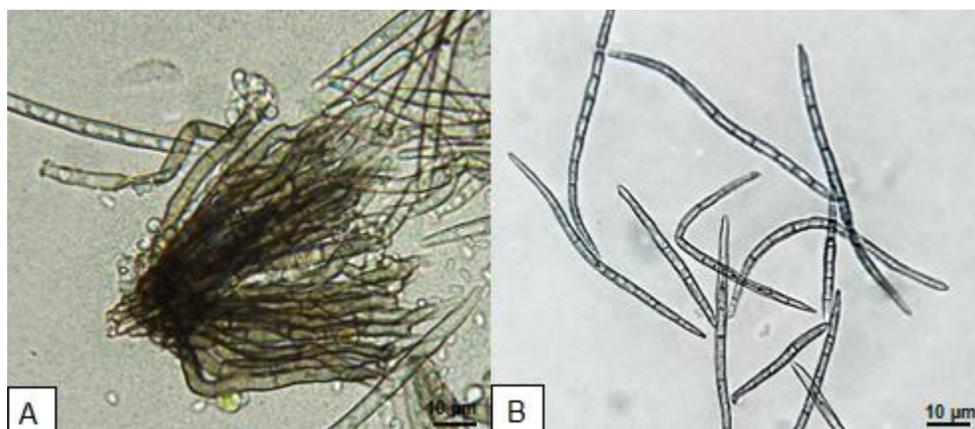


Figura 4

Presencia de esporas de otros hongos acumuladas en los tricomas de las hojas, lente 40X



Obtención de aislados del agente causal

Se obtuvieron 2 aislados fúngicos a partir de las manchas descritas en la Figura 1, uno por cada cultivo que fue muestreado, dichos aislados se identificaron como D1 y D2. De igual manera, se obtuvieron 2 aislados a partir de las manchas descritas en la Figura 2, los cuales se identificaron como C1 y C2. El primer método de aislamiento permitió obtener colonias puras de C1, C2, D1 y D2. Además, el segundo método fue especialmente útil para comprobar que los aislados D1 y D2 correspondían al hongo de interés, pues crecieron colonias puras idénticas a las obtenidas mediante el primer método. De igual manera, Bakhshi et al. (2014) y Silva et al. (2016) obtuvieron buenos resultados en el aislamiento de *Pseudocercospora* spp. al aplicar este método, por lo que recomiendan usarlo para hongos fitopatógenos de crecimiento lento. Las condiciones de crecimiento establecidas fueron favorables por lo que no fue necesario modificarlas.

El tercer método no fue exitoso para obtener aislados de D1 y D2, pues no se logró obtener colonias puras del microorganismo de interés, debido a la presencia de estructuras de varios hongos en una misma mancha foliar, por lo que aquellos hongos de rápido crecimiento, invadieron el medio de cultivo al cabo de 3 a 5 días después de la siembra del tejido vegetal sintomático previamente desinfectado.

Descripción macroscópica y microscópica

Los aislados fúngicos D1 y D2 corresponden al género *Pseudocercospora* de acuerdo con las descripciones de Crous et al. (2013); Silva et al. (2016); Świdarska-Burek et al. (2020). En la Tabla 8, Figura 5 a, b, c, d y la Figura 6 a, b se indican las características del cultivo y las estructuras observadas en el microscopio. El tamaño de

los conidios que se reporta en este estudio es el promedio de 10 mediciones de largo y ancho (Anexo 1) de dichas estructuras observadas en la muestra tomada a partir del tejido vegetal sintomático, debido a que durante el tiempo de estudio, el hongo no esporuló en condiciones *in vitro*. Para la descripción morfológica se tomó como referencia las investigaciones de Ávila et al. (2019); Crous et al. (2013); Park et al. (2017) y Silva et al. (2016).

Se utilizó un cultivo de 20 días para la caracterización macroscópica, debido al crecimiento lento del hongo, en este periodo de tiempo, las colonias en el medio de cultivo alcanzaron un diámetro de 17 a 19 cm. Además, en estudios anteriores de *Pseudocercospora* spp. se toma como referencia 20 días para reportar el tamaño de las colonias (Crous et al., 2013; Silva et al., 2016).

Tabla 8

Características del cultivo y microscópicas del hongo perteneciente al género

Pseudocercospora

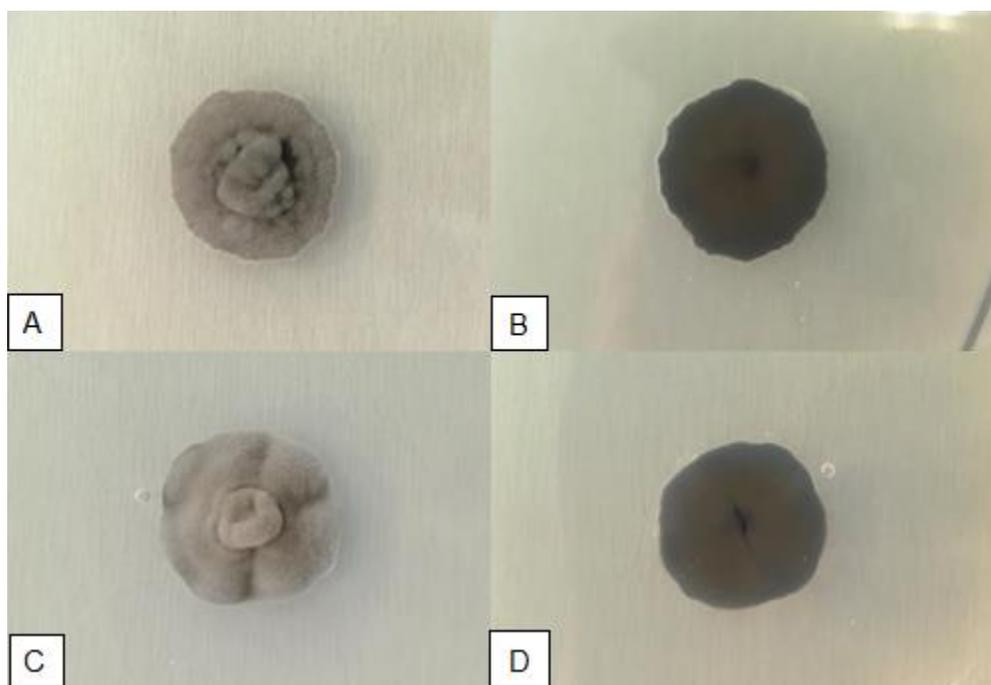
Características	Descripción
Colonia:	
color	colonias errumpentes, de color marrón pálido en el centro y gris oliva pálido en los bordes
textura	glabra o lisa, bordes regulares ligeramente ovalados
reverso	aterciopelado, de color negro en el centro y tonos grises claros en los bordes
tamaño	17 a 19 mm
Conidióforos:	
forma	fasciculados, individualmente rectos a ligeramente ondulados, no ramificados, de ápice redondeado a truncado, aseptados a septados
color	marrón oscuro en la base y marrón pálido, ligeramente hialino en los extremos

Características	Descripción
Conidios:	
forma	solitarios, forma acicular, rectos a ligeramente curvos, con ápice agudo y base redondeada
color	hialino
tamaño	Muestra 1: largo: $58.65 \pm 12.39 \mu\text{m}$ y ancho: $4.53 \pm 0.37 \mu\text{m}$ largo x ancho: 35.73 a 69.97×4 a $5.08 \mu\text{m}$ Muestra 2: largo: $57.96 \pm 12.64 \mu\text{m}$ y ancho: $4.58 \pm 0.42 \mu\text{m}$ largo x ancho: 34.8 a 70.15×4 a $5.12 \mu\text{m}$
septos	sí, de 3 a 7 septos

Nota. Para la descripción de los conidióforos y conidios se consideraron las estructuras observadas en la muestra inicial del tejido vegetal, debido a que los aislados D1 y D2 no esporularon en condiciones *in vitro*.

Figura 5

Cultivos de los aislados D1 y D2 en medio PGA a 25 °C de 20 días de crecimiento



Nota. (A) vista frontal del micelio de D1, (B) vista del reverso del cultivo del aislado D1, (C) vista frontal del micelio de D2 y (D) vista del reverso del cultivo del aislado D2.

Figura 6

Estructuras correspondientes a Pseudocercospora sp. observadas en el microscopio, (A) conidióforos y (B) conidios, lente 40X



Nota. Las estructuras presentadas corresponden a las observaciones de conidióforos y conidios en la muestra inicial del tejido vegetal, debido a que los aislados D1 y D2 no esporularon en condiciones *in vitro*.

Por otra parte, los aislados C1 y C2 morfológicamente diferentes, corresponden a *Cladosporium* sp. de acuerdo a Angulo (2006) y Revelo et al. (2010), quienes reportaron que se trata del agente causal de las manchas cloróticas en hojas de naranjilla. Sin embargo, en este estudio no se comprobó la patogenicidad de dichos aislados. En la Tabla 9, la Figura 7, 8 y 9 se indican las características del cultivo y las estructuras observadas en el microscopio. El tamaño de los conidios que se reporta en este estudio es el promedio de 10 mediciones de largo y ancho de dichas estructuras (Anexo 1). Para la descripción morfológica se tomó como referencia las investigaciones de Abedy et al. (2022) y El-Dawy et al. (2021).

Tabla 9

Características del cultivo y microscópicas de los hongos correspondientes a

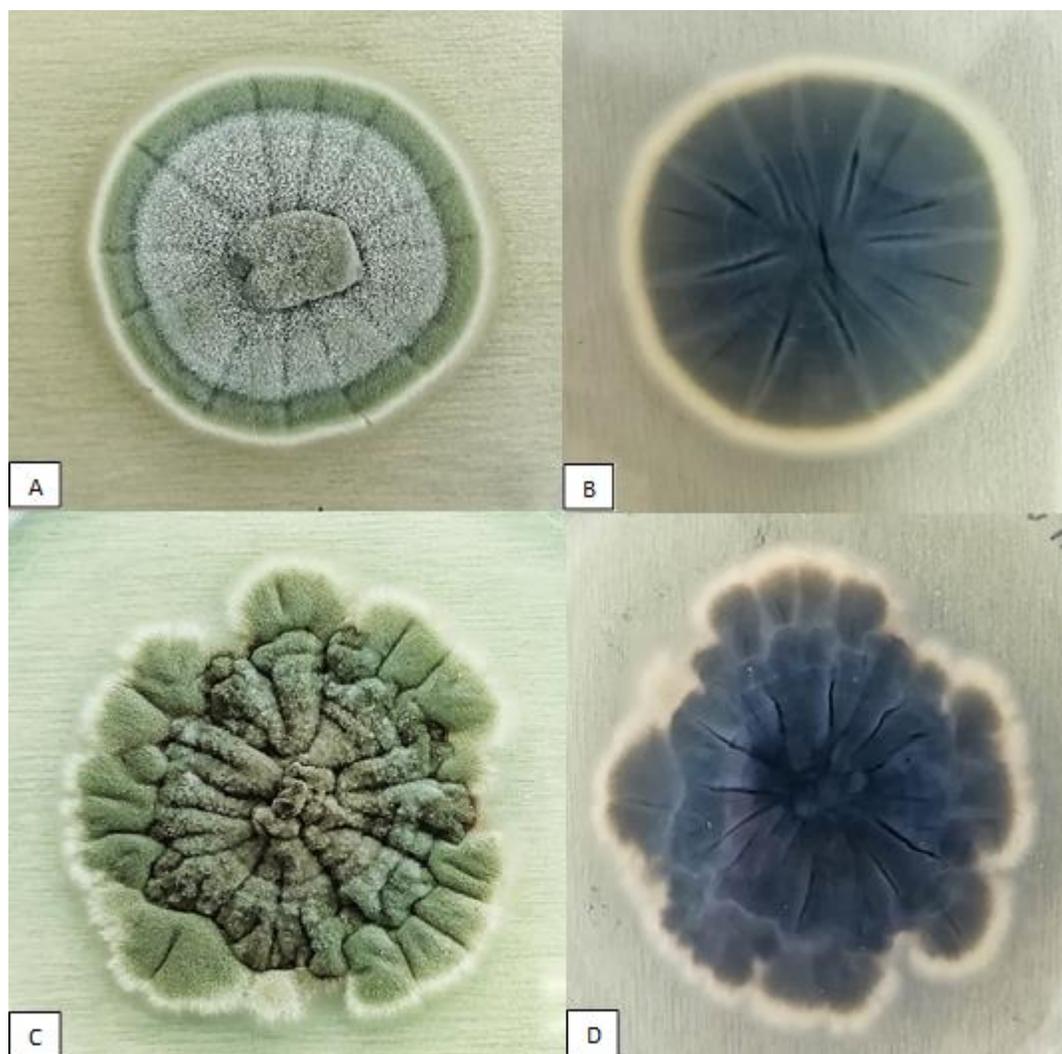
Cladosporium sp.

Características	Descripción	
	C1	C2
Colonia:		
color	verde oliva pálido y el centro blanquecino, debido a la esporulación	verde oliva pálido y el centro marrón claro, debido a la esporulación
textura	glabra, borde regular, circular y blanco	glabra, borde irregular, lobulado y blanco
reverso	de color gris, mantiene el borde blanco	de color gris, mantiene el borde blanco
Conidióforos:		
forma	individuales, cilíndricos alargados, sin septos, ramificados en los extremos	individuales, cilíndricos alargados, sin septos, ramificados en los extremos
Ramoconidios:		
forma	Elipsoide a cilíndrico-oblongo, más pequeños que en C2	cilíndricos, ligeramente más grandes que en C1
color	hialinos	marrón claro
Conidios:		
forma	circular, ovoide, subglobosa y limoniforme	circular, ovoide, subglobosa y limoniforme
tamaño	largo: $4.59 \pm 1.08 \mu\text{m}$ ancho: $3.16 \pm 0.39 \mu\text{m}$ largo x ancho: 2.7 a 6.7 x 2.7 a 3.9 μm	largo: $5.54 \pm 1.46 \mu\text{m}$ ancho: $3.35 \pm 0.33 \mu\text{m}$ largo x ancho: 4.2 a 8.7 x 3.1 a 4.1 μm

Nota. C1 y C2 corresponden a la nomenclatura utilizada para distinguir ambos aislados.

Figura 7

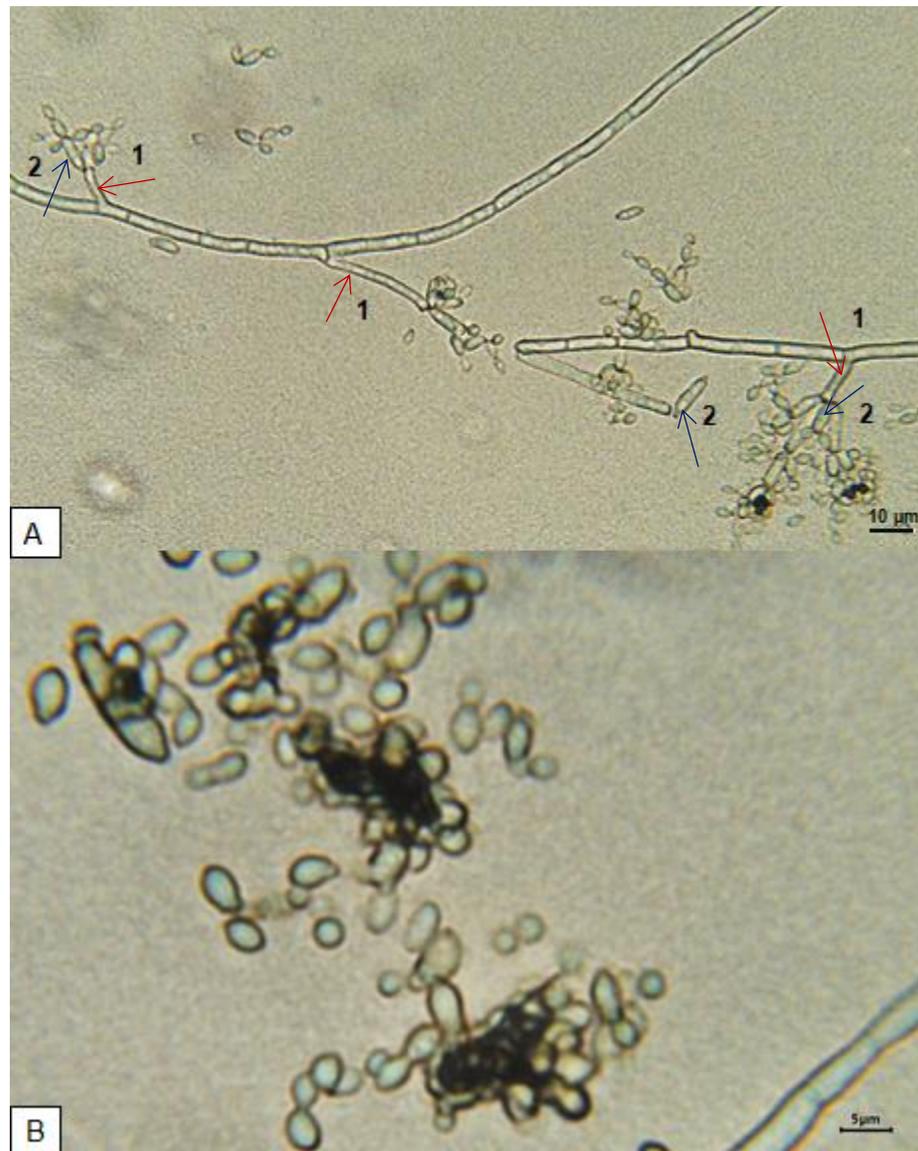
Cultivos de los aislado C1 y C2 en medio PDA a 25 °C de 8 días de crecimiento



Nota. (A) vista frontal del micelio de C1; (B) vista del reverso del cultivo de C1, (C) vista frontal del micelio de C2 y (D) vista del reverso del cultivo de C2.

Figura 8

Estructuras del aislado C1 observadas en el microscopio



Nota. A) 1. conidióforos y 2. ramoconidios secundarios, lente 40X (B) conidios, lente 100X.

Figura 9

Estructuras del aislado C2 observadas en el microscopio



Nota. A) 1. conidióforos y 2. ramoconidios secundarios, lente 40X; (B) conidios en formación, lente 40X y (C) conidios, lente 100X.

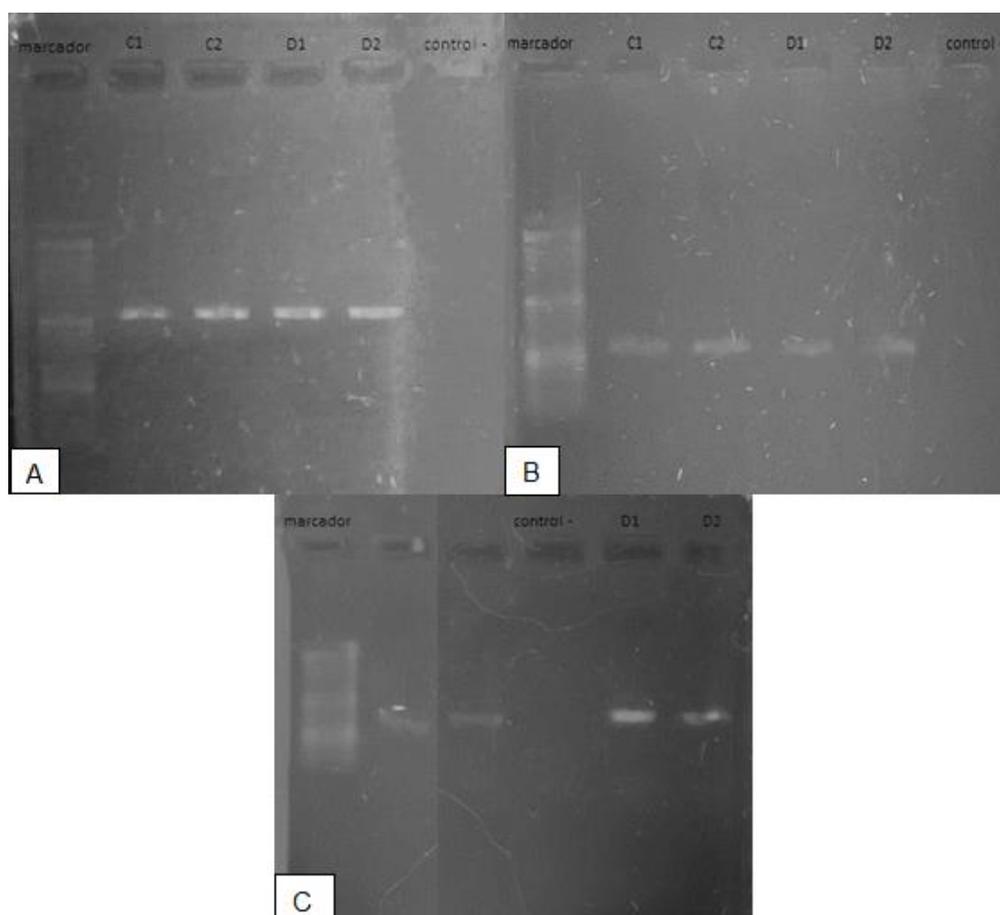
Posteriormente, se realizó la identificación molecular para los aislados D1, D2, C1 y C2 descritos en esta sección. Las pruebas de patogenicidad se realizaron únicamente para los aislados D1 y D2 mediante los postulados de Koch.

Identificación molecular

Los amplicones de cada marcador obtenidos por PCR, se visualizaron mediante electroforesis para verificar la calidad de los mismos y evaluar la presencia de productos de PCR indeseados, en la Figura 10 se puede apreciar las bandas obtenidas. De acuerdo a la lectura del marcador, el amplicón de ITS tiene un tamaño aproximado de 500 pares de bases (bp), el amplicón de ACT por su parte tiene alrededor de 200 bp y por último el de HIS 3 un aproximado de 350 bp.

Figura 10

Visualización mediante electroforesis de los amplicones obtenidos por PCR, (A) amplicones de ITS, (B) de ACT y (C) de HIS 3



Secuenciación

La búsqueda de homólogos en BLAST del NCBI para las secuencias de ADN consenso de ITS, ACT e HIS 3 correspondientes a los aislados D1 y D2 (Anexo 2), permitieron conocer que dichos aislados corresponden al género *Pseudocercospora*, sin embargo no se logró identificar la especie debido a que las secuencias de ITS y ACT presentaron 100% de identidad con varias especies dentro de este género, entre ellas *P. solani-pseudocapsicola*, *P. plumeriifolii*, *P. perae*, *P. vassobiae*. En el Anexo 3 se resumen los resultados de la búsqueda en BLAST. Además, la secuencia de HIS 3 fue descartada para el análisis posterior debido a que en la base de datos no existe reportes de esta secuencia para la mayoría de especies de *Pseudocercospora*. Los marcadores más utilizados son ITS, ACT, LSU y TEF-1 α (Crous et al., 2013; Silva et al., 2016).

Por otra parte, con respecto a los aislados C1 y C2, se logró determinar que pertenecen a *Cladosporium tenuissimum* y *Cladosporium cladosporioides* respectivamente. En este caso los marcadores ITS y ACT fueron suficientes para conocer la especie y género al que pertenecen dichos aislados. Las secuencias de ADN consenso de ambos aislados y los resultados de la búsqueda en BLAST se presentan en el Anexo 4 y 5.

Por lo tanto, el análisis posterior se realizó únicamente para los aislados D1 y D2 con el afán de conocer la relación de estos con otras especies previamente reportadas.

Análisis filogenético

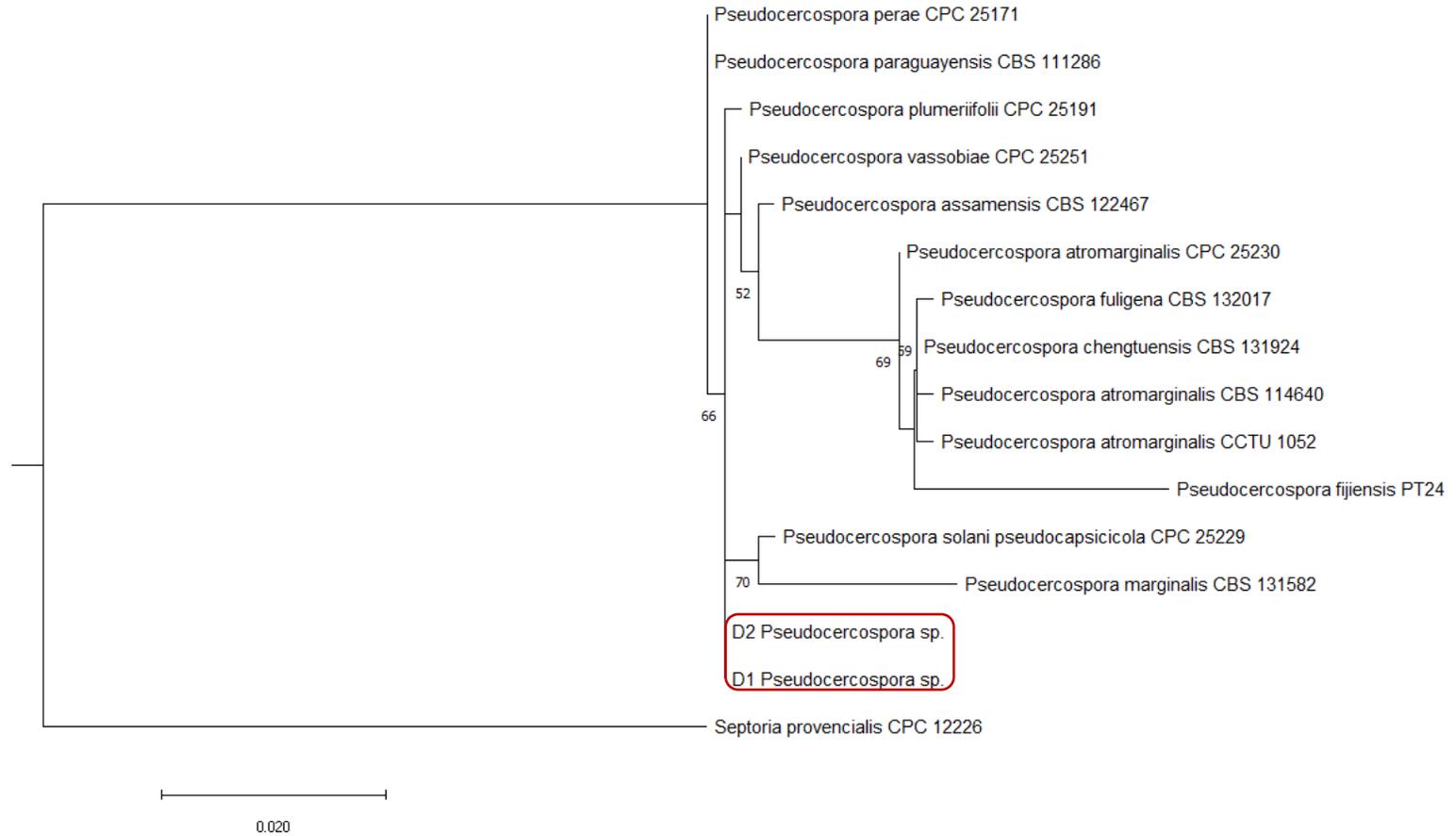
En el Anexo 6, se encuentra la información de las especies pertenecientes al género *Pseudocercospora* previamente reportadas que han sido consideradas para el presente estudio filogenético.

El árbol de máxima verosimilitud obtenido muestra que la especie más cercana a los aislados D1 y D2, que también afecta a la familia Solanaceae es *Pseudocercospora solani-pseudocapsicola* reportada en Brasil (Silva et al., 2016), seguida de *P. marginalis*, la cual presenta mayor distancia genética en comparación con la primera especie, ambas comparten un ancestro en común. Además, su agrupación está respaldada por un valor de soporte alto (70) (Figura 11). Las demás especies de *Pseudocercospora* que se conoce afectan a la familia Solanaceae, como es el caso de *P. atromarginalis*, *P. chengtuensis*, *P. fuligena* presentan mayor distancia genética con respecto a D1 y D2 y su agrupación presenta un valor de soporte alto (69) y no comparten un ancestro en común con D1 y D2.

También en el cladograma respectivo (Figura 12), se puede ver que los aislados D1 y D2 se agrupan en un clado aparte con un valor de soporte alto (90) y se mantienen cercanas a *P. solani-pseudocapsicola* y *P. marginalis*.

Figura 11

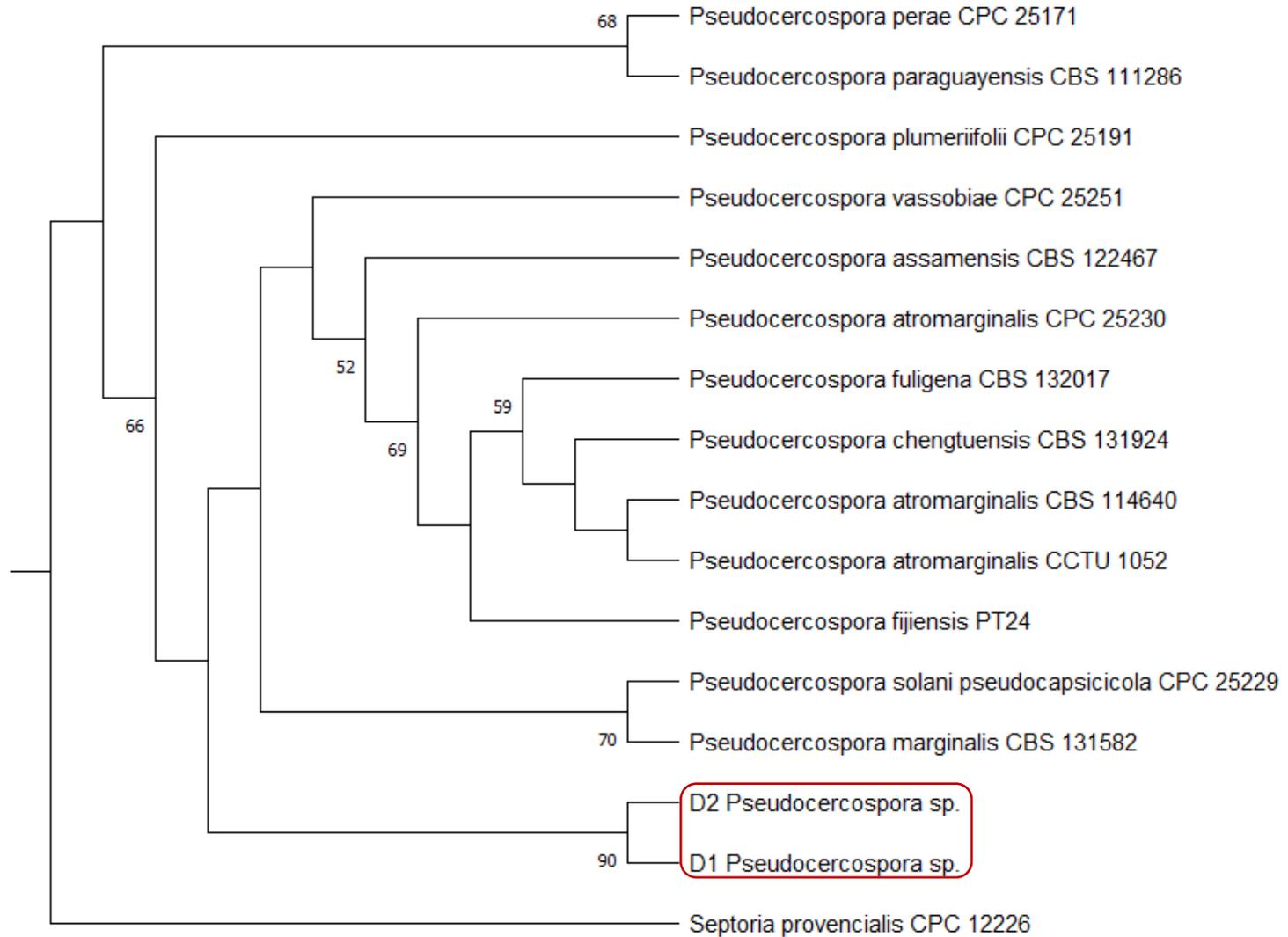
Árbol de máxima verosimilitud obtenido con la información de *Pseudocercospora* y el grupo externo



Nota. La escala de 0.02 representa que existe una diferencia de 2 bases por cada 100.

Figura 12

Cladograma obtenido para *Pseudocercospora* spp. y el grupo externo



Postulados de Koch

Mediante la inoculación de bloques de agar con micelio de los aislados D1 y D2, se comprobó que el hongo perteneciente al género *Pseudocercospora* es el agente causal de la cercosporiosis en naranjilla. Los primeros síntomas aparecieron 15 días después de la inoculación de las plantas. Sin embargo, Los síntomas bien desarrollados y signos de la enfermedad en estudio se observaron con claridad, un mes después y coinciden con aquellos observados en las hojas afectadas de naranjilla en el sector de Tandapi (Figura 13). En la Figura 14 se muestran los cultivos de D1 y D2 obtenidos del reaislamiento del patógeno y las estructuras fúngicas en formación observadas en el microscopio, correspondientes a *Pseudocercospora* sp., cabe mencionar que en condiciones *in vivo* el patógeno esporula con mayor facilidad que *in vitro*.

Figura 13

Síntomas de cercosporiosis observados en las plantas de naranjilla inoculadas

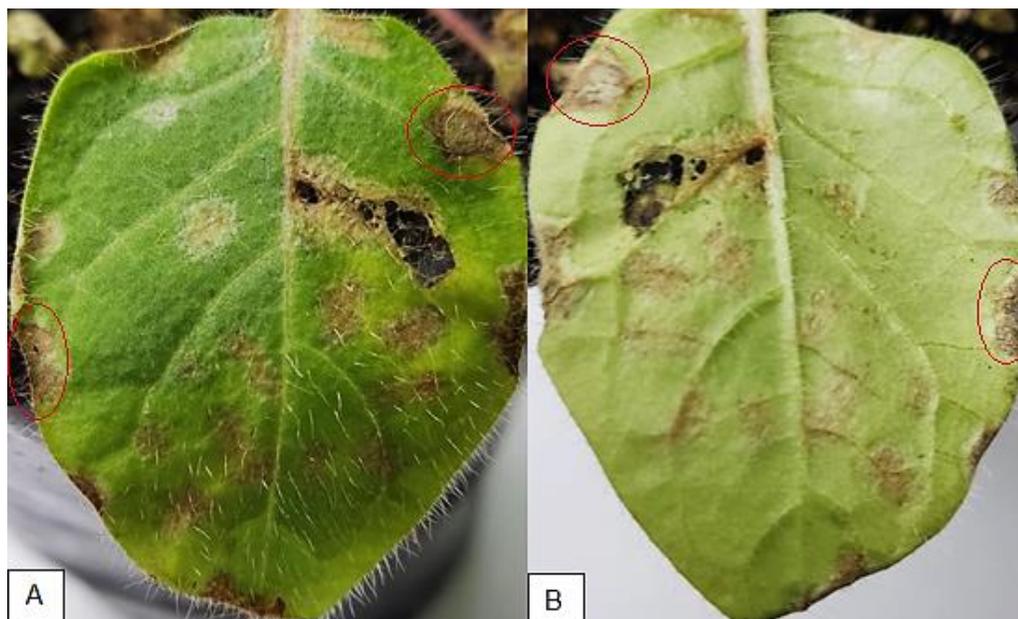
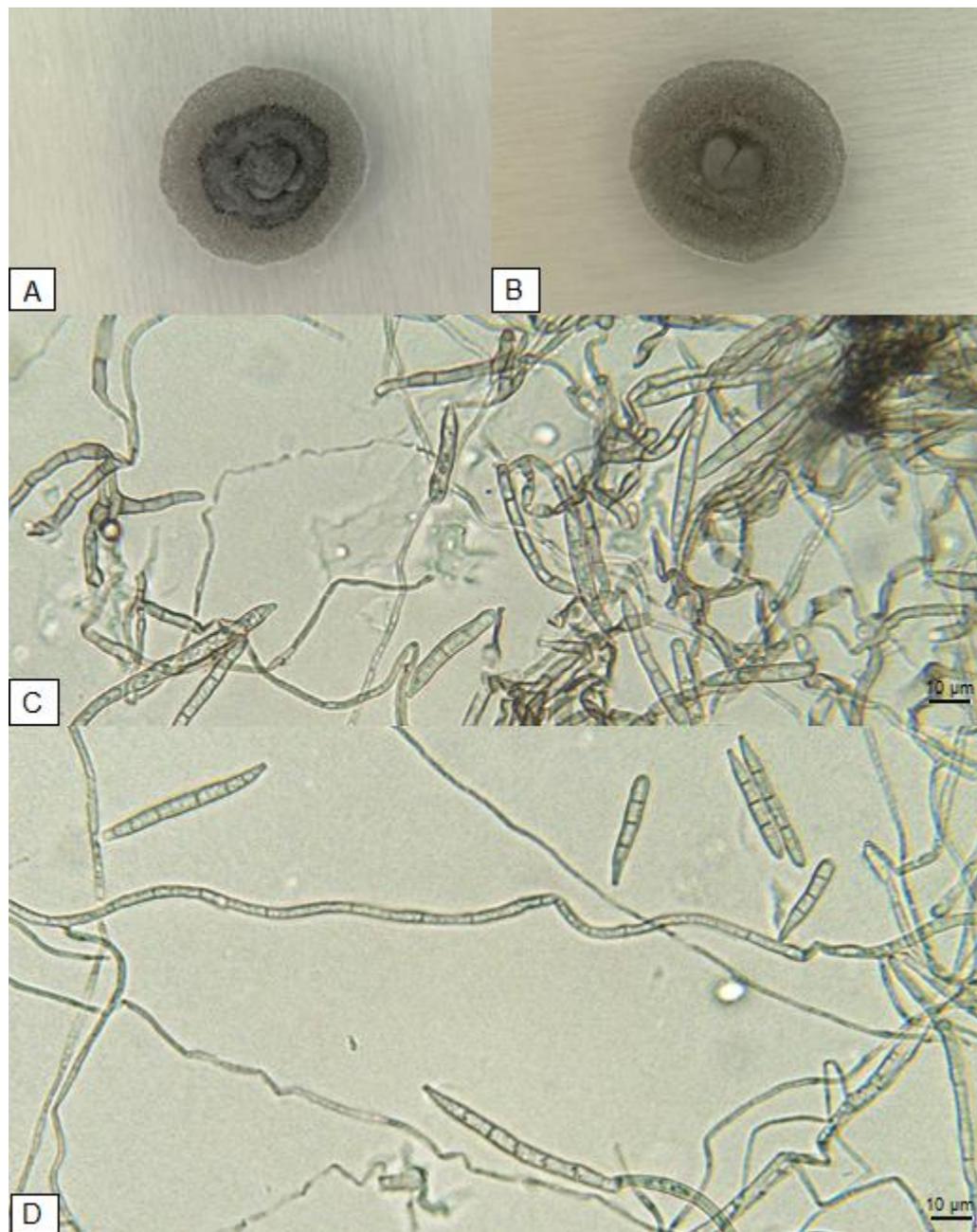


Figura 14

Cultivos de los aislados D1 y D2 y estructuras fúngicas observadas en el microscopio, correspondientes a *Pseudocercospora* sp.



Nota. (A) cultivo del aislado D1, (B) cultivo del aislado D2, ambos en medio PGA a 25 °C de 20 días de crecimiento (C) conidióforos en formación, lente 40X y (D) conidios, lente 40X.

Capítulo V: Discusión

Esta investigación proporciona la descripción macroscópica, microscópica y la identificación molecular del agente causal de la cercosporiosis en naranjilla, revelando que los aislados D1 y D2 del hongo fitopatógeno obtenidos a partir de muestras recolectadas en el sector de Tandapi (Pichincha) corresponden a *Pseudocercospora* sp. Anteriormente, Padilla et al. (1982) reportaron la presencia de manchas foliares de color café en varios cultivos de naranjilla cuasadas por *Cercospora* sp. siendo este el primer reporte en Ecuador.

Años mas tarde, Revelo et al. (2010) y Rogg (2000), confirmaron esta información, en base a descripciones de la morfología microscópica del patógeno observadas *in vivo*, lo cual no es suficiente para asegurar que el agente causal pertenece a dicho género. De igual manera, Crous et al. (2013) enfatizan que la identificación de especies basada únicamente en características morfológicas ha generado confusión en la taxonomía de los hongos cercosporoides. Desde entonces, en el país no se ha realizado una actualización acerca de esta enfermedad, y mucho menos con un enfoque molecular, en consecuencia no existen datos de secuencias de ADN fúngico que provengan de aislados ecuatorianos en la bases de datos Genbank, por lo que el aporte de esta investigación es de gran importancia para la prevención y control de las enfermedades foliares de la naranjilla.

El enfoque actual para la caracterización de hongos cercosporoides fitopatógenos consiste en la descripción combinada de los síntomas de la enfermedad, características de cultivo del patógeno, morfología microscópica, sea esta última *in vivo* o *in vitro*, especificidad del huésped y análisis moleculares del agente causal, conocido como el concepto de especie consolidada (Quaedvlieg et al., 2014; Świdarska-Burek et

al., 2020), permitiendo así tener una medida más robusta para la delimitación de especies.

Los síntomas ocasionados por *Pseudocercospora* sp. aquí descritos son similares en forma, tamaño, color y limitación de bordes por nervaduras de las hojas con aquellos reportados en otros huéspedes dentro de la familia Solanaceae en Brasil (Silva et al., 2016), incluso se aproximan a las descripciones observadas en otras familias de huéspedes según Crous et al. (2013). En general los síntomas que causan los hongos cercosporoides comparten características entre sí (Świdarska-Burek et al., 2020).

El género *Pseudocercospora* fue descrito por Spegazzini (1910) pertenece a la familia Mycosphaerellaceae (Capnodiales, Dothideomycetes). Actualmente se reconoce como un género holomorfo y varias especies tienen morfos sexuales (teleomorfos) similares a *Mycosphaerella* (Crous et al., 2013). Por ejemplo, *Pseudocercospora fijiensis* y su teleomorfo similar a *Mycosphaerella* que causan la Sigatoka negra de la hoja del banano (Arzanlou et al., 2008). De acuerdo a Bakhshi et al. (2014) es un gran género cosmopolita que comprende hongos endófitos o saprobios, unos pocos se utilizan como agentes de control biológico de malezas y en su mayoría patógenos de plantas, asociados comúnmente con manchas en hojas y frutos, reportados en una amplia gama de plantas huéspedes. Se han adaptado ya sea en ambientes áridos o húmedos y en una amplia gama de climas, incluidas las regiones templadas frías, predominando en regiones subtropicales y tropicales (Braun & Urtiaga, 2008; Crous et al., 2000).

El comportamiento *in vitro* de los hongos pertenecientes a *Pseudocercospora* spp. se caracteriza por un crecimiento lento en el medio de cultivo, en el presente

estudio las colonias aisladas a partir de hojas sintomáticas de naranjilla (*Solanum quitoense*) alcanzaron un diámetro de 17 a 19 mm después de 20 días de incubación. Resultados comparables con aquellos presentados por Silva et al. (2016), quienes reportan el aislamiento de colonias de *Pseudocercospora solani-pseudocapsicola* que afecta a *Solanum pseudocapsicum*, alcanzando un diámetro de 13 a 16 mm, colonias de *P. vassobiae*, aisladas de *Vassobia breviflora*, con un diámetro de 17 a 20 mm, ambas aisladas de huéspedes de la familia Solanaceae, reportando el crecimiento en el mismo rango de tiempo. El mayor tamaño (25 a 28 mm) de colonias corresponde a *P. perae* aislado de *Pera glabrata* (Euphorbiaceae) reportado por los mismos autores. Por otra parte, Crous et al. (2013) también reportaron resultados similares del diámetro alcanzado por los diferentes aislados que estudiaron, por ejemplo *P. punicae* recuperada de *Punica granatum* (Lythraceae), alcanzó un diámetro de 25 mm.

Cabe mencionar que para obtener aislados puros de *Pseudocercospora* spp. el método de siembra de tejido vegetal sintomático previamente desinfectado no es adecuado, debido al lento crecimiento de estos hongos, en consecuencia las colonias del patógeno terminan cubiertas por las de otros hongos de rápido crecimiento también presentes en la mancha foliar (Ávila et al., 2019), lo cual se comprobó también en esta investigación. De acuerdo a Riley et al. (2002) el tejido infectado puede contener uno o más organismos saprófitos que pueden crecer más rápidamente que el fitopatógeno en el medio de cultivo, impidiendo una identificación correcta del mismo. Además, en este caso la presencia de abundantes tricomas en las hojas de naranjilla y la acumulación de estructuras fúngicas en los mismos, dificultó aun más el aislamiento del patógeno mediante dicho método. En este sentido, la transferencia directa de conidios al medio de cultivo se ha convertido en el método más efectivo para el aislamiento de hongos

cercosporoides, en especial para *Pseudocercospora* spp. (Bakhshi et al., 2011, 2014; Crous, 1998; Silva et al., 2016).

Con respecto a la descripción microscópica de las estructuras fúngicas de *Pseudocercospora* spp., Crous et al. (2013) y Stewart et al. (1999) propusieron que se reconozcan como estructuras relevantes para este género, los conidióforos (disposición, ramificación, pigmentación), células conidiógenas (ubicación, proliferación, tipo de cicatriz), y conidios (formación, forma, septos y pigmentación), incluso el micelio (presencia o ausencia de micelio superficial y textura del mismo). Sin embargo, este género es morfológicamente heterogéneo, existe un amplio rango de características de dichas estructuras que se han aceptado dentro del mismo, al tiempo que son compartidas por otros géneros cercanos, entre ellos *Cercospora* y *Passalora*. Incluso Braun, (1996) y Pons & Sutton (1988) propusieron su división en varios géneros en función de las diferencias morfológicas, pero finalmente esto no sucedió.

Para superar los problemas taxonómicos ocasionados por la limitación de las características morfológicas a nivel genérico, junto con el considerable nivel de variabilidad dentro de las especies (Bakhshi et al., 2014), el análisis filogenético de secuencias de ADN ha aportado información clave para la identificación precisa de especies en este grupo de hongos. En investigaciones previas de filogenia para *Pseudocercospora* spp., se han utilizado con mayor frecuencia los siguientes marcadores, las regiones espaciadoras transcritas internas 1 y 2 que incluyen el gen 5.8S nrRNA (ITS), la subunidad grande del gen 28S nrRNA (LSU) y regiones de genes codificadores de proteínas, como el factor de elongación 1-alfa (TEF-1 α) y actina (ACT) (Bakhshi et al., 2014; Crous et al., 2013; Silva et al., 2016).

En esta investigación se utilizaron 2 de los 4 marcadores ya mencionados, ITS y ACT para la identificación molecular de los aislados D1 y D2. La búsqueda de homólogos en BLAST mostró que existe alto porcentaje de identidad entre las secuencias de ITS de los aislados obtenidos aquí con aquellas pertenecientes a *P. solani-pseudocapsicola* (100%), *P. perae* (99.57%), *P. vassobiae* (99.57%), *P. atromarginalis* (99.36%), entre otras (Anexo 3). Estas especies fueron aisladas de huéspedes de la familia Solanaceae, a excepción de *P. perae*, en diferentes localidades de Brasil. De acuerdo a Bakhshi et al. (2014) y Crous et al. (2013), la secuencia de la región ITS no logra diferenciar muchos taxones a nivel de especie dentro del género *Pseudocercospora*. La falta de resolución de esta región para este género también fue comentada por Silva et al. (2016) y se confirma aún más en el presente estudio. Una situación similar ocurrió para las secuencias de ACT, mostrando alta similitud con *P. perae* (100%), *P. vassobiae* (100%), *P. solani-pseudocapsicola* (98.58%) y *P. atromarginalis* (97.16%). Crous et al. (2013) y Silva et al. (2016) reportaron que las secuencias génicas parciales de las regiones codificantes de proteínas ACT, TEF-1 α y LSU fueron individualmente mejores para la identificación de *Pseudocercospora* spp., aunque estos loci aún demostraron estar relativamente conservados para varias especies dentro de este género, mostrando menos del 1% de variación en algunos casos, razón por la cual, los esfuerzos continuarán enfocados en la identificación de un marcador molecular más robusto para la discriminación de especies dentro de este género, por lo que el enfoque actual es utilizar 3 a 4 marcadores moleculares para lograr una identificación precisa a nivel de especie.

Con base en los resultados de la búsqueda en BLAST, el análisis filogenético de máxima verosimilitud se realizó tomando las secuencias de ITS y ACT de las especies que mostraron mayor similitud con los aislados D1 y D2. De acuerdo al árbol

filogenético obtenido de este análisis, se pudo establecer que la especie más cercana a ambos aislados es *P. solani-pseudocapsicola*, pues presenta la menor distancia genética hacia D1 y D2. Por otra parte, el cladograma mostró que los aislados D1 y D2 se agrupan en un clado aparte, con un valor de soporte alto (90). Además, investigaciones anteriores acerca de la filogenia del complejo *Pseudocercospora* revelaron que este género es polifilético (Crous et al., 2013; Hyde et al., 2013), lo que lleva a considerar la posibilidad de que D1 y D2 corresponden a una nueva especie, sin embargo con los marcadores utilizados no se logró determinar la misma, pues se requiere disponer de las secuencias de más marcadores, tales como LSU y TEF-1 α y aumentar el número de aislados en estudio, es decir realizar un análisis de coalescencia (Anisimova, 2019; Liu et al., 2009) y aplicar el concepto de especie consolidada, previamente descrito.

En el presente estudio únicamente se logró esclarecer el género del hongo fitopatógeno que está afectando a los cultivos de naranjilla en el sector de Tandapi, razón por la cual, ambos aislados han sido nombrados como *Pseudocercospora* sp. Además, la patogenicidad de los aislados D1 y D2 se comprobó mediante los postulados de Koch. Al cabo de 1 mes posterior a la inoculación de las plantas se observaron síntomas en las hojas, que coincidieron en forma, color, tamaño y tipo de borde con respecto a los inicialmente descritos en esta investigación, de igual manera los conidios observados en el microscopio coinciden en tamaño, color y forma con aquellos observados en las muestras tomadas de las hojas muestreadas y corresponden a *Pseudocercospora* sp.

Varias investigaciones concuerdan que los hongos pertenecientes a *Pseudocercospora* se consideran específicos del huésped. Por ejemplo, Crous et al.

(2013), reportaron que de los 146 taxones sujetos al análisis multigénico, solo cuatro se encontraron en más de un huésped. Este es el caso de *P. norchiensis* (Myrtaceae y Rosaceae), *P. fraxinites* (Oleaceae), *P. atromarginalis* (Solanaceae) y *P. corylopsidis* (Hamamelidaceae), las tres últimas especies se encontraron en diferentes géneros de huéspedes dentro de la misma familia de plantas, pero nunca en huéspedes no relacionados, más tarde Bakhshi et al. (2014) confirmó estos resultados. Por lo tanto las especies patógenas de *Pseudocercospora* no se consideran generalistas ya que comúnmente no ocurren en diferentes huéspedes que no están relacionados. Esta información respalda la posibilidad de que los aislados D1 y D2 correspondan a una nueva especie, pues hasta el momento, para la familia Solanaceae, únicamente se conoce que *P. atromarginalis* puede infectar a varios de sus miembros. En este sentido, Bakhshi et al. (2014); Crous et al. (2013) y Silva et al. (2016) plantean la necesidad urgente de realizar pruebas de patogenicidad para confirmar las inferencias de los estudios taxonómicos sobre la especificidad del huésped en este importante grupo de hongos fitopatógenos.

Además hace falta mayor generación y disponibilidad de secuencias de regiones génicas filogenéticamente informativas de *Pseudocercospora* spp. lo cual permitirá comprender la epidemiología de muchas enfermedades importantes de las plantas (Silva et al., 2016), incluyendo la cercosporiosis en naranjilla. Por último, se pudo constatar que no existen estudios similares en los países vecinos también productores de naranjilla, por lo que no fue posible realizar ninguna comparación al respecto y este aporte representa la primera actualización de esta enfermedad en muchos años, que servirá como referencia para futuros estudios de *Pseudocercospora* spp. y de hongos cercosporoides tanto a nivel nacional como regional.

Capítulo VI: Conclusiones

El ritmo de crecimiento en medio de cultivo y las características morfológicas de D1 y D2 coinciden con las descritas para aislados del género *Pseudocercospora*.

La identificación molecular permitió comprobar que los aislados D1 y D2 corresponden a *Pseudocercospora* sp., sin embargo para lograr determinar la especie se requiere disponer de más aislados fúngicos y secuencias de ADN de al menos otros dos marcadores más.

Las características microscópicas de los conidióforos y conidios de D1 y D2 son típicas del género *Pseudocercospora*, sin embargo no coinciden exactamente en forma, color y tamaño con las descripciones de las especies que han sido previamente reportadas como patógenos en la familia Solanaceae.

El análisis filogenético sugiere que los aislados D1 y D2 corresponden a una nueva especie de *Pseudocercospora*, que afecta a la naranjilla (*Solanum quitoense*), siendo *P. solani-pseudocapsicola* la especie con menor distancia genética hacia ambos aislados, considerando además que las especies de este género, por lo general, están asociadas a un solo huésped.

Los postulados de Koch permitieron comprobar la patogenicidad de D1 y D2, confirmando que *Pseudocercospora* sp. es el agente causal de la cercosporiosis en naranjilla.

Capítulo VII: Recomendaciones

Se recomienda usar el método de transferencia directa de esporas al medio de cultivo para hongos de lento crecimiento.

Probar nuevos medios, enriquecidos con tejido vegetal u otros componentes para mejorar el crecimiento y lograr la esporulación *in vitro* de *Pseudocercospora* sp. aislado de manchas foliares en naranjilla.

Obtener mayor cantidad de aislados fúngicos que provengan de diferentes zonas productoras de naranjilla que están siendo afectadas por la cercosporiosis y utilizar más de dos marcadores moleculares (ITS, ACT, LSU, TEF-1 α) para lograr determinar la especie de *Pseudocercospora*, reportada en esta investigación.

Socializar la información generada en esta investigación con expertos fitopatólogos y agricultores, para promover el uso adecuado de agroquímicos durante la prevención y control de enfermedades fúngicas en naranjilla.

Capítulo VIII: Bibliografía

Abedy, A., Musawi, B., Isawi, H., & Abdalmoohsin, R. (2022). Morphological and molecular identification of *Cladosporium sphaerospermum* isolates collected from tomato plant residues. *Brazilian Journal of Biology*, 82.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1590/1519-6984.237428>

Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Academic Press.

Aguirre, E., Piraneque, N., & Menjivar, J. (2012). Relación entre las propiedades edafoclimáticas y la incidencia de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en la zona bananera del Magdalena-Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 3(2), 13.

<https://doi.org/https://doi.org/10.22490/21456453.970>

Altschul, S., Gish, W., Miller, W., Myers, E., & Lipman, D. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403-410.

[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).

Angulo, R. (2006). *LULO: El cultivo*. Universidad de Bogota. https://doi.org/https://books.google.com.ec/books?id=_mjUUDHQwfcC&printsec=frontcover&dq=isbn:9589029795&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false

Anisimova, M. (2019). *Evolutionary Genomics: Statistical and Computational Methods (2nd ed.)*. Humana Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9074-0>

- Arzanlou, M., Groenewald, J., Fullerton, R., Abeln, E., Carlier, J., Zapater, M., . . . Crous, P. (2008). Multiple gene genealogies and phenotypic characters differentiate several novel species of *Mycosphaerella* and related anamorphs on banana. *Persoonia*, *20*, 19-37. <https://doi.org/https://doi.org/10.3767/003158508X302212>
- Asitimbay, C. (2019). *Uso de las alternativas biológicas para el control de Pseudocercospora fijiensis, agente causal de la Sigatoka negra en Banano*. Universidad de Guayaquil.
- Ávila, A., Romero, J., Agustí-Brisach, C., Benali, A., Roca, L., & Trapero, A. (2019). Phenotypic and pathogenic characterization of *Pseudocercospora* cladosporioides, causal agent of cercospora leaf spot of olives. *European Journal of Plant Pathology*, *156*(1), 45–65. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10658-019-01861-5>
- Bakhshi, M., Arzanlou, M., & Babai-Ahari, A. (2011). Uneven distribution of mating type alleles in Iranian populations of *Cercospora beticola*, the causal agent of *Cercospora* leaf spot disease of sugar beet. *Phytopathologia Mediterranea*, *50*, 101-109. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9009
- Bakhshi, M., Arzanlou, M., Babai, A., Groenewald, J., & Crous, P. (2014). Multi-gene analysis of *Pseudocercospora* spp. from Iran. *Phytotaxa*, *184*(5), 245-264. <https://doi.org/https://doi.org/10.11646/phytotaxa.184.5.1>
- Berrendero, E., Perona, E., & Mateo, P. (2008). Genetic and morphological characterization of *Rivularia* and *Calothrix* (Nostocales, Cyanobacteria) from

running water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(2), 447–460. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/ijs.0.65273-0>

Bonet, J., & Cardenas, J. (2012). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.). En G. Fischer, *Manual para el cultivo de frutales en el trópico* (págs. 600-626). Produmedios.

Braun, U. (1996). Taxonomic notes on some species of the *Cercospora* complex (IV). *Sydowia*, 48, 205–217.

Braun, U., & Urtiaga, R. (2008). New species and new records of cercosporoid Hyphomycetes from Venezuela. *Feddes Repertorium*, 119(5), 484–506. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/fedr.200811176>

Caicedo, J., Lalangui, K., Pozo, A., Cevallos, P., Arahana, V., & Méndez, K. (2017). Multilocus molecular identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum tamarilloi* as the causal agent of Tamarillo (*Solanum betaceum*) anthracnose in the Ecuadorian highlands. *European Journal of Plant Pathology*, 148(4), 983–996. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10658-017-1155-3>

Chang, J., Di Tommaso, P., & Notredame, C. (2014). TCS: a new multiple sequence alignment reliability measure to estimate alignment accuracy and improve phylogenetic tree reconstruction. *Molecular biology and evolution*, 31(6), 1625–1637. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/msu117>

Crous, P. (1998). *Mycosphaerella* spp. and their anamorphs associated with leaf spot diseases of Eucalyptus. *Mycological Memoirs*, 21, 1-170.

- Crous, P., & Braun, U. (2003). *Mycosphaerella and Its Anamorphs: 1. Names Published in Cercospora and Passalora*. Fungal Biodiversity Centre.
- Crous, P., Aptroot, A., Kang, J., Braun, U., & Wingfield, M. (2000). The genus *Mycosphaerella* and its anamorphs. *Studies in Mycology*, *45*, 107-121.
- Crous, P., Braun, U., Hunter, G., Wingfield, M., Verkley, G., Shin, H., . . . Groenewald, J. (2013). Phylogenetic lineages in *Pseudocercospora*. *Studies in Mycology*, *75*, 37–114. <https://doi.org/https://doi.org/10.3114/sim0005>
- Dávila, M., Chaves, W., & Yáñez, J. (2018). Fungal communities associated with symptomatic leaves of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) in the Ecuadorian Amazon region. *Revista Ecuatoriana de Medicina Y Ciencias Biológicas*, *39*(1), 39-49. <https://doi.org/10.26807/remcb.v39i1.561>
- El-Dawy, E., Gherbawy, Y., & Hussein, M. (2021). Morphological, molecular characterization, plant pathogenicity and biocontrol of *Cladosporium* complex groups associated with faba beans. *Scientific Reports*, *11*(1). <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/s41598-021-93123-w>
- Felsenstein, J. (2003). *Inferring Phylogenies*. Sinauer Associates, Inc.
- Hall, B. (2013). Building Phylogenetic Trees from Molecular Data with MEGA. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(5), 1229–1235. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/mst012>
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, *41*, 95-98.

- Hariharan, G., & Prasannath, K. (2021). Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: A Mini Review. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.600234>
- Hensel, M., Meason, C., Plumlee, Q., Myers, A., Coleman, M., Lawhon, S., . . . Rech, R. (2020). Retrospective Analysis of Aetiological Agents Associated with Pulmonary Mycosis Secondary to Enteric Salmonellosis in Six Horses by Panfungal Polymerase Chain Reaction. *Journal of Comparative Pathology*, 174, 1-7. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2019.10.002>
- Hyde, K., Jones, E., Liu, J., Ariyawansa, H., Boehm, E., Boonmee, S., . . . Dai, D. (2013). Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, 63, 1–313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s13225-013-0263-4>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2014). *Fruticultura: Naranjilla*. Obtenido de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rnaranjilla>
- Jaime, M., Álvarez, J., & Fischer, G. (2021). Aspectos de la fisiología y el cultivo de lulo (*Solanum quitoense* Lam.) en Colombia: Una revisión. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 13(1), 131-148. <https://doi.org/https://doi.org/10.22490/21456453.4641>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

- Kurtzman, C., Fell, J., & Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Kuzdraliński, A., Kot, A., Szczerba, H., Nowak, M., & Muszyńska, M. (2017). A Review of Conventional PCR Assays for the Detection of Selected Phytopathogens of Wheat. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 175-189. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000477544>
- Liu, L., Yu, L., Kubatko, L., Pearl, D., & Edwards, S. (2009). Coalescent methods for estimating phylogenetic trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(1), 320–328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.05.033>
- Martillo, E., & Solano, P. (2003). Situación de la Sigatoka negra en el Ecuador. En G. Rivas, & F. Rosales, *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos* (págs. 13-18). MUSALAC.
- Meghvansi, M., Khan, M., Gupta, R., & Veer, V. (2013). Identification of a new species of *Cercospora* causing leaf spot disease in *Capsicum assamicum* in northeastern India. *Research in Microbiology*, 164(9), 894–902. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.resmic.2>
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca . (2019). *Boletín Situacional - Naranjilla*. SIPA.
- Morante, C. (2016). Emergent Potato Leaf Spot Diseases in the Highland and Lowland Regions of Bolivia. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 7(8). <https://doi.org/https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000372>

- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford university press.
- Ownley, B., & Trigiano, R. (2017). *Plant Pathology: Concepts and Laboratory Exercises (3rd ed.)*. CRC Press.
- Padilla, F., Sánchez, J., & Estévez, C. (1982). Enfermedades fungosas de la naranjilla encontradas en algunas zonas del Ecuador. *Memorias de la Primera Conferencia Internacional de Naranjilla*. Quito: INIAP. Obtenido de <http://repositorio.iniap.gob.ec/jspui/handle/41000/111>
- Paredes, M., Yáñez, J., & Marcial, M. (2021). Identificación de *Cercospora* spp. como agente causal de mancha foliar en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra norte del Ecuador. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*, 42(2). <https://doi.org/https://doi.org/10.26807/remcb.v42i2.899>
- Park, M., Back, C., & Park, J. (2020). Occurrence of *Cercospora* Leaf Spot Caused by *Cercospora* cf. *flagellaris* on Melon in Korea. *Mycobiology*, 48(5), 418–422. <https://doi.org/https://doi.org/10.1080/12298093.2020.1792133>
- Park, S., Choi, I., Seo, K., Kim, J., Galea, V., & Shin, H. (2017). Identification and Characterization of *Pseudocercospora pyricola* Causing Leaf Spots on *Aronia melanocarpa*. *Mycobiology*, 45(1), 39–43. <https://doi.org/https://doi.org/10.5941/MYCO.2017.45.1>
- Pons, N., & Sutton, B. (1988). *Cercospora* and similar fungi on yams (*Dioscorea* species). *Mycological Papers*, 160, 1-78.

- Quaedvlieg, W., Binder, M., Groenewald, J., Summerell, B., Carnegie, A., Burgess, T., & Crous, P. (2014). Introducing the Consolidated Species Concept to resolve species in the Teratosphaeriaceae. *Persoonia*, 33, 1-40. <https://doi.org/https://doi.org/10.3767/003158514X681981>
- Ramírez, F. (2020). Notes about Lulo (*Solanum quitoense* Lam.): an important South American underutilized plant. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 68(1), 93-100. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10722-020-01059-3>
- Ramírez, F., Kallarackal, J., & Davenport, T. (2018). Lulo (*Solanum quitoense* Lam.) reproductive physiology: A review. *Scientia Horticulturae*, 238, 163-176. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.04.046>
- Revelo , J., Viteri , P., Vásquez , W., Valverde , F., León , J., & Gallegos, P. (2010). *Manual del Cultivo Ecológico de la Naranja*. . Quito: INIAP.
- Riley, M., Williamson, M., & Maloy, O. (2002). Plant disease diagnosis. *The Plant Health Instructor*, 5, 20-42. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1021-01>
- Rodríguez, D., Vega, L., Murillo, Á., & Peralta, E. (2017). Variabilidad patogénica de aislamientos de *Pseudocercospora griseola* en dos provincias de Ecuador. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*, 101(1), 107-119. <https://doi.org/https://core.ac.uk/download/pdf/268239367.pdf>
- Rogg, H. (2000). *Manejo integrado de plagas en cultivos de la Amazonía Ecuatoriana*. Abya Yala.

- Schoch, C., Seifert, K., Huhndor, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., . . . Consortium, F. B. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(6), 6241–6246.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Silva, M., Barreto, R., Pereira, O., Freitas, N., Groenewald, J., & Crous, P. (2016). Exploring fungal mega-diversity: Pseudocercospora from Brazil. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 37(1), 142–172.
<https://doi.org/https://doi.org/10.3767/003158516x691078>
- Silva, W., Gómez, P., Viera, W., Sotomayor, A., Viteri, P., & Ron, L. (2016). Selección de líneas promisorias de naranjilla para mejorar la calidad de la fruta. *ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana*, 3(1), 23-30.
<https://doi.org/https://doi.org/10.36331/revi>
- Spegazzini, C. (1910). Mycetes Argentinenses (Series V). *Anales del Museo Nacional de Historia Natural*, 20, 329–467.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stewart, E., Liu, Z., Crous, P. W., & Szabo, L. (1999). Phylogenetic relationships among some cercosporoid anamorphs of Mycosphaerella based on rDNA sequence analysis. *Mycological Research*, 103(11), 1491–1499.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1017/s0953756299008680>

- Świdarska-Burek, U., Daub, M., Thomas, E., Jaszek, M., Pawlik, A., & Janusz, G. (2020). Phytopathogenic Cercosporoid Fungi-From Taxonomy to Modern Biochemistry and Molecular Biology. *International journal of molecular sciences*, 21(22), 85-95. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/ijms21228555>
- The American Phytopathological Society. (4 de Enero de 2022). *Illustrated Glossary of Plant Pathology*. Obtenido de <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/illglossary/Pages/S-V.aspx>
- Tumbaco, J. (2011). *Evaluación del efecto sobre Sigatoka negra, en hojas separadas de banano, Cavendish (variedad Williams), del extracto de Melaleuca alternifolia en 3 zonas del litoral Ecuatoriano*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Uppala, S., Zhou, X., Liu, B., & Wu, M. (2019). Plant-Based Culture Media for Improved Growth and Sporulation of *Cercospora janseana*. *Plant disease*, 103(3), 504–508. <https://doi.org/https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0814-RE>
- Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics*, 27(2), 171–180. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>
- Vásquez, W., Viteri, P., Martínez, A., Villares, M., Ayala, G., & Jácome, R. (2011). NARANJILLA (*Solanum quitoense* Lam.) Tecnología para mejorar la productividad y la calidad de la fruta. *Folleto, Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias*.

Yarza, P., Yilmaz, P., Panzer, K., Glöckner, F., & Reich, M. (2017). A phylogenetic framework for the kingdom Fungi based on 18S rRNA gene sequences. *Marine Genomics*, 36, 33-39.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.margen.2017.05.009>

Anexos