



**Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del
moho gris en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)**

Jinez Rodríguez, Ivonne Estefanía

Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

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

Flores Flor, Francisco Javier PhD

02 de febrero de 2022

Resultado del análisis de Copyleaks



Estefania_Jinez_Tesis2022_Biotecnologia_ESPE.txt
Scanned on: 20:57 February 2, 2022 UTC



Overall Similarity Score



Results Found



Total Words in Text

Identical Words	82
Words with Minor Changes	33
Paraphrased Words	260
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, denominado “Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)” fue realizado por la señorita Jinez Rodríguez, Ivonne Estefanía el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto, cumple con los requisitos 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, 09 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, **Jinez Rodríguez, Ivonne Estefanía**, con C.C. 1718773169, declaro que el contenido, ideas y criterios del trabajo de integración curricular: "Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)" 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.

Sangoquí, 09 de febrero de 2022

A handwritten signature in blue ink, reading 'Ivonne Jinez', is written over a horizontal line. The signature is stylized and cursive.

Jinez Rodríguez, Ivonne Estefanía

C.C: 1718773169



Departamento de Ciencias de la Vida y de la Agricultura

Carrera de Ingeniería en Biotecnología

Autorización de publicación

Yo, **Jinez Rodríguez, Ivonne Estefanía**, con C.C. 1718773169, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar el trabajo de integración curricular: **"Caracterización a nivel morfológico y molecular del agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth)"** en el Repositorio Institucional, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi responsabilidad.

Sangolquí, 09 de febrero de 2022

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Ivonne Jinez', is written over a horizontal dotted line.

Jinez Rodríguez, Ivonne Estefanía

C.C. 1718773169

Dedicatoria

A Elizabeth, mi tía, mi hermana y mi mejor amiga. Por ti he llegado en donde me encuentro hoy, me enseñaste a apreciar el momento por más pequeño que este sea, aún sigo aprendiendo a vivir sin ti.

A Lorena, mi mamá, gracias por educarme, aconsejarme y apoyarme cuando más lo he necesitado, me has enseñado a ser perseverante, siempre encuentras la manera de tranquilizarme.

A Pablo, mi padre, por enseñarme a ser paciente, humilde y cómo bailar.

A mis abuelos Clara, Lautaro y Teresa, quienes me han enseñado la bondad y el perdón, siempre prestos a escuchar y aconsejar.

Agradecimientos

En primer lugar, agradezco al Dr. Francisco Flores, docente del departamento de Ciencias de la Vida y la Agricultura de la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE por ser un excelente maestro y tutor, gracias por siempre brindarnos la mano, apoyarnos en nuestros proyectos y permitirme desarrollar esta investigación en las instalaciones de IDgen.

A los técnicos del laboratorio de diagnóstico molecular IDgen, Vanessa y Francisco, por la apertura y el apoyo brindado durante la fase experimental del proyecto.

Agradezco a mi familia por ayudarme a ser perseverante, enseñarme a ser fuerte ante las adversidades y por el amor incondicional que a diario me brindan, nada de esto sería posible sin ustedes.

A Marco por alentar y apoyar todas mi ideas y sueños, gracias por existir y caminar de mi mano estos últimos años, este proyecto no habría concluido sin tí.

A Lizbeth, Gaby, Cynthia, Laura y Ricardo por enseñarme el valor de la amistad y la confianza, me han ayudado a crecer como persona y darme cuenta que los amigos son la familia que uno escoge.

A Belén y todos mis compañeros y amigos de la universidad, gracias por su cariño y consejos, nuestra convivencia me ha enseñado a crecer tanto personal como profesionalmente.

Índice de contenido

Carátula.....	1
Resultado del análisis de Copyleaks	2
Certificación.....	3
Responsabilidad de autoría	4
Autorización de publicación	5
Dedicatoria	6
Agradecimientos.....	7
Índice de contenido	8
Listado de tablas	11
Listado de figuras	11
Resumen.....	11
Abstract.....	14
Capítulo 1: Introducción.....	15
Planteamiento del problema	15
Justificación del problema.....	16
Objetivos.....	16
Objetivo General	16
Objetivos Específicos	16
Hipótesis	16
Capítulo II: Marco teórico.....	17

Mora de castilla y su importancia	17
Origen y descripción morfológica de la mora de castilla	17
Importancia del cultivo en el Ecuador.....	19
Enfermedades de la mora de castilla	20
Pudrición del fruto o moho gris	20
<i>Botrytis cinerea</i> como agente causal de la enfermedad del moho gris	22
Proceso de infección de <i>Botrytis cinerea</i>	22
Impacto económico en los cultivos infectados con <i>Botrytis cinerea</i>	24
Técnicas de control del fitopatógeno.....	25
Importancia de la identificación del fitopatógeno	26
Capítulo III: Metodología	26
Recolección de muestras.....	26
Aislamiento y crecimiento de los microorganismos asociados a la enfermedad	28
Siembra.....	28
Aislamiento de espora única.....	29
Identificación morfológica.....	29
Identificación macroscópica.....	29
Identificación microscópica.....	29
Identificación molecular.....	29
Extracción de ADN	29
Amplificación de marcadores moleculares.....	30

	10
Secuenciación de amplicones	31
Identificación de secuencias.....	31
Filogenia del agente causal	31
Postulados de Koch	35
Preparación del material vegetal	35
Inoculación.....	35
Capítulo IV: Resultados.....	35
Identificación morfológica.....	35
Identificación macroscópica.....	35
Identificación microscópica.....	40
Identificación molecular.....	42
Análisis filogenético	43
Postulados de Koch	47
Capítulo IV: Discusión	48
Capítulo V: Conclusiones	53
Capítulo VI: Recomendaciones	54
Capítulo VII: Referencias.....	54

Listado de tablas

Tabla 1: Programación del termociclador para la amplificación de fragmentos de interés	31
Tabla 2: Número de accesión de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético	33
Tabla 3: Origen de los aislados fúngicos y códigos asignados	35
Tabla 4: Descripción microscópica de los aislados	40
Tabla 5: Promedios y rangos del tamaño de los conidióforos de los aislados	41
Tabla 6: Resultados de la secuenciación y búsqueda de homólogos	43

Listado de figuras

Figura 1: Bayas recolectadas en el muestreo de caso	27
Figura 2: Comparación del estado de infección de la baya al momento de la toma de muestra	27
Figura 3: Morfología de los aislados de los sitios de muestreo 1 y 2	36
Figura 4: Muestra 2PA.1 a los 15 días de incubación	37
Figura 5: Esclerocios en las muestras 1SE.2 y 2PA.2	37
Figura 6: Esclerocios visualizados en un estereomicroscopio	38
Figura 7: Aislado 3PA.1	39
Figura 8: Fotografías de los geles de electroforesis mostrando los genes amplificados por muestra	42

Figura 9: Árbol de máxima verosimilitud obtenido en RAxML	45
Figura 10: Cladograma de las especies de <i>Botrytis</i> utilizadas en la filogenia de los aislados	46
Figura 11: Progresión de la enfermedad en frutos de mora de castilla	47
Figura 12: Conidióforos y conidios observados en la fruta inoculada con esporas de los aislados	47

Resumen

La mora de castilla es una planta nativa ecuatoriana que tiene una gran importancia económica a nivel nacional, pues es apetecida por su sabor dulce y su aporte nutricional. La identificación de patógenos en este cultivo es importante para controlar de forma oportuna y eficiente a los agentes causales de las enfermedades. *Botrytis cinerea* es uno de los hongos necrotróficos que más daños provoca a nivel de cosecha y post-cosecha en más de 200 especies de frutas y vegetales a nivel mundial por lo que su correcta identificación debe ser una prioridad. El presente proyecto de investigación tiene como objetivo caracterizar a nivel morfológico y molecular al agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de mora de castilla. Primero se aisló al hongo de frutos de mora de castilla con síntomas y signos de la enfermedad obtenidos de tres parcelas de la parroquia de Huachi Grande en Ambato, Ecuador; posteriormente se identificó a nivel microscópico, macroscópico y molecular al microorganismo aislado para finalmente completar los postulados de Koch utilizando frutos de mora de castilla sanos. En este proyecto se obtuvieron 3 aislados de *Botrytis cinerea* provenientes de 3 sitios de muestreo diferentes, los datos morfológicos y genealógicos sugieren que probablemente se trate de dos subpoblaciones distintas. Se recomienda realizar una identificación molecular de las subpoblaciones para conocer el nivel de patogenicidad y la resistencia a fungicidas de las cepas aisladas en Ecuador.

PALABRAS CLAVE

- ***RUBUS GLAUCUS* BENTH**
- ***BOTRYTIS CINEREA***
- **FITOPATOLOGÍA**
- **IDENTIFICACIÓN MOLECULAR**

Abstract

The Andean blackberry is a native Ecuadorian plant that has a great economic importance at national level, as it is prized for its sweet flavor and nutritional value. The identification of pathogens in this crop is important for the timely and efficient control of disease-causing agents. *Botrytis cinerea* is one of the necrotrophic fungi that causes the most damage at harvest and post-harvest level in more than 200 species of fruits and vegetables worldwide, so its correct identification should be a priority. The present research project aims to characterize at morphological and molecular level the causal agent of gray mold disease in Andean blackberry plants. First, the fungus was isolated from blackberry fruits with symptoms and signs of the disease obtained from three plots in the parish of Huachi Grande in Ambato, Ecuador; subsequently, the isolated microorganism was identified microscopically, macroscopically and molecularly to finally complete Koch's postulates using healthy blackberry fruits. In this project, 3 isolates of *Botrytis cinerea* were obtained from 3 different sampling sites; morphological and genealogical data suggest that they are probably two different subpopulations. Molecular identification of the subpopulations is recommended to know the level of pathogenicity and fungicide resistance of the isolates in Ecuador.

KEY WORDS

- ***RUBUS GLAUCUS* BENTH**
- ***BOTRYTIS CINEREA***
- **PHYTOPHATOLOGY**
- **MOLECULAR IDENTIFICATION**

Capítulo 1: Introducción

Planteamiento del problema

La mora de castilla de nombre científico *Rubus glaucus* Benth es una planta originaria de la región andina ecuatoriana, es cultivada de forma tradicional por pequeños y medianos productores en la sierra (INIAP, 2014) por su alta demanda en el mercado debido a su aporte nutricional, pues posee vitamina C, K, B6, A, fibra y minerales (Carillo et al., 2015), además se considera un producto con potencial de exportación debido a sus frutos dulces. En Ecuador, la mora de castilla se ha convertido en un cultivo de producción importante en los valles interandinos con alrededor de 5 000 ha de productores grandes y medianos, quienes se ven gravemente afectados por plagas fúngicas que atacan al fruto, siendo el 91,8% de las enfermedades correspondiente a daños por hongos del género *Botrytis* (Villares et al., 2016).

El género de hongos *Botrytis* son ascomycetos con aproximadamente 35 especies necrotróficas que afectan a un amplio número de hospedadores y se diferencian principalmente en la morfología, virulencia, rango y especificidad hacia el hospedador (Elad et al., 2015), los hongos del género *Botrytis* se caracterizan por producir enzimas con la capacidad de eliminar la pared celular, toxinas y compuestos de bajo peso molecular del hospedador, con la finalidad de provocar la muerte celular, obtener nutrientes y colonizar (Steentjes et al., 2021; Williamson et al., 2007); las esporas se transmiten por el aire y pueden permanecer inactivas hasta que las condiciones climáticas le permitan desarrollarse, puede afectar tanto al fruto, flor, hoja y tallo, los síntomas incluyen lesiones blandas “podridas” mientras que los signos más comunes son lesiones gris-marrones y la presencia de esporas de color blanco-gris (Koppert Biological Systems, 2021).

Justificación del problema

Botrytis cinerea es el hongo causante de la enfermedad del moho gris o podredumbre del fruto, afecta a más de 500 especies de cultivos de frutas y hortalizas a nivel mundial como: manzana, mora, brócoli, pepinillo, limón, lechuga, uva, fresa, frambuesa, etc. (Williamson et al., 2007; Romanazzi & Feliziani, 2014). La enfermedad puede causar pérdidas económicas entre los 10 y 100 mil millones de dólares a nivel mundial (Hua et al., 2018), por lo cual su identificación y reporte en cultivos susceptibles debe ser considerado una prioridad, pues con estos datos se pueden establecer planes de control y manejo de la plaga.

Este trabajo de investigación pretende caracterizar a nivel morfológico y molecular al agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de mora de castilla y reportar su presencia en Ecuador.

Objetivos

Objetivo General

Caracterizar a nivel morfológico y molecular el agente causal de la enfermedad del moho gris en plantas de mora de castilla.

Objetivos Específicos

- Recolectar frutos de mora de castilla con sintomatología de la enfermedad de la pudrición del fruto.
- Identificar macro y microscópicamente al microorganismo aislado a partir de las muestras.
- Identificar a nivel molecular al microorganismo.
- Completar los postulados de Koch en frutos sanos de mora de castilla.

Hipótesis

La enfermedad de la pudrición del fruto en la mora de castilla es causada por el hongo *Botrytis cinerea*.

Capítulo II: Marco teórico

Mora de castilla y su importancia

Origen y descripción morfológica de la mora de castilla

Origen.

La mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) fue descrita por primera vez por Benth, se considera originaria de las zonas tropicales altas de América, y se cultiva desde Estados Unidos en el Norte, hasta Bolivia en el sur, pasando por México, Guatemala, Honduras, El Salvador, Panamá, Colombia y Ecuador (Franco & Giraldo, 1999)

El género *Rubus* se encuentra ampliamente distribuido en todo el mundo, los cultivos de estas plantas se encuentran en un amplio rango de regiones que va desde regiones tropicales hasta subárticas, además son originarias de América del Norte y Europa (López et al., 2019). Las especies europeas y americanas se separaron producto de los movimientos glaciares de la edad de hielo (Bejarano, 1992). Se considera que existe una cantidad de especies que oscila entre los 600 y 800 miembros dentro del género *Rubus*, y la dificultad de clasificación taxonómica se debe a la prevalencia de hibridaciones interespecíficas, poliploidía y apomixis (Thompson, 1995).

A pesar de que se conoce que existen especies silvestres en Centro y Suramérica, no es posible asegurar que sean nativas, introducidas o parcialmente domesticadas (Montalvo, 2011). En Ecuador, existen plantas del género *Rubus*, especialmente *Rubus glaucus* (mora de Castilla) que se desarrolla en la región de los Andes creciendo incluso de forma silvestre, pero lo más común es que sea cultivada, desde 1924 ya se encontraron pequeñas plantaciones en Ibarra, Otavalo, Quito y Ambato (Popenoe, 1924) actualmente la mora de castilla se cultiva en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (Iza et al., 2020).

Morfología.

La mora de castilla es una planta perenne, semierecta, con un tamaño arbustivo, sus tallos son rastreros o semierguidos formando macollas (Franco & Giraldo, 1999). Presenta inflorescencias usualmente en racimos terminales, aunque también pueden ser en las axilas de las hojas, con un número de flores que va de 15 a 22 (Romolerux, 1996).

Las raíces alcanzan una profundidad de 30cm y se disponen de forma horizontal y longitudinal de 0,5 a 1,2m de largo. Las raíces permiten la propagación de la planta porque tienen yemas vegetativas que pueden dar lugar a nuevos brotes (Franco & Giraldo, 1999). Además, las raíces son racimosas, filiformes y nudosas, formándose a partir del cuello cicatrizal en los casos de estacas y acodos (Montalvo, 2011).

Los tallos tienen una longitud variable y pueden ramificarse, presentan aguijones y constantemente surgen nuevos brotes en la base (Franco & Giraldo, 1999). En su estado adulto, la planta tiene tallos de longitud media de 3,22m y diámetro de 8,5mm, el número de espinas en las ramas productivas es en promedio 111, con un tamaño de 3,4mm, mientras que las ramas vegetativas tienen 823,1 espinas de 4,47mm (Iza et al., 2020). El tallo tiene un color que varía del cenizo al rojo, y algunos están cubiertos de polvillo azul blanquecino, verde o café oscuro (Montalvo, 2011). Las hojas se ubican de forma alternada, con tres folíolos, tienen bordes aserrados, de color verde el envés y blanquecino en el revés (Franco & Giraldo, 1999); el ápice es acuminado (Iza et al., 2020).

Las flores se disponen formando racimos, los pétalos son lanceolados (Iza et al., 2020), su color es blanco, con un diámetro entre 2 a 2,5cm, están compuestas de 5 sépalos permanentes y 5 pétalos, poseen múltiples estambres y carpelos (Montalvo, 2011). El fruto se compone de drupas que contienen una semilla, el tamaño de los frutos puede variar (Franco & Giraldo, 1999) pero en general su diámetro es de

20,15mm, su longitud 22,54mm, su peso es de 4,5g, tienen una forma oval estrecha y son de color rojo o púrpura (Iza et al., 2020). La maduración de los frutos es dispereja debido a que la floración no es homogénea, sin embargo, presentan intervalos de mayor producción cada 5 o 6 meses (Franco & Giraldo, 1999).

Importancia del cultivo en el Ecuador

La importancia comercial de la mora se ve reflejada en los esfuerzos en investigación que actualmente se están realizando. Con el objetivo de potenciar el material vegetal disponible y rescatar la variabilidad genética del género *Rubus*, el Programa Nacional de Fruticultura del INIAP inició en el año 2008 un plan de mejoramiento en mora, a partir de ello seleccionaron nuevos materiales con características agronómicas y calidad deseables a mediano plazo (Garrido, 2009). Finalmente, en 2013 se liberó la variedad INIAP Andimora 2013, la cual presenta características de alta producción, calidad y ausencia de espinas, siendo una alternativa frente a los cultivares comerciales actuales como la mora de Castilla (Martínez et al., 2013).

Actualmente en Ecuador se cultivan y propagan diferentes variedades de mora de forma asexual (Vásquez et al., 2019) a saber: de Castilla, Colombiana, Brazos y la variedad INIAP Andimora 2013 (Viteri et al., 2016). Cada cultivar cuenta con características morfológicas, de rendimiento y calidad que las diferencia. La mora de Castilla produce buena cantidad de ramas vegetativas que requieren poda para incentivar la producción, presenta espinas que dificultan la manipulación, bajo rendimiento (2,65 kg/planta) y 9,84 °Brix, por lo general presenta amarillamientos continuos en las hojas (Almache, 2017). La variedad Colombiana tiene un rendimiento de 6 kg/planta y 7,43 °Brix (Almache, 2017), la variedad Brazos rinde 3 kg/planta y tiene 10 °Brix (Torgrimson et al., 2009) y Andimora rinde 7,2 kg/planta y tiene 12,6 °Brix (Martínez et al., 2013). Los cantidad de grados Brix hacen de la mora de Castilla una

variedad apetecida y que su variabilidad genética ha permitido la obtención de la variedad Andimora (Iza et al., 2020).

A nivel internacional, cerca del 90% de la producción de mora es procesada para generar alimentos o productos relacionados, mientras que el 10% se consume como fruta fresca (Montalvo, 2011). Por ejemplo, la demanda de frutas frescas y hortalizas en España en el año 2016 comprendió un total de 2.313 millones de euros y 2,9 millones de toneladas respectivamente, de ellos, la importación de frutas se situó en 1,6 millones de toneladas y 1.576 millones de euros (Duarte et al., 2018).

En Ecuador, la mora de castilla se destina principalmente para consumo fresco y agroindustria, y los rendimientos promedios anuales se han incrementado de 2,19 t/ha en el 2000 a 6,80 t/ha en 2016 producto de una mejora tecnológica del agro (Barrera et al., 2017). La mejora en el rendimiento se debe a que los productores buscan sistemas de producción de mora que tengan amplia temporada de fructificación y frutas de calidad (Fernández et al., 2015), sin embargo, a pesar del gran potencial agrícola de la mora en el país, este cultivo no se ha desarrollado según lo deseado, debido a la falta de materiales vegetales promisorios que sustituyan o complementen a los materiales cultivados tradicionalmente (Iza et al., 2020).

Enfermedades de la mora de castilla

Pudrición del fruto o moho gris

La enfermedad es causada por hongos del género *Botrytis*, los cuales generan la pudrición del fruto, puede quemar las ramas y ocasionalmente atacar a las hojas. Esta enfermedad es capaz de podrir las frutas de parte o todo el racimo (Montoya et al., 1997). además de que afecta a los frutos en sus diferentes etapas de desarrollo, mostrándose como decoloración, pudrición, deshidratación, crecimiento de moho aterciopelado de color gris, verde oliva o café claro, como resultado los frutos se pueden caer o momificar (Mora et al., 2020). Constituye una enfermedad difícil de erradicar

porque el hongo permanece en los desechos de las plantas, frutas y suelo por mucho tiempo, por lo que una forma de controlar es quemando los desperdicios y aplicar fungicidas. Es importante, controlar el ciclo de cosecha, sin dejar sobremadurar los frutos y podar las ramas secas en las que puede estar la enfermedad. El exceso de humedad es un factor que favorece el avance de la enfermedad (Montoya et al., 1997).

Roya.

Esta enfermedad es provocada por hongos del género *Gymnocoria*, causan manchas naranjas o amarillas en el envés de la hoja, mientras que el haz se observa de color morado. Por otro lado, los tallos se observan agrietados y puede atacar a las flores y frutos. Los factores que promueven esta enfermedad son el exceso de humedad, presencia de maleza y residuos de cosecha no destruidos (Montoya et al., 1997).

Antracnosis.

Es una enfermedad recurrente que afecta a diversos frutales de climas fríos y cálidos (Mora et al., 2020). Es causada por el hongo *Colletotrichum gloesporioides*, también conocida como tuna negra y genera daños en tallos y ramas en diferentes estados de desarrollo. Se observa como manchas color morado o violáceo que luego se vuelven negras y agrietan. La enfermedad se complica por el exceso de humedad y abundancia de maleza (Montoya et al., 1997).

Mildeo polvoso o cenicilla.

Esta enfermedad es causada por un hongo del género *Oidium*, y se caracteriza por generar cambios de coloración en las hojas de las ramas jóvenes, estos cambios se perciben como mosaico, además, la parte superior de las hojas y tallos se observan con polvo de color blancuzco (Montoya et al., 1997). La enfermedad puede afectar los botones y frutos, que se observan cubiertos por polvillo, además del cambio de coloración las hojas se deforman (Mora et al., 2020).

Mildeo velloso.

La enfermedad es causada por el hongo *Peronospora sparsa*. Los síntomas en las hojas son poco frecuentes y solo se evidencian en el envés, mientras que los botones florales muestran lesiones café claro o negras, que continúan desarrollándose hasta cubrir todo el botón, los pedúnculos se secan, los peciolo tienen lesiones moradas sobre las forman las esporas (Mora et al., 2020). En los frutos la enfermedad se caracteriza por decoloración y hundimiento en la estructura. La alta humedad y microclimas dentro del cultivo favorecen el progreso de la enfermedad (Montoya et al., 1997).

Agalla de la Corona.

La bacteria causante de esta enfermedad es *Agrobacterium tumefaciens*, y se caracteriza por la presencia de agallas o tumores en el tallo, cerca al cuello de la raíz. La enfermedad se propaga por el contacto con herramientas contaminadas, por lo que una forma de controlar la enfermedad es seleccionando adecuadamente los materiales (Montoya et al., 1997).

Muerte Descendente.

Los patógenos que pueden producir esta enfermedad son: *Gloesporium sp.* y *Colletotrichum sp.* Se observa como manchas grises o café morado. Las ramas son afectadas desde su parte superior y cuando los frutos son afectados, éstos se secan, no maduran y deforman. En estado avanzado, se produce la muerte de la planta (Montoya et al., 1997).

***Botrytis cinerea* como agente causal de la enfermedad del moho gris**

Proceso de infección de Botrytis cinerea

El proceso o ciclo de infección de *Botrytis cinerea*. se describe en 5 etapas: fijación del conidio en la superficie del huésped; penetración de la superficie;

destrucción del tejido y formación de lesión primaria; expansión de la lesión o maceración del tejido; y finalmente esporulación (Hua et al., 2018).

Los conidios de *B. cinerea*. Se transportan por largas distancias por el viento hasta el aterrizaje del conidio en la superficie del huésped, lo que marca el comienzo del ciclo de la enfermedad (Jarvis, 1977). Para que el conidio germine es necesario condiciones adecuadas de temperatura y especialmente de humedad, requiriendo de agua superficial libre o una humedad relativa >93% (Williamson et al., 1995).

Cuando el conidio germina, produce un tubo germinativo que actúa como un apresorio y le permite penetrar la superficie (van Kan, 2005). Los apresorios desarrollado por *B. cinerea* son estructuras en forma de clavija que penetran a través de la cutícula usando tanto presión física como daño químico, a diferencia de otros hongos, *B. cinérea* no usa solo presión física pues no produce la cantidad de melanina necesaria para mantener la presión física resultante de la alta presión osmótica de las células del huésped, sino que también produce proteínas BcPLS1 asociadas a la membrana BcPLS1 que facilitan la penetración del patógeno al inducir la muerte celular programada (van Kan, 2006). El ingreso del apresorio resulta en la muerte de las células contiguas de forma que ocurre la lesión primaria, que puede estar seguida de una respuesta de defensa por parte del huésped, que libera metabolitos secundarios o producen la necrosis de las células (van Kan, 2005).

La etapa de lesión primaria puede mantenerse de forma indefinida si la respuesta defensiva del huésped se mantiene, sin embargo, esto depende del organelo afectado y de su estadio de desarrollo, por ejemplo, en la fresa, la lesión primaria en el botón floral puede permanecer inalterable hasta que da inicio la floración debido a que el sistema de defensa se rompe y el hongo comienza a crecer de forma vigorosa, lo corresponde a la siguiente etapa de desarrollo, la expansión de la lesión y el hongo finalmente esporula creando los conidios que se liberarán y darán inicio a un nuevo ciclo

de infección, bajo condiciones óptimas, un ciclo de infección tiene una duración de 3 o 4 días, dependiendo del tejido afectado (van Kan, 2005).

B. cinerea provoca la condensación nuclear y daño de la membrana vegetal, es decir, causa la muerte de las células antes de invadir con las hifas, lo que se observa como un anillo de células muertas alrededor del patógeno (Govrin & Levine, 2000).

B. cinerea posee dos formas de reproducción. Las esporas asexuales son conidios capaces de dispersarse fácilmente con el viento o agua, sin embargo, poseen baja resistencia a condiciones climáticas de baja humedad (Brandhoff et al., 2017), mientras que su reproducción sexual está dictada por la formación de ascosporas, siendo *Botryotinia fuckeliana* su teleomorfo (Williamson et al., 2007).

Impacto económico en los cultivos infectados con *Botrytis cinerea*

La pudrición del fruto, moho gris o pudrición blanda causada por *Botrytis cinerea*, es una enfermedad autora de grandes pérdidas económicas por lo que se considera uno de los principales problemas fitosanitarios (Quinatoa, 2015). *B. cinérea* es capaz de infectar alrededor de 500 especies diferentes (Williamson et al., 2007), y muchos de los cultivos afectados tienen gran importancia económica, como la uva, fresa y tomate, generando efectos económicos desastrosos (Dean et al., 2012), además de que no solo afecta a los frutos, sino también a los tallos, flores, hojas y semillas (Hua et al., 2018).

La enfermedad del moho gris puede mostrar síntomas antes de la cosecha, o permanecer inactivo y manifestarse una vez cosechados los frutos, dependiendo de la especie afectada (Fillinger & Elad, 2016). Se calcula que entre el 20% y 25% de todas las frutas y verduras cosechadas alrededor del mundo se pierden anualmente en el campo y en la cadena de suministro, debido al ataque de patógenos fúngicos que ocasionan su pudrición; estos patógenos muestran en su mayoría un estilo de vida necrotróficos o saprotróficos, como *B. cinérea* (Petrasch et al., 2019). Por lo tanto, *B. cinérea* se considera uno de los patógenos más importantes y se calcula que fácilmente

genera pérdidas de alrededor de 10 000 millones de dólares en el mundo (Weiberg et al., 2013). Las repercusiones económicas de *B. cinérea*, no solo se debe a los daños generados por la enfermedad, también es necesario considerar los gastos económicos acarreados por los intentos para controlar al patógeno; actualmente el moho gris es controlado con fungicidas sintéticos, calculándose que, del total de los fungicidas usados en todo el mundo, el 8% se destina para tratar la pudrición del fruto, por lo que los gastos superan los 1 100 millones de dólares (Dean et al., 2012). Pese a estos esfuerzos, los resultados obtenidos no son por completo satisfactorios, debido a que el genoma de *B. cinérea* es altamente plástico y propenso a desarrollar resistencia a los fungicidas utilizados (Hua et al., 2018).

En el caso de la mora de castilla, *B. cinérea* es el causante de la reducción del rendimiento de los cultivos, pérdidas por pudrición o necrosis del fruto, quemaduras en las inflorescencias e incluso momificación cuando existen más patógenos asociados (Mora, Pardo & Bastidas, 2020).

Técnicas de control del fitopatógeno

Las estrategias de control del fitopatógeno son variadas, desde la prevención y reducción del daño con técnicas tradicionales, hasta el uso de fungicidas. Las técnicas tradicionales consisten en sembrar las plantas con una distancia de 2 metros entre cada planta, podar las ramas secas y cosechar los frutos cuando se encuentran en el punto de madurez óptimo. Además de podar y desyerbar periódicamente las plantas y quemar todo el material afectado, como los frutos, ramas y hojas (Mora, Pardo & Bastidas, 2020).

El control químico de *B. cinerea* incluye Bavistin FL (Carbedazim) 1 cc/L de agua; Novak M 70% (Tiofanato metil) 0.5-1 g/L de agua; Euparen M 50 PM (Tolyfluand) 2 g/L de agua; Anvil (Hexaconazole) 0.5 cc/L de agua; entre otros. Existen productos ecológicos que se puede usar, como Fungbacter (20% cloruro de N-Alquil, dimetil,

bencil amino) 1.5 cc/L y Milsana (Extracto de Reysa) 2-3 cc/L. Un controlador biológico que se puede usar es *Trichoderma* 5g/L (Soria *et al.*, 2011). Todos los productos mencionados se encuentran a la venta en Ecuador.

Importancia de la identificación del fitopatógeno

B. cinerea posee gran importancia científica y económica, lo que se ve reflejado en el hecho de ser considerado el segundo fitopatógeno más importante en el mundo (Dean *et al.*, 2012). El moho gris es difícil de controlar debido a la amplia variedad de huéspedes que posee, tiene diferentes formas de propagación y ataque, es capaz de reproducirse de forma asexual o sexual según la adversidad del ambiente y posee gran plasticidad genómica (Hua *et al.*, 2018), permitiéndole desarrollar resistencia a fungicidas sintéticos que además no son seguros para el ser humano ni el medio ambiente (Droby *et al.*, 2009).

En el Ecuador, se sabe que *B. cinerea* está presente en los cultivos frutales y flores (Abata *et al.*, 2016), e incluso se han evaluado estrategias de retención y eliminación del patógeno en mora de castilla, los marcadores moleculares utilizados por excelencia para la identificación de esta especie son los genes ITS, RPB2, G3PDH y HSP60, elegidos por que evolucionan a tasas moderadas, son de copias únicas y codifican a proteínas nucleares (Staats *et al.*, 2005). En Ecuador aún no se ha realizado la identificación molecular del patógeno (Acosta *et al.*, 2020), por lo que constituye un aporte a la ciencia en Ecuador.

Capítulo III: Metodología

Recolección de muestras

Se realizaron muestreos de caso en la parroquia Huachi Grande, Tungurahua en 3 huertos de productores de mora (1°19'11.6"S 78°38'44.6"W; 1°19'32.0"S

78°39'15.9"W; 1°19'18.9"S 78°39'10.2"W), los huertos considerados para el muestreo fueron escogidos según los siguientes parámetros:

- Distancia entre plantas menor a un metro.
- Presencia de frutos en estados maduros.
- Disponibilidad y apertura del agricultor.

Durante el muestreo se buscaron frutos con síntomas de la enfermedad como lesiones blandas marrones o síntomas como presencia de esporas en una sección de la baya como se muestra en la Figura 1. Las muestras se ubicaron en tarrinas plásticas previamente desinfectadas, se taparon y transportaron.

Figura 1

Bayas recolectadas en el muestreo de caso



Nota. (A) Baya con sintomatología, zonas blandas de color marrón. (B) Baya con signos, lesiones blancas-grises (esporas).

Al ser un hongo de rápido crecimiento, el fruto se vuelve completamente gris (micelio) máximo en 48 horas después de la recolección (Figura 2).

Figura 2

Comparación del estado de infección de la baya al momento de la toma de muestra y 24 h después



Nota. (A) Baya al momento de la cosecha. (B) Baya 24 h después de la cosecha.

Aislamiento y crecimiento de los microorganismos asociados a la enfermedad

Siembra

Las muestras se procesaron 24 – 48 horas después de la toma de la muestra, el aislamiento se realizó en medio PDA + 0,25 g/L de ampicilina en cajas Petri y se realizó de dos formas.

Solución de esporas.

En un tubo se colocó 20 mL de agua destilada estéril + 0,25 uL/mL de Tween 80, usando un bisturí estéril se raspó la superficie de la fruta sin llegar a tocarla y se añadió en la solución preparada previamente. Se tomaron 100 mL de la solución de esporas y se colocaron en el medio de cultivo distribuyendo la solución con un asa de Digrafsky.

Dejar caer esporas.

Con una pinza se tomaron los frutos esporulados y suavemente se agitaron para dejar caer las esporas en el medio de cultivo por gravedad.

Aislamiento de espora única

Las cajas se incubaron a 30°C por 4 días, se aislaron las esporas germinadas y se seleccionaron solo aquellas que exhibían un micelio de color blanco.

Identificación morfológica

Identificación macroscópica

Se comparó la forma de crecimiento y coloración del micelio del hongo con el reportado en bibliografía (Martínez et al., 2003; Tanovic et al., 2009; Tanovic et al., 2014) además de los días de esporulación, formación, número, forma y color de esclerocios.

Identificación microscópica

Se realizó una tinción del micelio utilizando una cinta adhesiva transparente, esta se pegó a la superficie del hongo, y se colocó sobre una placa porta objetos con una gota de azul de lactofenol. La muestra se visualizó en un microscopio óptico usando el objetivo 40X y se comparó con la Guía ilustrada de Hongos Imperfectos (Barnett & Hunter, 1998). Los conidios fueron medidos usando el programa Imagefocusalpha, se tomaron 10 mediciones a lo largo y a lo ancho para sacar un promedio y conocer sus dimensiones.

Identificación molecular

Extracción de ADN

La extracción de ADN fue basada en el protocolo propuesto por (Berrendero et al., 2008). Con un bisturí estéril se raspó la superficie de la caja Petri para sacar el micelio, este se colocó en un microtubo con 3 perlas de viridio estéril, se añadió 500 µL de buffer de extracción (2,5% p/v CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl pH 8 y 2 µL de β-mercaptoetanol), el tubo se agitó y maceró de forma vigorosa usando un vortex por 5 min, dos veces o hasta que el tejido quede pulverizado y se incubó en un baño María a 60 °C por 30 min, a continuación se añadió cloroformo congelado y se

dejó reposar unos minutos, se centrifugó a 14 500 g por 10 min. Después se recuperó 400 µL del sobrenadante cuidando no mezclar las fases y se colocó en un nuevo tubo estéril de 1,5 mL con un volumen igual de etanol absoluto frío, 150 µL de acetato de sodio 3 M y 300 µL de etanol 70% filtrado, esta mezcla se dejó precipitar toda la noche a -20 °C. Al día siguiente se centrifugó a 14 500 g por 17 min y se eliminó el sobrenadante, se realizó 2 lavados con 200 µL de etanol 70% que se descartaron por inversión. Finalmente se dejó secar el pellet de ADN por 20 min en una cámara de flujo laminar, se resuspendió con 25 µL de agua DEPC se añadió 1 µL de RNAsa para incubar durante 30 min a 37°C. El ADN se cuantificó usando un Nanodrop y se almacenó a -20°C.

Amplificación de marcadores moleculares

Para identificar el hongo que causa la enfermedad del moho gris se amplificó la región del espaciador transcrito interno ribosómico nuclear (ITS) usando los primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990) que se usaron para identificar el género al que pertenece el hongo, mientras que para la identificación de la especie se utilizaron las secuencias de la subunidad II de la ARN polimerasa dependiente de ADN (RPB2), el gen que codifica a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y la proteína de shock térmico 60 (HSP60); las secuencias de estos primers fueron obtenidos de Staats et al. (2005).

En la programación del termociclador para la amplificación de los fragmentos se utilizaron 35 ciclos, las temperaturas se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1

Programación del termociclador para la amplificación de fragmentos de interés

Gen	Calentamiento inicial		Desnaturalización		Annealing		Extensión		Extensión final	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
ITS	94	3:00	94	0:30	55	0:30	72	0:50	72	5:00
RPB2	94	3:00	94	0:30	50.5	0:45	72	1:20	72	7:00
G3PDH	94	3:00	94	0:30	65	0:35	72	0:45	72	4:00
HSP60	94	3:00	94	0:30	62	0:35	72	0:45	72	4:00

Nota. Basado en User Guide: 2X PCR Taq Master Mix with Dye. Applied Biological Materials Inc., 2019

Secuenciación de amplicones

Los fragmentos obtenidos durante las PCR se enviaron a Macrogen Inc., Korea para ser secuenciados con el método Sanger. Las secuencias se limpiaron para eliminar los segmentos de mala calidad, finalmente la secuencia forward y el reverso complemento de la secuencia reverse se alinearon para obtener una secuencia consenso.

Identificación de secuencias

Las secuencias consenso fueron usadas para determinar la especie y el género de las colonias aisladas a través de la búsqueda de homólogos usando el programa en línea Blast de NCBI.

Filogenia del agente causal

Se realizó un análisis filogenético multigen (ITS, RPB2, G3PDH y HSP60) de máxima verosimilitud, se recopilaron 16 secuencias de referencia de varias especies de *Botrytis* y dos secuencias outgroup, cuyas accesiones, cepas y lugar de aislamiento se

detallan en la Tabla 2. Las secuencias se alinearon usando el algoritmo ClustalW en Mega X, los alineamientos se limpiaron usando el servidor en línea Gblocks (Castresana, 2000) y se concatenaron usando el programa Sequence Matrix (Vaidya et al., 2011). Finalmente se utilizó el software RAXML (Stamatakis, 2014) en CIPRES Science Gateway para el análisis de máxima verosimilitud (Miller et al., 2010).

Tabla 2

Número de accesoión de las secuencias utilizadas para la construcción del árbol filogenético.

N°	Especie	Cepa	Hospedador	País de aislamiento	Número de accesoión del gen			
					ITS	RPB2	G3PDH	HPS60
1	<i>Botrytis cinerea</i>	LCHM	<i>Cardamine hupingshanensis</i>	China	MN448502.1	MN448501.1	MN448500.1	MN433708 .1
2	<i>Botrytis cinerea</i>	RGM_25 65	Granada	Chile	MK934584.1	---	---	---
3	<i>Botrytis cinerea</i>	BP3	Mora	México	MG838558.1	---	---	---
4	<i>Botrytis cinerea</i>	805	Fresa	USA	---	MK919495.1	MK919496.1	MK919494 .1
5	<i>Botrytis cinerea</i>	Bc-410	Uva	Australia	---	MH732874.1	MH732864.1	MH732869 .1
6	<i>Botrytis cinerea</i>	MS05	Peonia	USA	---	KX266744.1	KX266732.1	KX266738. 1
7	<i>Botrytis cinerea</i>	20-295	Fresa	USA	---	MZ288751.1	MZ288754.1	MZ288748 .1
8	<i>Botrytis cinerea</i>	SAS56	---	Italia	AJ716294	AJ745677	AJ705006	AJ716067
9	<i>Botrytis cinerea</i>	MUCL87	---	Países Bajos	---	AJ745676	AJ705004	AJ716065
10	<i>Botrytis cinerea</i>	B0510	---	Alemania	AM235297.1	AJ745674.1	AJ705002.1	AJ716063. 1

11	<i>Botrytis fabae</i>	CBS109. 57	---	Países Bajos	AJ716303	AJ745685	AJ705013	AJ716074
12	<i>Botrytis fabae</i>	MUCL98	---	España	---	AJ745686	AJ705014	AJ716075
13	<i>Botrytis pseudocinerea</i>	10091	Uva	China	JN692379.1	JN692428.1	JN692414.1	JN692400. 1
14	<i>Botrytis pseudocinerea</i>	HBtom- 116	Tomate	China	---	KJ534272.1	KJ534270.1	KJ534271. 1
15	<i>Botrytis calthae</i>	CBS 175.63	---	USA	AJ716302	AJ745671	AJ704999	AJ716060
16	<i>Monilinia fructigena</i>	9201	---	Holanda	---	AJ745715	AJ705043	AJ716047
17	<i>Esclerotinia esclerotiorum</i>	484	---	Holanda	---	AJ745716	AJ705044	AJ716048

Postulados de Koch

Preparación del material vegetal

Frutas de mora de castilla maduras fueron obtenidas de un mercado local en la ciudad de Quito, la superficie de 14 bayas se esterilizó usando alcohol al 70% por 10 min para luego pasar a una solución de cloro al 2% por 10 min (Li et al., 2012), se enjuagaron con agua estéril y se secaron en una cámara de flujo laminar.

Inoculación

Inoculación usando conidios.

Se siguió el procedimiento propuesto por Erper et al. (2015), se usó un cultivo de 20 días de edad, los conidios se cosecharon usando un asa estéril, y fueron suspendidos en agua destilada estéril con 3% de Tween 80. Se ajustó la concentración a 1×10^5 conidios/mL y se colocaron 50 μ L usando gotitas de la solución por toda la superficie de la baya. Las moras fueron incubadas en cámaras húmedas hechas de recipientes plásticos transparentes a temperatura ambiente por 7 días con ciclos de 12 h de luz-oscuridad. Cada fruta fue inspeccionada periódicamente para asegurar que no haya otra fuente de patogenicidad. Se realizó una tinción con lactofenol y visualización en microscopio óptico de los conidios y conidióforos a los 4 días.

Capítulo IV: Resultados

Identificación morfológica

Identificación macroscópica

Las esporas aisladas por los métodos mencionados fueron observables a los 3 días después de la siembra, se reconocieron micelios de 3mm de diámetro de color blanco, los cuales fueron transferidos a cajas Petri con PDA, se obtuvieron un total de 8 aislados provenientes de diferentes esporas cuyo origen se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3

Origen de los aislados fúngicos y códigos asignados

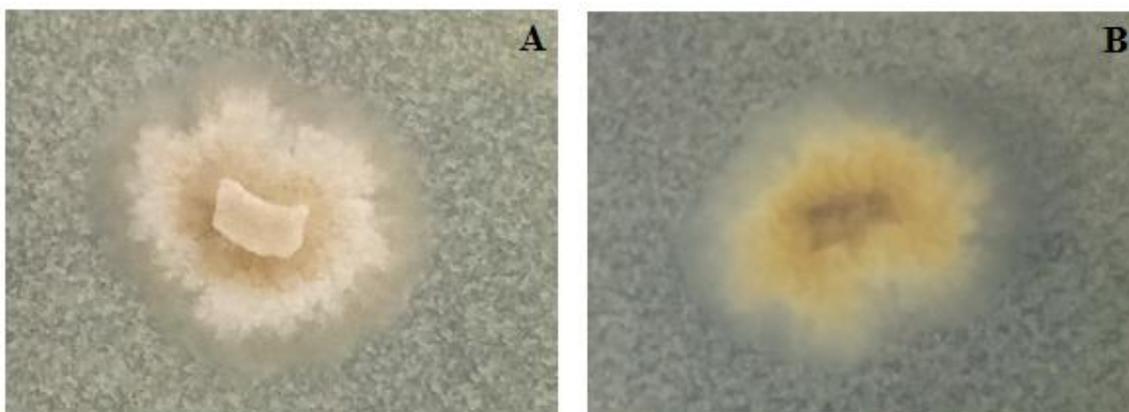
Sitio de muestreo	Coordenadas geográficas	Código
1	1°19'11.6"S 78°38'44.6"W	1SE.1
1		1SE.2
1		1SE.3
2	1°19'32.0"S 78°39'15.9"W	2PA.1
2		2PA.2
2		2PA.3
3	1°19'18.9"S 78°39'10.2"W	3PA.1
3		3PA.2

Aislados de los sitios de muestreo 1 y 2.

A los 4 días de incubación los aislados de los sitios 1 y 2 tuvieron fenotipos similares, el hongo presentó un diámetro de 2 cm con un color blanco en la superficie y un ligero toque marrón en las orillas de la sección de gel (Figura 3A), presentó bordes irregulares y textura granulada-arrugada que en su revés se aprecia mejor en color café (Figura 3B).

Figura 3

Morfología de los aislados de los sitios de muestreo 1 y 2

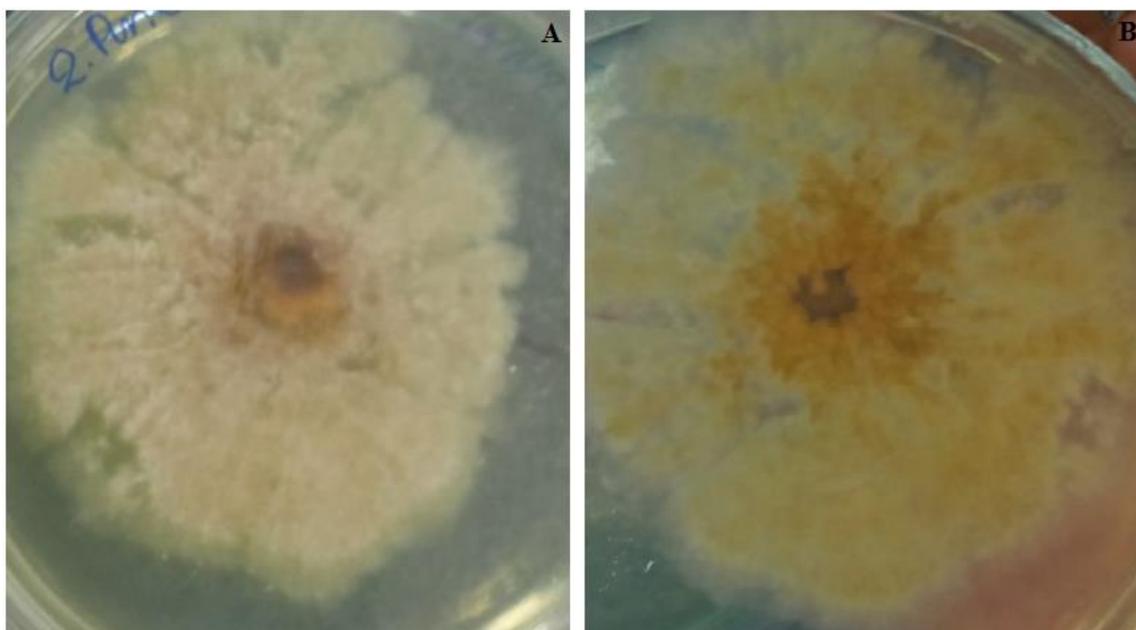


Nota. (A) Morfología del micelio en la superficie. (B) Morfología del micelio en el revés

A los 8, 15 y 20 días de incubación los diámetros de colonia fueron de 3 – 3,5 cm; 5,5 cm y 6,5 – 7,5 cm respectivamente y sus fenotipos fueron similares, las colonias se visualizaron de color café claro de apariencia polvorosa y con bordes irregulares (Figura 4).

Figura 4

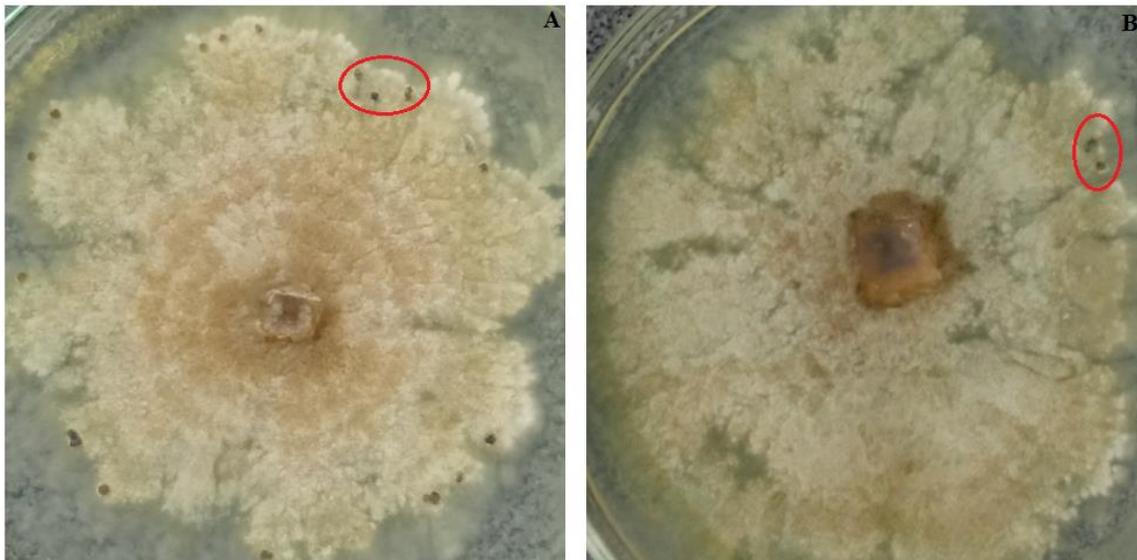
Muestra 2.PA.1 a los 15 días de incubación



Para estimular la formación de conidióforos y conidios las placas de 13 días de edad fueron expuestas a ciclos de luz y oscuridad de 12 h a temperatura ambiente (máxima de 20 °C y mínima de 9 °C), después de 7 días se observó la aparición de esclerocios, 19 en la muestra 1SE.1 y 2 en la muestra 2PA.1 (Figura 5). La esporulación de las muestras comenzó a los 20 días de incubación y se identificó como un “polvo blanco” recubriendo el micelio superficial.

Figura 5

Esclerocios en las muestras 1SE.2 y 2PA.2



Los esclerocios se visualizaron como estructuras redondas de superficie irregular y de color negro de aproximadamente 2 mm de diámetro como se muestra en la Figura 6. La distribución de los esclerocios fue aleatoria en forma de círculo y en borde de la placa Petri.

Figura 6

Esclerocios visualizados en un estereomicroscópio



Aislados del sitio de muestreo 3.

Los aislados del sitio de muestreo 3 se visualizaron ligeramente diferentes a los micelios de los sitios de muestreo 1 y 2, pues si bien inició su crecimiento con micelio de color blanco, a los 8 días de incubación la colonia presentó una forma circular de borde blanco, mientras que el micelio del centro fue de color gris con un diámetro de 3,5 cm (Figura 7A), sin embargo, a medida de que el hongo creció su coloración cambió, como se observa en la Figura 7B a los 20 días de incubación el micelio de la colonia fue de color café en los bordes, mientras que en el centro el micelio fue gris. La parte posterior de la colonia se observa muy similar a aquellas aisladas del sitio de muestreo 1 y 2, con bordes blancos, el centro café claro y de textura rugosa. No se formaron esclerocios.

De forma análoga para inducir la formación de conidióforos y conidios la placa de 13 días de edad fue expuesta a ciclos de luz y oscuridad de 12 h a temperatura ambiente (máxima de 20 °C y mínima de 9 °C), 7 días después el hongo esporuló.

Figura 7

Aislado 3PA.1



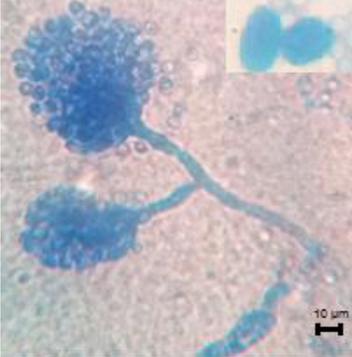
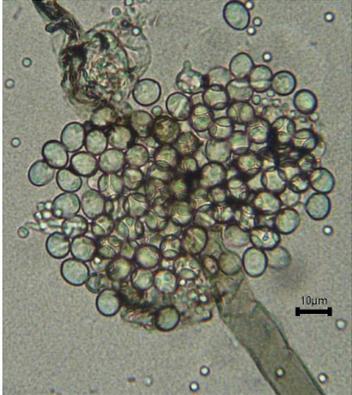
Nota. (A) Colonia a los 8 días de incubación. (B) Colonia a los 20 días de incubación.

Identificación microscópica

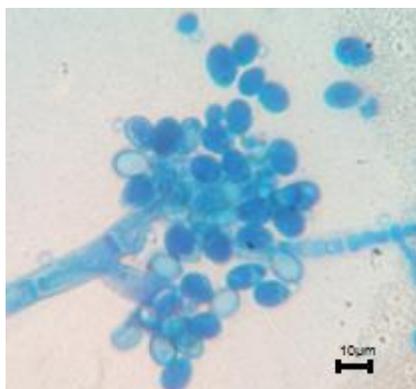
Cuando los aislados esporularon se realizaron 5 tinciones, las descripciones microscópicas se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4

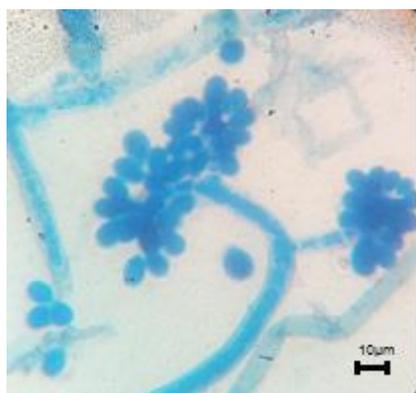
Descripción microscópica de los aislados

Muestra	Imagen	Descripción
1SE.1		<p>Hifas segmentadas, conidióforos con ramas irregulares en la porción superior.</p>
1SE.2		<p>Los conidios se agrupan en racimos, tienen forma redonda y pequeños. Sin embargo en ambas muestras se encontraron conidios ovoides de mayor tamaño.</p>
2PA.1		<p>Hifas segmentadas, conidióforos con ramas irregulares. Los conidios se agrupan en racimos, tienen forma ovoide. Sin embargo en ambas muestras se encontraron conidios redondeados de menor tamaño.</p>

2PA.2



3PA.1



Hifas segmentadas, conidióforos altos con ramas irregulares en la porción superior. Los conidios se agrupan en racimos y tienen una forma ovoide.

Los conidióforos ovoides se midieron en un microscopio óptico usando el programa Imagefocusalpha donde se obtuvieron las medidas a lo largo y ancho de las esporas (Tabla 5) de 3 colonias diferentes.

Tabla 5

Promedios y rangos del tamaño de los conidióforos de los aislados

Muestra	Ancho (μm)		Largo (μm)	
	Promedio	Rango	Promedio	Rango
1SE.2	$8,74 \pm 0,73$	7,86 - 10,3	$10,4 \pm 0,81$	9,5 - 12,13
2PA.2	$7,45 \pm 0,46$	6,63 - 8,05	$9,15 \pm 0,86$	7,57 - 10,01
3PA.1	$7,34 \pm 0,34$	6,55 - 7,72	$8,6 \pm 0,41$	8,14 - 9,28

Para las muestras 1SE.1 y 3PA.1 se enviaron a secuenciar los marcadores ITS y RPB2, mientras que para la muestra 3PA.2 se secuenciaron los 4 marcadores moleculares: ITS, RPB2, G3PDH y HSP60. Todas las muestras fueron identificadas como *Botrytis cinerea* con todos los marcadores moleculares (Tabla 6).

Tabla 6

Resultados de la secuenciación y búsqueda de homólogos

Muestra	Marcador	Especie	Query cover	Ident	Número de accesión del homólogo
1SE.1		<i>Botrytis cinerea</i>	100%	100%	MT573470.1
3PA.1	ITS	<i>Botrytis cinerea</i>	97%	97.91%	MT573470.1
3PA.2		<i>Botrytis cinerea</i>	100%	98.87%	MT573470.1
1SE.1		<i>Botrytis cinerea</i>	100%	99.82%	MN448501.1
3PA.1	RPB2	<i>Botrytis cinerea</i>	100%	99.36%	MT604255.1
3PA.2		<i>Botrytis cinerea</i>	100%	100%	MT604255.1
3PA.2	G3PDH	<i>Botrytis cinerea</i>	100%	100%	MN448500.1
3PA.2	HSP60	<i>Botrytis cinerea</i>	95%	97.38%	MK791187.1

Análisis filogenético

En la Figura 9 se muestra el árbol de máxima verosimilitud obtenido con RAXML, donde se observa que los aislados 1SE.1, 3PA.1 y 3PA.2 se encuentran dentro del

clado de *Botrytis cinerea*, sin embargo los aislados del sitio de muestreo 3 se encuentran alejados de la muestra 1SE.1 y forman un propio clado (Figura 10). Además el aislado 1SE.1 se encuentra más relacionado con la cepa australiana, mientras que los aislados del punto 3 se encuentran más relacionados con las cepas estadounidenses.

Figura 9

Árbol de máxima verosimilitud obtenido en RAxML

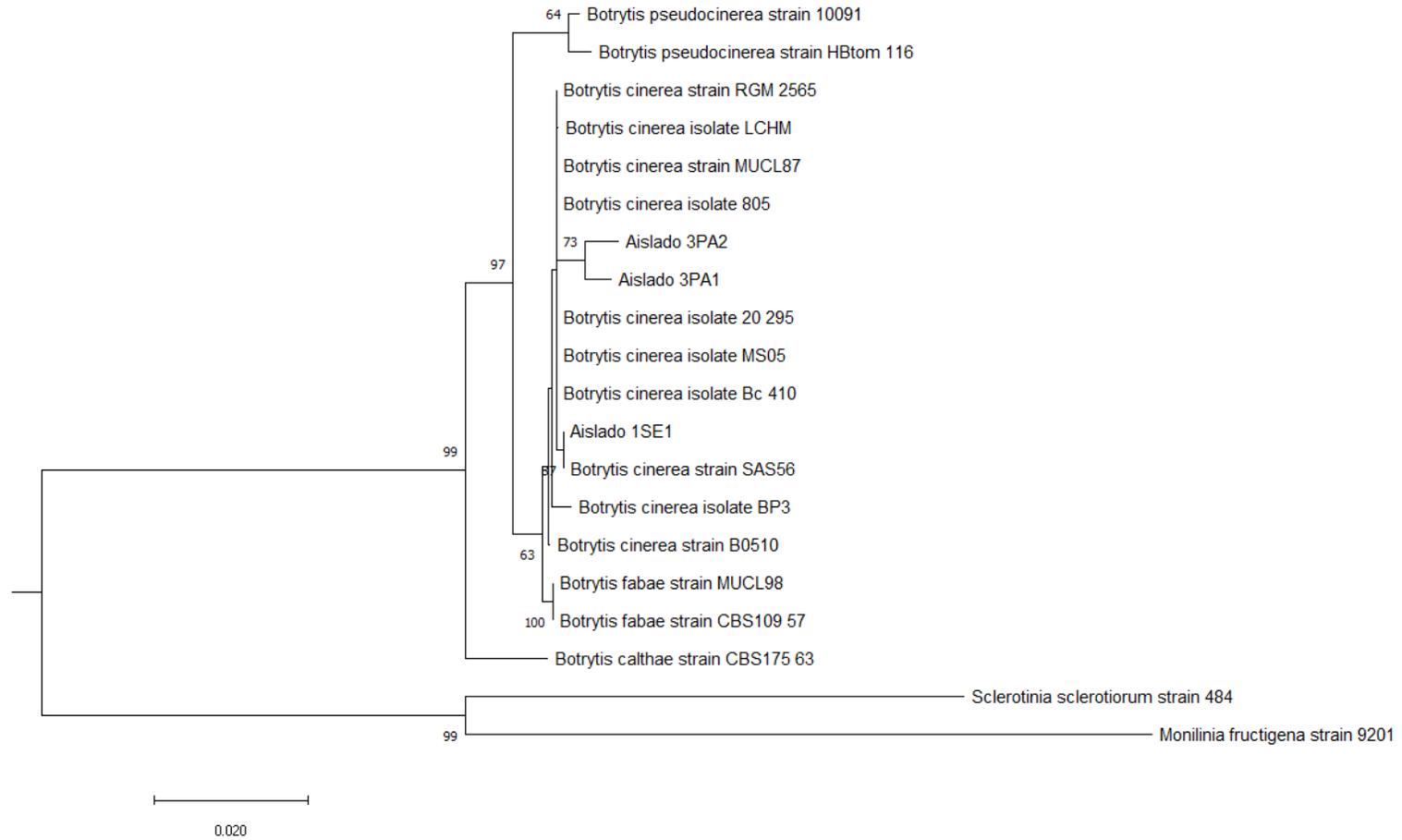
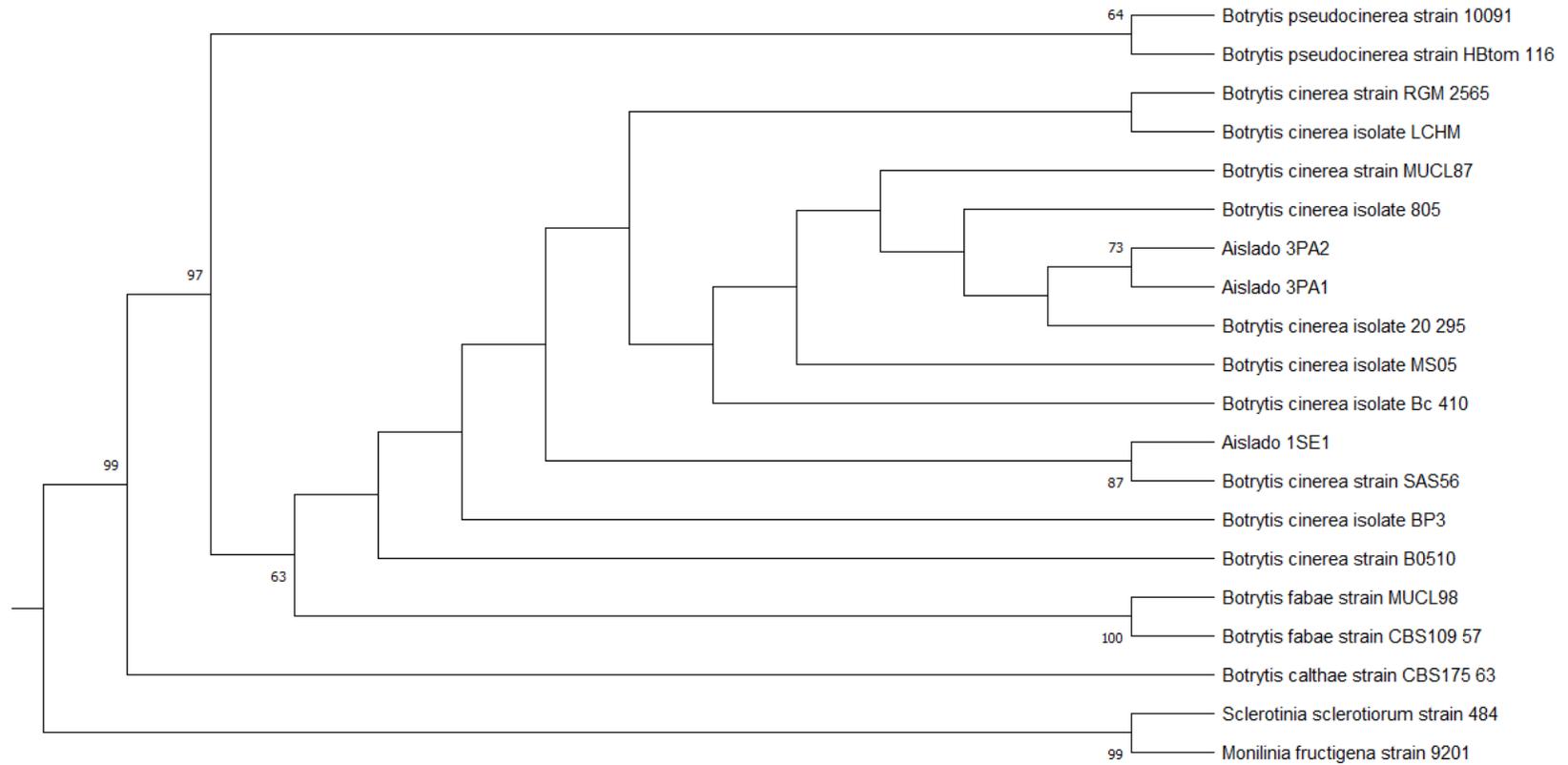


Figura 10

Cladograma de las especies de *Botrytis* utilizadas en la filogenia de los aislados



Postulados de Koch

La fruta inoculada presentó lesiones marrones a los 2 días de incubación (Figura 11B), los signos de la enfermedad aparecieron a los 4 días de incubación (Figura 11C), se visualizó micelio de color blanco, mismo que a los 6 días de incubación se visualizó de color gris (Figura 11D).

Figura 11

Progresión de la enfermedad en frutos de mora de castilla

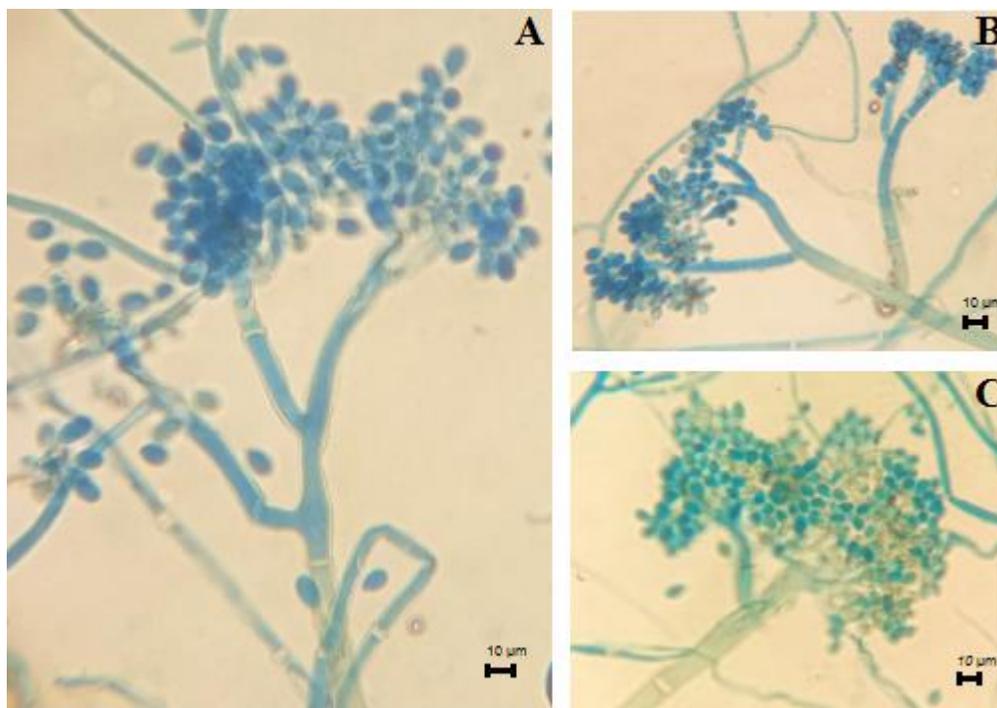


Nota. (A) Fruto al momento de la inoculación. (B) Fruto a los 2 días de la inoculación. (C) Fruto a los 4 días de la inoculación. (D) Fruto a los 6 días de la inoculación

A nivel microscópico, se observó únicamente hifas a los 4 días de incubación (Figura 12A), mientras que los conidióforos y conidios se reflejaron en el día 6, se observaron hifas segmentadas, conidióforos altos con ramas irregulares, además los conidios se agrupan en racimos y tienen forma ovoide (Figura 12A, 12B y 12C).

Figura 12

Conidióforos y conidios observados en la fruta inoculada con esporas de los aislados.



Nota. Fruta inoculada con la muestra (A) 1SE.2 (B) 2PA.2 y (C) 3PA.2

Capítulo IV: Discusión

En este estudio se identificó el género y la especie de las colonias aisladas de fruta con signos de la enfermedad de la pudrición del fruto o moho gris provenientes de huertos productores de mora de castilla en la parroquia Huachi Grande, Ambato. Se identificaron dos tipos de fenotipos en los sitios de aislamiento 1-2 y 3.

Las colonias aisladas de los sitios de aislamiento 1 y 2 presentaron un fenotipo de color café claro de apariencia polvorosa y micelio superficial, con bordes irregulares, además de esclerocios de color negro, redondos y de superficie irregular, mientras que los aislados del sitio 3 se visualizaron de color café en los bordes y el centro de color gris con micelio aéreo de apariencia algodonosa. En la investigación realizada por Terrones et al. (2019) las colonias de *Botrytis cinerea* aisladas de frutos de mora presentaron un fenotipo de color gris claro y oscuro con micelios tanto superficiales como aéreos que presentaron esclerocios redondeados de color negro. En los reportes

de Tanovic et al. (2009; 2014) los aislados fueron incubados a 20°C cuyo crecimiento inicial fue de color blanco y de micelio uniforme aéreo, a medida que el aislado creció se observaron fenotipos diferentes, con micelios grises, negros y blancos que pueden o no formar esclerocios de color negro. El contraste entre las características fenotípicas de los aislados reportados en bibliografía y los encontrados en este estudio puede ser justificado por la plasticidad del fenotipo de los hongos, es decir, su capacidad de cambiar el patrón de crecimiento en función de los diferentes estímulos ambientales (Rayner & Coates, 1987), se ha demostrado que varios hongos ascomicetos pueden variar sus fenotipos en función de la temperatura, el ciclo de luz, tipo de sustrato, tipo de fuente de carbono utilizada en el medio, y el porcentaje de humedad (Slepecky & Starmer, 2009; Allison et al., 2018; Cross & Kenerley, 2004; Alster et al., 2021; Kronholm et al., 2016), estos rasgos pueden utilizarse para evaluar el potencial de colonización saprófita de la cepa (Martinez et al., 2003); en cuanto al fenotipo microscópico, todos los aislados presentaron hifas segmentadas, conidióforos de ramas irregulares, conidios agrupados en racimos y en forma ovoide, esta descripción coincide con la presentada en investigaciones previas, las cuales resaltan los conidios unicelulares ovoides en racimos de uvas con dimensiones de 4 a 8 μm de ancho y de 6 a 13 μm de largo tanto en aislados de fruta (Isaza et al., 2019; Li et al., 2012; Pei et al., 2019), flores (Ferrada et al., 2016) y en general es atribuida a la morfología microscópica propia de las especies que pertenecen al género *Botrytis* (Barnett & Hunter, 1998; Mirzaei et al., 2008). Sin embargo en los aislados de micelio superficial también se encontraron conidios redondeados de menor tamaño, cabe recalcar que en este estudio la temperatura de incubación fue de 30°C, Martinez et al. (2003) especifica que *B. cinerea* presenta un crecimiento favorable en un rango de 15-25 °C y que a temperaturas superiores a este rango su tasa de crecimiento se puede ver afectada, así como las características fenotípicas del mismo.

Para la identificación molecular de las colonias aisladas se amplificaron 4 marcadores moleculares, la región del espaciador transcrito interno ribosómico nuclear (ITS), la subunidad II de la ARN polimerasa dependiente de ADN (RPB2), el gen que codifica a gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) y la proteína de shock térmico 60 (HSP60); la secuencia ITS es mundialmente utilizada para la identificación genética del género de los hongos y sus relaciones filogenéticas (White et al., 1990), mientras que los genes RPB2, G3PDH y HSP60 se utilizan para clasificar a las especies pertenecientes al género de *Botrytis* puesto que codifican a proteínas nucleares de una sola copia que evolucionan a tasas moderadas (Staats et al., 2005), la secuencia RPB2 corresponde a la segunda subunidad de la enzima que transcribe el pre-ARN, es decir, cataliza la elongación (Liu et al., 1999), el gen G3PDH es una enzima involucrada en el metabolismo básico de carbohidratos (Berbee et al., 1999), finalmente la proteína HSP60 está involucrada en la protección del hongo ante el aumento abrupto de la temperatura ambiental, este gen se utiliza para la construcción filogénica tanto de hongos como bacterias (Thomas et al., 1997).

Todas las secuencias fueron identificadas como *Botrytis cinerea* con un porcentaje de identidad desde el 97,38 al 100 %, la longitud de los genes fue de 448, 990, 881 y 1000 pares de bases para los marcadores ITS, RPB2, G3PDH y HSP60 respectivamente, longitudes aproximadas a las reportadas por Notte et al. (2021).

Si bien los aislados 1-2 y 3 fueron incubados bajo las mismas condiciones, presentan diferencias tanto en color como en la forma de crecimiento del micelio (aéreo o superficial) y presencia o no de esclerocios, esto se debe a que probablemente se aislaron dos subpoblaciones diferentes de *B. cinerea*, los estudios tempranos a nivel genético fueron presentados por Giraud et al. (1997; 1999) en los cuales se clasifica a este hongo en dos grupos (I y II) y además se demuestra la existencia de subpoblaciones del mismo.

La extraordinaria capacidad de variabilidad y adaptabilidad genotípica y fenotípica entre las subpoblaciones de *B. cinerea* se debe principalmente a la presencia de elementos transponibles, el transposón *Flipper* y el retrotransposón *Boty*, los cuales tienen influencia en la virulencia y resistencia del hongo frente a los fungicidas (Martinez et al., 2005; Martinez et al., 2003). Es así que las subpoblaciones han sido divididas en 4: *tranposa* la cual contiene ambos elementos transponibles, *vacuma* que no contiene ninguno, *Boty* y *Flipper* los cuales cuentan solo con uno de los elementos respectivamente (Milicevic et al., 2006).

Sin embargo, debido a la alta variabilidad genética todos los aislados fue necesario caracterizar a un nivel más profundo usando microsatélites (Fournier et al., 2002), a partir de esta implementación, ahora se sabe que los grupos en realidad son especies crípticas (morfología similar) y que el grupo I en realidad es la especie *Botrytis pseudocinerea* (Walker et al., 2011). Entonces, para re-confirmar que los aislados obtenidos en esta investigación pertenecieran exclusivamente al grupo II tal como reveló la búsqueda de homólogos en la herramienta Blast y confirmar la hipótesis de que probablemente se aislaron dos subpoblaciones de *B. cinerea*, se realizó un análisis filogenético multigen utilizando los 4 marcadores y comparándolas con aislados de varios países.

En primer lugar se encontró que las muestras aisladas del sitio N°3 formaron un solo clado alejado de la muestra del sitio N°1 esta agrupación de las muestras del sitio N°3 nos indican que efectivamente existen ciertas diferencias genéticas entre los aislados, además todas las muestras se agruparon dentro del clado de *Botrytis cinerea*, lo que confirma que las diferencias encontradas entre los aislados no se deben a que pertenezcan a especies distintas de *Botrytis*. Isaza et al. (2019) identificó dos subpoblaciones de *B. cinerea* aislados de mora de castilla en Colombia, en los cuales el genotipo *transposa* tuvo un crecimiento erupcionado sin presencia de esclerocios,

mientras que el genotipo Boty presentó un crecimiento micelial erupcionado pero con la presencia de esclerocios grandes y distribuidos aleatoriamente, los investigadores resaltan que las características fenotípicas no tienen una relación directa con las diferentes subpoblaciones del hongo, sin embargo, puede servir como pauta para investigar sobre la presencia de elementos transponibles en los diferentes aislados. La identificación de subpoblaciones resulta esencial para conocer la capacidad de virulencia del hongo; Weiberg et al. (2013) descubrieron que *B. cinerea* puede liberar pequeños ARN derivados de retrotransposones que pueden suprimir la expresión de genes de defensa en las células del huésped.

Cabe destacar que el árbol filogenético fue construido únicamente con 4 marcadores moleculares, de los cuales 2 fueron utilizados para identificar las muestras 1SE.1 y 3PA.1 mientras que para la muestra 3PA.2 se utilizó los 4 marcadores. Los genes clásicos para la diferenciación de especies del género *Botrytis* son bastante similares entre sí (Staats et al., 2005), por lo que Plesken et al. (2021) establecieron un esquema confiable para la secuenciación multilocus para las especies de este género utilizando 10 genes, los cuales fueron elegidos por tener una mayor diversidad e información de secuencia que los clásicos y estos son: transportador de feromonas ATP, glucósido hidrolasa, aminoácido aromático descarboxilasa, subunidad B de la DNA polimerasa, Proteasa, Palmitoil proteína tioesterasa, 2OG-Fe(II) oxigenasa, RNA helicasa dependiente de ATP, Proteína inductora de necrosis 2 y la proteína de degradación de fusión de ubiquitina; estas secuencias son de utilidad debido a que contienen indels de varios tamaños que por encontrarse fuera de los exones tienen una gran estabilidad, por lo que permite una diferenciación más robusta de las especies.

Los tres aislamientos representativos 1SE.1, 2PA.1, 3PA.2 fueron inoculados en frutos maduros de mora de castilla y todos causaron la enfermedad del moho gris, los síntomas de la enfermedad aparecieron a los 2 días de incubación, mientras que los

signos a los 4 días. Los tiempos de expresión de la enfermedad coinciden con los reportados por Terrones et al. (2019) en moras de México, el diámetro de lesión incrementa si se realizó una herida previo a la inoculación, esto facilita el proceso de infección dado que el hongo secreta enzimas con la capacidad que eliminar la pared celular, toxinas y compuestos de bajo peso molecular que le permiten colonizar al huésped (Steentjes et al., 2021; Williamson et al., 2007); si bien en la inoculación de esta investigación no se realizó heridas a la fruta, la solución de esporas se ubicó en la unión del sépalo con el receptáculo y entre las drupeletas para que las esporas puedan germinar con mayor rapidez.

Capítulo V: Conclusiones

- Se identificaron dos fenotipos macroscópicos diferentes en los aislados obtenidos, uno de color café claro con crecimiento superficial del micelio y la presencia de esclerocios y otro de color café en los bordes y gris en el centro con crecimiento aéreo del micelio y ausencia de esclerocios.
- La identificación microscópica de los aislados reveló hifas segmentadas, conidióforos de ramas irregulares y conidios ovoides agrupados en racimos.
- La amplificación y secuenciación de los genes ITS, RPB2, G3PDH y HSP60 mostraron del 97 al 100% de identidad con secuencias identificadas previamente como *Botrytis cinerea* en la búsqueda de homólogos.

- Se obtuvieron 3 aislados de *Botrytis cinerea* provenientes de 3 sitios de muestreo diferentes en la parroquia Huachi Grande en Ambato, Ecuador.
- La agrupación de los resultados tanto morfológicos, y filogenéticos sugieren que probablemente se han aislado dos subpoblaciones diferentes de *B. cinerea*.

Capítulo VI: Recomendaciones

- Se recomienda realizar un estudio con microsatélites para identificar la presencia de elementos transponibles en estos aislados con la finalidad de conocer su nivel de patogenicidad y resistencia a fungicidas.
- Se recomienda realizar la filogenia usando genes de mayor diversidad y variabilidad genética para establecer una filogenia más robusta de los aislados.

Capítulo VII: Referencias

Abata, L., Izquierdo, A., Viera, W., & Flores, F. (2016, Agosto 4). First report of Botrytis rot caused by *Botrytis cinerea* on peach in Ecuador. *Journal of Plant Pathology*, 98(3), 690-697. <https://doi.org/10.4454/jpp.v98i3.3766>

- Acosta, M., Viera, W., Jackson, T., & Vasquez, W. (2020). Alternativas tecnológicas para el control de *Botrytis* sp. en mora de castilla (*Rubus glaucus*). *Enfoque UTE*, 11(2), 13-23. <https://doi.org/10.29019/enfoque.v11n2.521>
- Allison, S., Romero, A., Lu, L., Taylor, J., & Treseder, K. (2018). Temperature acclimation and adaptation of enzyme physiology in *Neurospora discreta*. *Fungal Ecology*, 35, 78-86. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.07.005>
- Almache, N. (2017). *Caracterización morfológica y físico-química de frutos de 7 ecotipos de mora (Rubus glaucus Benth), bajo dos densidades de siembra en Tumbaco*. Quito: Universidad Central del Ecuador.
- Alster, C., Allison, S., Johnson, N., Glassman, S., & Treseder, K. (2021). Phenotypic plasticity of fungal traits in response to moisture and temperature. *ISME COMMUN*, 1(43). <https://doi.org/10.1038/s43705-021-00045-9>
- Barnett, H., & Hunter, B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Burgess Pub.Co.
- Barrera, V., Alwang, J., Andrango, G., Domínguez, J., Escudero, L., Martínez, A., Jácome, R., & Arévalo, J. (2017). *La cadena de valor de la mora y sus impactos en la Región Andina del Ecuador*. INIAP. Boletín Técnico n.º 171.
- Bejarano. (1992). *Manual de Mora (Rubus Glaucus Benth)*. Quito: Promoción de exportaciones agrícolas no tradicionales (PROEXANT).
- Berbee, M., Pirseyedi, M., & Hubbard, S. (1999). Cochliobolus Phylogenetics and the Origin of Known, Highly Virulent Pathogens, Inferred from ITS and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Sequences. *Mycologia*, 91(6), 964-977. <https://doi.org/10.2307/3761627>
- 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). <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65273-0>

- Brandhoff, B., Simon, A., Dornieden, A., & Schumacher, J. (2017). Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light-responsive transcriptional regulators BcLTF3 and BcREG1. *Curr Genet*, 63(5), 931-949.
<https://doi.org/10.1007/s00294-017-0692-9>
- Carillo, E., Aller, A., Cruz, S., & Alvarez, J. (2015). Andean berries from Ecuador: A review on Botany, Agronomy, Chemistry and Health Potential. *Journal of Berry Research*, 5(2), 49-69. <https://doi.org/10.3233/JBR-140093>
- Castresana, J. (2000). Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(4), 540-552.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
- Cross, D., & Kenerley, C. (2004). Modelling the growth of *Trichoderma virens* with limited sampling of digital images. *Journal of applied microbiology*, 97(3), 486-494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02310.x>
- Dean, R., van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond, K., Di Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13(4), 414-430.
<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52(2), 137-145.
<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.11.009>
- Duarte, H., Villamar, M., Arcentales, V., & Cepeda, K. (2018). *Plan de exportación de mora de castilla para la asociación de "Productores de mora Guantug Cruz" hacia el mercado de Barcelona - España*. Universidad Laica Vicente Rocafuerte De Guayaquil.

- Elad , Y., Pertot, I., Cotes, A., & Stewart, A. (2015). Plant Hosts of Botrytis spp. In S. Fillinger, & Y. Elad, *Botrytis: the Fungus, the pathogen and its management in agricultural systems* (pp. 413-486). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20
- Erper, I., Celik, H., Turkkan, M., & Cebi, M. (2015). First report of Botrytis cinerea on golden berry. *Australian Plant Disease Notes*, 10(25).
<https://doi.org/10.1007/s13314-015-0175-0>
- Fernández, J., Strik, B., Zhao, Y., & Finn, C. (2015). Trailing Blackberry Genotypes Differ in Yield and Postharvest Fruit Quality during Establishment in an Organic Production System. *HortScience*, 50(2), 240-246.
<https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.2.240>
- Ferrada, E., Latorre, B., Zoffoli, J., & Castillo , A. (2016). Identification and Characterization of Botrytis Blossom Blight of Japanese Plums caused by Botrytis cinerea and B. prunorum sp. nov. in Chile. *Phytopathology*, 106(2), 155-165. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-15-0143-R>
- Fillinger, S., & Elad, Y. (2016). *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer International Publishing.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Fournier , E., Giraud, T., Vaustrin, D., Estoup, A., Solignac, M., Cornuet, J., & Brygoo, Y. (2002). Characterization of nine polymorphic microsatellite loci in the fungus Botrytis cinerea (Ascomycota). *Molecular Ecology Notes*, 2(3), 253-255.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00207.x>
- Franco, G., & Giraldo, M. (1999). *El cultivo de la mora*. Pereira: Feriva.
- Garrido, P. (2009). *Evaluación de la diversidad genética de la mora cultivada (Rubus Glaucus Benth) y especies emparentadas en Zonas productivas del Ecuador*

mediante marcadores moleculares RAPDs ISSRs y ALFPs. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.

- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K., & Brygoo, Y. (1999). Two Sibling Species of the *Botrytis cinerea* Complex, *transposa* and *vacuma*, Are Found in Sympatry on Numerous Host Plants. *Phytopathology*, 89(10), 987-973. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.1999.89.10.967>
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Leroux, P., & Brygoo, Y. (1997). RFLP markers show genetic recombination in *Botrytinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species. *Molecular Biology and Evolution*, 14(11), 1177-1185. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025727>
- Govrin, E., & Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biol.*, 10(13), 751-757. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00560-1)
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- Hua, L., Yong, C., Zhanquan, Z., Boqiang, L., Guozheng, Q., & Shiping, T. (2018). Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety*, 2(3), 111-119. <https://doi.org/10.1093/fqsafe/fyy016>
- INIAP. (2014). *Mora*. <http://tecnologia.iniap.gob.ec/index.php/explore-2/mfruti/rmora>

- Isaza, L., Zuluaga, Y., & Marulanda, M. (2019). Morphological, pathogenic and genetic diversity of *Botrytis cinerea* Pers. in blackberry cultivations in Colombia. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41(5). <https://doi.org/10.1590/0100-29452019490>
- Iza, M., Viteri, P., Hinojosa, M., Martínez, A., Sotomayor Correa, A., & Viera, W. (2020). Diferenciación morfológica, fenológica y pomológica de cultivares comerciales de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Enfoque UTE*, 11(2), 47–57. <https://doi.org/10.29019/enf>
- Jarvis, W. (1977). *Botryotinia and Botrytis species - Taxonomy, physiology and pathogenicity. A guide to the literature*. Ottawa: Research Branch, Canada Department of Agriculture.
- Koppert Biological Systems. (2021). *Grey mould*. Koppert: <https://www.koppert.com/challenges/disease-control/grey-mould/>
- Kronholm, I., Johannesson, H., & Ketola, T. (2016). Epigenetic Control of Phenotypic Plasticity in the Filamentous Fungus *Neurospora crassa*. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, 6(12), 4009–4022. <https://doi.org/10.1534/g3.116.033860>
- Li, X., Kerrigan, J., Chai, W., & Schnabel, G. (2012). *Botrytis caroliniana*, a new species isolated from blackberry in South Carolina. *Mycologia*, 104(3), 650-658. <https://doi.org/10.3852/11-218>
- Liu, Y., Whelen, S., & Hall, B. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular biology and evolution*, 16(12), 1799-1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- López, A. M., Marulanda, M. L., Gómez, L. M., & Barrera, C. F. (2019). *Rubus glaucus* Benth.: morphology and floral biology aimed at plant breeding processes. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 72(3), 8909–8915. <https://doi.org/10.15446/rfnam.v72n1.75910>

- Martínez, A., Vásquez, W., Viteri, P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). *Ficha técnica de la variedad de mora sin espinas (Rubus glaucus Benth) INIAP Andimora*. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina. Repositorio INIAP:
http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/4768/1/iniapsc_359.pdf
- Martinez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). Phenotypic differences between vacuma and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109(5), 479-488.
<https://doi.org/10.1023/A:1024222206991>
- Martínez, F., Blancard, D., Lecomte, P., Levis, C., Dubos, B., & Fermaud, M. (2003). Phenotypic Differences Between vacuma and transposa subpopulations of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 479-488.
<https://doi.org/10.1023/A:1024222206991>
- Martinez, F., Dubos, B., & Fermaud, M. (2005). The Role of saprotrophy and virulence in the population dynamics of *Botrytis cinerea* in vineyards. *Phytopathology*, 95, 692-700. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0692>
- Milicevic, T., Topolovec, S., Cvjetkovic, B., Ivic, D., & Duralija, B. (2006). Sympatric subpopulations of *botrytis cinerea* on strawberries based on the content of transposable elements and their connection with resistance to botryticides. *Acta Horticulturae*, 708(16), 115-118. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2006.708.16>
- Miller, M., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1-8. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Mirzaei, S., Goltapeh, E., Shams-Bakhsh, M., & Safaie, N. (2008). Identification of *Botrytis* spp. on Plants Grown in Iran. *Journal of Phytopathology*, 156, 21-28.
<https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01317.x>

- Montalvo, D. (2011). *Evaluación de la calidad poscosecha de las accesiones seleccionadas de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) provenientes de las provincias de Tungurahua y Bolívar*. Quito: EPN.
- Montoya, C., Hincapié, L., & Uribe, V. (1997). *Principales enfermedades y plagas en el cultivo de la mora*. Quinchia: ICA.
- Mora, M. A., Pardo, F. P., & Bastidas, H. (2020). Diagnóstico Patológico en Mora de Castilla *Rubus glaucus* Benth (Rosales:Rosaceae). *Orinoquia*, 24(2), 27–32. <https://doi.org/10.22579/20112629.632>
- Notte, A., Plaza, V., Marambio, B., Olivares, L., Poblete, M., Silva, E., & Castillo, L. (2021). Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated to the endemic flora of semi-desert climate in Chile. *Current research in microbial sciences*(2). <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100049>
- Pei, Y., Tao, Q., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Li, Z., Qi, X., Xu, J., Zhang, M., Chen, H., Chang, X., Tang, H., Sui, L., & Gong, G. (2019). Phenotypic and Genetic Characterization of *Botrytis cinerea* Population from Kiwifruit in Sichuan Province, China. *Plant disease*, 103(4), 748-758. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0707-RE>
- Petrasch, S., Silva, C., Mesquida, S., Gallegos, K., van den Abeele, C., Papin, V., Fernandez, F., Knapp, S., & Blanco, B. (2019). Infection Strategies Deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a Function of Tomato Fruit Ripening Stage. *Front. Plant Sci.*, 10(223), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00223>
- Plesken, C., Pattar, P., Reiss, B., Naoshin, Z., Zhang, L., Klug, K., Huettel, B., & Hahn, M. (2021). Genetic Diversity of *Botrytis cinerea* Revealed by Multilocus Sequencing, and Identification of *B. cinerea* Populations Showing Genetic

- Isolation and Distinct Host Adaptation. *Frontiers in plant science*(12).
<https://doi.org/10.3389/fpls.2021.663027>
- Popenoe, W. (1924). *Economic Fruit Bearing Plants of Ecuador*. Quito: Contributions from the National Herbarium.
- Quinatoa, N. (2015). *Evaluación del control de botrytis (Botrytis cinerea) en el cultivo de mora (Rubus glaucus Benth) mediante el uso de Trichoderma y EMAS en la comunidad de Misquillí*. Universidad Técnica de Ambato.
- Rayner, A., & Coates, D. (1987). Regulation of mycelial organization and responses. In A. Rayner , C. Brasier, & D. Moore, *Evolutionary biology of the Fungi*. Cambridge: Cambridge.
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). Chapter 4 - Botrytis cinerea (Gray Mold). En S. Banos, *Postharvest Decay: Control Strategies* (págs. 131-146). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>
- Romolerux, R. (1996). *Flora of Ecuador. Herbario, Departamento de Biología, Quito-Ecuador*. Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Slepecky, R., & Starmer, W. (2009). Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia*, 101(6), 823-832.
<https://doi.org/10.3852/08-197>
- Staats, M., van Baarlen, P., & van Kan, J. (2005). Molecular Phylogeny of the Plant Pathogenic Genus *Botrytis* and the Evolution of Host Specificity. *Molecular Biology and Evolution*, 22(2), 333-346. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi020>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312-1313.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>

- Steentjes, M., Scholten, O., & van Kan, J. (2021). Peeling the Onion: Towards a Better Understanding of Botrytis Diseases of Onion. *Phytopathology*, 11(3), 464-473. <https://doi.org/10.1094/phyto-06-20-0258-ia>
- Tanovic, B., Delibasic, G., Milivojevic, J., & Nikolic, M. (2009). Characterization of Botrytis cinerea isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 61(3), 419-429. <https://doi.org/10.2298/ABS0903419T>
- Tanovic, B., Hrustic, J., Mihajlovic, M., Grahovac, M., & Delibasic, G. (2014). Botrytis cinerea in raspberry in Serbia I: Morphological and molecular characterization. *Institute of Pesticides and Environmental Protection, Belgrade*, 29(4), 237-247. <https://doi.org/10.2298/PIF1404237T>
- Terrones, J., Nieto, D., Nava, C., & Téliz, D. (2019). Botrytis cinerea causing gray mold in blackberry fruit in Mexico. *Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3), 365-382. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1906-1>
- Thomas, P., Wyckoff, E., Pishko, E., Yu, J., Kirkland, T., & Cole, G. (1997). The hsp60 gene of the human pathogenic fungus *Coccidioides immitis* encodes a T-cell reactive protein. *Gene*, 199(1-2), 83-91. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(97\)00351-x](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(97)00351-x)
- Thompson, M. M. (1995). Chromosome Numbers of Rubus Species at the National Clonal Germplasm Repository. *HortScience*, 30(7), 1447-1452. <https://doi.org/10.21273/hortsci.30.7.1447>
- Torgimson, J., Thuente, J., & Whealy, K. (2009). *Fruit, berry and Nut Inventory: An Inventory of Nursery Catalogs and Websites Listing Fruit, Berry and Nut Varieties by Mail Order in the United States* (Cuarta ed.). New York: Seed Savers Exchange. <https://doi.org/10.188242462X>
- Vaidya, G., Lohman, D., & 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/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>
- van Kan, J. (2005). Infection strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta horticulturae* 669, 9(1), 77-90. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2005.669.9>
- van Kan, J. (2006). Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 11(5), 247-25. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.03.005>
- Vásquez, W., Pupiales, P., Viteri, P., Sotomayor, A., Feican, C., Campaña, D., & Viera, W. (2019). Escarificación química y aplicación de ácido giberélico para la germinación de semillas de cultivares de mora (*Rubus glaucus* Benth). *Interciencia*, 44(3), 159-164.
- Villares, M., Martínez, A., Viteri, D., Viera, W., Jácome, R., Ayala, G., & Noboa, M. (2016). Manejo de plagas identificadas en el cultivo de la mora de castilla. In D. Galarza, S. Garcés, J. Velásquez, V. Sánchez, & J. Zambrano, *El cultivo de la mora en el Ecuador* (pp. 117-134). Quito, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura.
- Viteri, P., Vásquez, W., Martínez, A., Viera, V., Sotomayor, A., Mejía, P., & Brito, B. (2016). Características generales de la planta, variedades cultivadas y clones promisorios de mora. In D. Galarza, S. Garcés, J. Velásquez, V. Sánchez, & Z. J., *El cultivo de la mora en el Ecuador* (pp. 39-57). INIAP: Programa Nacional de Fruticultura.
- Walker, A., Gautier, A., Confais, J., Martinho, D., Viaud, M., Le, P., Dupont, J., & Fournier, E. (2011). *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 101(12), 1433-1445. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-11-0104>
- Weiberg, A., Wang, M., Lin, F., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H., & Jin, H. (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA

interference pathways. *Science (New York, N. Y.)*, 342(6154), 118-123.

<https://doi.org/10.1126/science.1239705>

Weiberg, A., Wang, M., Lin, F., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H., & Jin, H.

(2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, 342(6154), 118-123.

<https://doi.org/10.1126/science.1239705>.

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of

fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, D. Gelfand, J.

Sninsky, & T. White, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (pp.

315-322). New York: Academic Press Inc.

Williamson, B., Duncan, G., Harrison, J., Harding, L., Elad, Y., & Zimand, G. (1995).

Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis*

cinerea. *Mycol. Res.*, 99(11), 1303-1310. [https://doi.org/10.1016/S0953-](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81212-4)

[7562\(09\)81212-4](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(09)81212-4)

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. (2007). *Botrytis cinerea*: the

cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8(5), 561-580.

<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P., & van Kan, J. (2007). *Botrytis cinerea*: the

cause of grey mould disease. *Mol Plant Pathol*, 8(5), 561-580.

<https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x>