



**ESPE**  
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

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

**CARRERA DE INGENIERÍA EN  
BIOTECNOLOGÍA**

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

**TEMA: ESTANDARIZACIÓN DE UNA METODOLOGÍA DE  
INOCULACIÓN DE *Ilyonectria* sp., AGENTE CAUSAL DE LA  
MARCHITEZ EN PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (*Rubus  
glaucus*).**

**AUTOR: ITURRALDE SALAZAR PAOLA JANNINE**

**DIRECTOR: FLORES FRANCISCO, Ph.D**

**SANGOLQUÍ**

**2017**



# ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS  
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

## CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

### CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “Estandarización de una metodología de inoculación de *Ilyonectria* sp., agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*).” realizado por la señorita **ITURRALDE SALAZAR PAOLA JANNINE**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar a la señorita **ITURRALDE SALAZAR PAOLA JANNINE** para que lo sustente públicamente

Ciudad, 14 de enero del 2017

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'Francisco J. Flores Flor'.

---

FRANCISCO JAVIER FLORES FLOR  
DIRECTOR



## DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

### CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

#### AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **ITURRALDE PAOLA** con cédula de identidad N° 1725069866, declaro que este trabajo de titulación “Estandarización de una metodología de inoculación de *Ilyonectria* sp., agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*).” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Ciudad, 14 de enero del 2017

PAOLA JANNINE ITURRALDE SALAZAR

C.C 1725069866



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

**CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**AUTORIZACIÓN**

Yo, **ITURRALDE PAOLA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación “Estandarización de una metodología de inoculación de *Ilyonectria* sp., agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla (*Rubus glaucus*).” cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

**Ciudad, 14 de enero del 2017**

**PAOLA JANNINE ITURRALDE SALAZAR**

**C.C 1725069866**

## **DEDICATORIA**

A mis padres Patricio y Ximena por ayudarme a salir adelante y enseñarme a luchar por lo que quiero, a no dejarme vencer por las adversidades y a ser cada día una mejor persona; también por el apoyo y el amor incondicional que me han brindado siempre.

A mis hermanos Felipe y Leonel por siempre haberme apoyado, cuidado y por estar a mi lado cuando más lo necesita.

A mis sobrinas Camila y Emilia que me alegran la vida con su presencia, y aunque no estén todo el tiempo conmigo, son las personitas más especiales e importantes de mi vida.

También a mi abuelita Teresa por todo el apoyo y cariño que me brinda

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mis padres Ximena y Patricio, por haberme dado la oportunidad de tener una profesión, de hacer realidad mis metas y sueños, por darme palabras de aliento cuando más lo necesitaba y no dejarme rendir por cualquier obstáculo que se interponga en el camino, lo cual me ha inspirado a ser mejor cada día.

A mis hermanos Felipe y Leonel por protegerme y ver por mis beneficios, sobre todo por su compañía y cariño.

A los Departamentos de Biotecnología, Fruticultura y Protección Vegetal del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), por abrirme las puertas y dejarme formar parte de los proyectos de investigación con los que están vinculados.

A los técnicos del INIAP Cristina Tello, Pablo Llumiquinga y Johanna Buitrón, por asesorarme y enseñarme a tener destrezas tanto en la parte biotecnología como en la agropecuaria.

A mi director de tesis de la Universidad de las Fuerzas Armadas, Francisco Flores, por toda su comprensión, apoyo y tiempo invertido en mi proyecto, además por transmitirme sus conocimientos y orientarme en lo que necesitaba, aportando a mi formación como profesional.

A los Ing. William Viera y Francisco Báez por darme la oportunidad de ser parte del proyecto Biocontrol for sustainable farming systems, Ecuador. de Ag Research - Nueva Zelanda, y por darme el financiamiento para que se pueda realizar el mismo.

Al Doctor Lenin Ron por haberme guiado en la parte estadística.

A mis amigos de la universidad Liz Abata, Liz Paz, Paty, Vale, Dani, Jonathan, Giovy y Beto por la gran amistad que hemos forjado desde que entramos a la universidad, y por las buenos momentos compartidos, dentro y fuera de las aulas, los cuales que nunca olvidare. A Byron no solo por formar parte de mi vida universitaria sino por apoyarme, acompañarme y vivir nuevas experiencias en el INIAP y a Geova por brindarme su

ayuda y no dejarme sola cuando más la necesitaba y haber compartido lindos momentos junto a mí en el INIAP.

Finalmente agradezco a las pasantes Caro y Johana por haberme ayudado en la parte práctica de mi proyecto, y por todas las experiencias malas y buenos que compartimos en el INIAP, que nos hizo buenas amigas.

Agradeciéndoles a cada uno de ustedes lo que han hecho por mí,

Con cariño

**PAOLA JANNINE ITURRALDE SALAZAR**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>CERTIFICACIÓN</b> .....	<b>ii</b>
<b>AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD</b> .....	<b>iii</b>
<b>AUTORIZACIÓN</b> .....	<b>iv</b>
<b>DEDICATORIA</b> .....	<b>v</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>vi</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDO</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	<b>x</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>xv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xvi</b>
<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.1    Formulación del problema.....	1
1.2    Justificación del problema.....	3
1.3    Objetivos de la investigación.....	4
1.3.1    Objetivo general.....	4
1.3.2    Objetivo específico.....	4
1.4    Marco teórico.....	4
1.4.1    Generalidades de la planta de mora de castilla ( <i>Rubus glaucus</i> ).....	4
1.4.2    Enfermedad de pie negro.....	8
1.4.3    Pruebas de patogenicidad.....	14
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>17</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>17</b>
2.1    Aislamiento de <i>Ilyonectria</i> sp.....	17
2.2    Identificación morfológica de <i>Ilyonectria</i> sp.....	18
2.3    Identificación molecular de <i>Ilyonectria</i> sp.....	18
2.4    Evaluación de la virulencia de los aislados.....	20
2.5    Inoculación de <i>Ilyonectria torresensis</i> en plantas de mora de castilla.....	21



2.5.1	Métodos de inoculación .....	21
2.6	Análisis estadístico .....	23
2.6.1	Etapa 1 Evaluación de la virulencia de los aislados.....	23
2.6.2	Etapa 2 Evaluación de la metodología de inoculación.....	24
<b>CAPÍTULO III.....</b>		<b>26</b>
<b>RESULTADOS.....</b>		<b>26</b>
3.1	Identificación morfológica .....	26
3.2	Identificación molecular .....	28
3.3	Evaluación de la virulencia de los aislados .....	32
3.4	Evaluación de métodos de inoculación .....	34
3.4.1	Evaluación de síntomas aéreos.....	34
3.4.2	Evaluación de síntomas a nivel de raíz .....	39
3.4.3	Evaluación de síntomas a nivel de cuello .....	42
<b>CAPÍTULO IV .....</b>		<b>47</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>		<b>47</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>		<b>54</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>54</b>
<b>CAPÍTULO VI.....</b>		<b>56</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>		<b>56</b>
<b>CAPÍTULO VII.....</b>		<b>57</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>		<b>57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Secuencias de los primers utilizados como parte de la identificación molecular. ....	19
<b>Tabla 2.</b> Descripción de los tratamientos .....	25
<b>Tabla 3.</b> Tamaño de macroconidias de aislamientos de <i>Ilyonectria</i> sp.....	28
<b>Tabla 4.</b> Porcentaje de cobertura e identidad de la muestra A6 mediante Blast-nucleotide en NCBI de la región ITS-5,8S.....	30
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de cobertura e identidad de la muestra A6 mediante Blast-nucleotide en NCBI de la región TEF .....	31
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de cobertura e identidad de la muestra A6 mediante Blast-nucleotide en NCBI de la región TEF .....	31
<b>Tabla 7.</b> Análisis de varianza (ANOVA) del tamaño de la lesión producido por aislamientos de <i>I. torresensis</i> en tallos de <i>R. glaucus</i> .....	32
<b>Tabla 8.</b> Prueba de medias de LSD- Fisher para el tamaño de la lesión provocado por aislamientos de <i>I. torresensis</i> en tallos de mora, Error: 0.6619, gl: 21 .....	33
<b>Tabla 9.</b> Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de marchitez en las hojas basales en <i>R. glaucus</i> , entre los métodos de inoculación y sus controles.....	35
<b>Tabla 10.</b> Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de marchitez en las hojas basales en <i>R. glaucus</i> cuando ocurre la interacción entre los métodos de inoculación y el tratamiento a la raíz. ....	36
<b>Tabla 11.</b> Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en <i>R. glaucus</i> entre los métodos de inoculación .....	39

<b>Tabla 12.</b> Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en <i>R. glaucus</i> entre la interacción de métodos de inoculación y el tratamiento a la raíz. ....	41
<b>Tabla 13.</b> Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel cuello en <i>R. glaucus</i> entre los métodos de inoculación. ....	43
<b>Tabla 14.</b> Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello en <i>R. glaucus</i> cuando ocurre la interacción entre los métodos de inoculación y el tratamiento a la raíz. ....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Producción, superficie, cosecha y rendimiento de <i>Rubus</i> en el Ecuador. ....	7
<b>Figura 2.</b> Países importadores de Mora año 2007 .....	8
<b>Figura 3.</b> Raíz de mora infectada con <i>C. destructans var destructans</i> .....	9
<b>Figura 4.</b> Características morfológicas de <i>Ilyonectria</i> sp.....	12
<b>Figura 5.</b> Cuello y raíces de <i>R.glaucus</i> con síntomas de pie negro A) Corte transversal B) Corte longitudinal (flechas indican de donde se aisló el hongo) .....	17
<b>Figura 6.</b> Aislamientos monospóricos de <i>Ilyonectria</i> sp. en PDA a los quince días de siembra.....	26
<b>Figura 7.</b> Estructuras reproductoras de <i>Ilyonectria</i> sp. A) Microconidia. B) Macroconidias. C) Clamidosporas en micelio. D) clamidospora en macroconidias, barra representa: 30 $\mu$ m.....	27
<b>Figura 8.</b> Amplificación de 7 aislamientos pertenecientes a <i>Ilyonectria</i> sp. (A1-A7) con el par de cebadores ITS1/ITS4; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 100 bp ADN Ladder) A) Amplificación de los aislamientos A1, A3, A4, A5, A6 y A7, B) Amplificación de A2 con los controles positivos A5 Y A7 .....	28
<b>Figura 9.</b> Amplificación de 7 aislamientos pertenecientes a <i>Ilyonectria</i> sp. (A1-A7) con el par de cebadores Dest1/Dest4; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 1 kb plus ladder) .....	29
<b>Figura 10.</b> Amplificación de 7 aislamientos pertenecientes a <i>Ilyonectria</i> sp. (A1-A7) con el par de cebadores Ef1 $\alpha$ -983/Ef1 $\alpha$ -2218R; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 1 kb plus ladder) .....	29

<b>Figura 11.</b> Amplificación de 3 aislamientos pertenecientes a <i>Ilyonectria</i> sp. (A1, A3 y A7) con el par de cebadores Ef1/Ef2; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 1 kb plus ladder) .....	30
<b>Figura 12.</b> Necrosis en tallos de <i>R. glaucus</i> transcurrido un mes después de la inoculación con <i>I. torresensis</i> .....	32
<b>Figura 13.</b> Valor medio del tamaño de la lesión producida por los aislamientos <i>I. torresensis</i> (A1-A7) en tallos de mora de castilla ( <i>R. Glaucus</i> ) .....	33
<b>Figura 14.</b> Síntomas aéreos en <i>R. glaucus</i> transcurridos tres meses y medio después de la inoculación con <i>I. torresensis</i> A) Tratamiento control, B) Tratamiento con clamidosporas, C) Tratamiento con micelio, D) Tratamiento con conidias. ....	34
<b>Figura 15.</b> Porcentaje de incidencia de marchitez en hojas basales de <i>R. glaucus</i> entre los métodos de inoculación y sus respectivos testigos.....	35
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de incidencia de marchitez en hojas basales de <i>R. glaucus</i> entre los tratamientos de raíz con herida y sin herida. ....	36
<b>Figura 17.</b> Porcentaje de incidencia de marchitez en hojas basales de <i>R. glaucus</i> cuando hay interacción entre los métodos de inoculación y tratamiento de raíz con sus respectivos controles .....	38
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en <i>R. glaucus</i> entre los métodos de inoculación y respectivos testigos.....	40
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en <i>R. glaucus</i> entre los tratamiento de raíz con herida y sin herida.....	40
<b>Figura 20.</b> Porcentaje de incidencia en la infección a nivel de raíz cuando hay interacción entre los métodos de inoculación y tratamiento de raíz con sus respectivos controles .....	42
<b>Figura 21.</b> Sintomatología en el cuello de <i>R. glaucus</i> transcurrido tres meses y medio de su inoculación con <i>I. torresensis</i> . A) cuellos de mora	

	infectado por medio del método de inoculación con conidias y su respectivo control B) cuellos de mora infectado por medio del método de inoculación micelio y su respectivo control. C) cuellos de mora infectado por medio del método de inoculación con clamidospora y su respectivo control. ....	42
<b>Figura 22.</b>	Porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello en <i>R. glaucus</i> entre los métodos de inoculación y sus respectivos testigos.....	44
<b>Figura 23.</b>	Porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello en <i>R. glaucus</i> entre los tratamiento de raíz con herida y sin herida.....	44
<b>Figura 24.</b>	Porcentaje de incidencia en la infección a nivel de cuello cuando hay interacción entre los métodos de inoculación y tratamiento de raíz con sus respectivos controles. ....	46

## RESUMEN

En la enfermedad de pie negro en *Rubus glaucus*, la marchitez se origina de una pudrición severa de la raíz, causada por hongos del género *Ilyonectria*, más conocidos por su nombre anamorfo *Cylindrocarpon*. En este estudio se aisló hongos de plantas con síntomas de pie negro (A1 a A7) que se identificaron morfológicamente como *Ilyonectria* sp. Además se secuenció la región de espaciadores transcritos internos (ITS) y el gen del factor de elongación 1  $\alpha$  (TEF) obteniéndose 99% y 100% de identidad, respectivamente, con secuencias de la especie *I. torresensis*. Ambas secuencias fueron almacenadas en la base de datos GenBank con el número de accesión KY114516 para la región ITS y KY114517 para el gen TEF. También se evaluó la virulencia de los aislamientos midiendo el tamaño de lesión en los tallos de mora inoculados, siendo el aislado A6 el más virulento con una lesión promedio de 3.38 cm de diámetro. Finalmente, se realizaron pruebas de patogenicidad utilizando dos factores de estudio, el primero fue el método de inoculación donde se utilizaron conidias, micelio o clamidòsporas, el segundo fue el tratamiento de la raíz, con herida o sin herida. Los mejores resultados fueron obtenidos con la interacción entre el método de inoculación con conidios y raíz con herida, con una incidencia de marchitez del 88,8% y una incidencia de infección en raíz del 77%. Este tratamiento será utilizado para la evaluación de la resistencia al pie negro en programas de fitomejoramiento para el control de la enfermedad.

### Palabras claves:

- ***I.TORRESENSIS***
- **MARCHITEZ**
- **INCIDENCIA**
- **MÉTODOS DE INOCULACIÓN**
- **PATOGENICIDAD**

## ABSTRACT

Black foot disease in *Rubus glaucus*, causes wilting due to severe root rot caused by fungi from the genus *Ilyonectria*, best known for their anamorph name *Cylindrocarpon*. In this study, plant pathogenic fungi were isolated from *R. glaucus* showing symptoms of black foot. Isolates A1 to A7 were morphologically identified as *Ilyonectria* spp. In addition, the internal transcribed spacer region (ITS), and the elongation factor 1 $\alpha$  gene (TEF) were sequenced, showing 99% and 100% identity, respectively, with sequences of the species *I. torresensis*. Both sequences were uploaded to GenBank under accession number KY114516 for the ITS region and KY114517 for the TEF gene. The virulence of the isolates was also evaluated by measuring the lesion size on inoculated blackberry stems, isolate A6 was the most virulent with an average lesion size of 3.38 cm in diameter. Finally, pathogenicity tests were performed using two study factors, the first being the inoculation method where conidia, mycelium or chlamydospores were used, the second was root treatment, with wound or no wound. The best results were obtained with the interaction between the conidia inoculation and wounded root, with a wilt incidence of 88.8% and incidence of root infection of 77%. This treatment will be used to assess black foot resistance in breeding programs for the control of the disease.

### Keywords:

- ***I.TORRESENSIS***
- **WILTING**
- **INCIDENCE**
- **INOCULATION METHODS**
- **PATHOGENICITY**





# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Formulación del problema

Desde la década de 1990, el cultivo de la mora (*Rubus glaucus*) ha adquirido gran importancia por la demanda de la fruta, los precios que alcanza en los mercados, su gran aceptación en la agroindustria y el incremento de su consumo en fresco (Delgado, 2012).

Dentro de la problemática fitosanitaria en cultivos de mora de castilla del Ecuador, se encuentran algunas enfermedades importantes como la pudrición del fruto (*Botrytis cinerea*), el mildiu veloso (*Peronospora sparsa*), el mildiu polvoso (*Oidium* spp.) y la marchitez (*Fusarium oxysporum*, *C. destructans*, *Verticillium dahliae* y *V. albo-atrum*) (MAGAP, 2013; Martínez, 2014).

La marchitez y la pudrición de raíces en plantas de mora de castilla, son síntomas típicos del pie negro, enfermedad que reduce la vida útil de las plantas y provoca pérdidas en los rendimientos (Andrade, 2012; Arévalo et al., 2011), debido a la alta incidencia de hongos fitopatógenos como *C. destructans* (Cedeño, et al., 2004; Martínez, 2014). Estos hongos causan daño en las raíces y la corona de las plantas, donde se presentan grietas transversales, revelando un color marrón claro, marrón oscuro y rayas negras en los tejidos vasculares, lo que lleva al amarillamiento general de la planta; las hojas se marchitan, se secan y caen; finalmente, toda la planta se marchita y muere (Cedeño et al., 2004).

Investigaciones realizadas por Cedeño et al. (2004), en Mérida Venezuela, reportaron a *C. destructans* var *destructans* como el causante del pie negro en *R. glaucus*, basándose en la morfología del agente causal. Para poder corroborar la patogenicidad de *C. destructans* var *destructans* en cultivos de mora, este grupo de investigadores realizaron ensayos con plántulas de 6-8 cm de largo, que fueron

trasplantadas en suelo inoculado con 1,5% p/p de granos de cebada colonizados por el hongo. Como resultado de este estudio se pudo observar síntomas similares a la marchitez y pudrición de las raíces, con una mortalidad del 60% de las plantas a los 7 días de la inoculación y la muerte del resto de las plantas a las dos semanas subsecuentes.

También se han realizado pruebas de patogenicidad en plantas de Vid, con diferentes metodologías de inoculación que han permitido determinar el daño que *Cylindrocarpon* spp. tiene sobre la raíz de la planta. Entre las metodologías implementadas en estos estudios se encuentra la sumersión de la raíz en una suspensión de  $10^6$  conidias /mL de agua y la inyección de 20 mL de clamidosporas sobre el sustrato donde crecen las plántulas a una concentración de  $10^6$  clamidosporas /mL. Estas metodologías de inoculación fueron adecuadas para la infección del hongo, produciéndose la enfermedad del pie negro, relacionada con la marchitez en las plantas de vid (Alaniz, 2008; Probst, 2011).

En el Ecuador se realizó un estudio en el cual se identificó molecularmente con el uso de primers específicos, a *F. oxysporum*, *C. destructans*, *V. dahliae* y *V. alboatrum* como los hongos fitopatógenos asociados a la enfermedad de marchitez en plantas de mora de castilla, recolectadas de la provincia de Tungurahua, siendo el hongo aislado en mayor proporción *C. destructans*, por lo cual se consideró a este como el principal agente causal (Martínez, 2014).

A partir del año 2000, el Programa Nacional de Fruticultura del INIAP pone énfasis en las investigaciones de frutales nativos del Ecuador como la mora de castilla, enfocándose en el mejoramiento genético para la obtención de nuevas variedades que sean resistentes a las enfermedades, entre las cuales está el pie negro, además que sean de alta productividad y buena calidad (Pilapaña, 2013). Dentro de este proceso de mejoramiento genético se pueden utilizar las pruebas de patogenicidad con inóculos de *Ilyonectria* sp., para evaluar el grado de resistencia al pie negro de las diferentes accesiones de mora.

## 1.2 Justificación del problema

La mora es una fruta muy cotizada tanto a nivel nacional como internacional gracias a que puede ser comercializada como fruta fresca, en mermeladas o pulpas, por lo que tiene un gran potencial agroindustrial y de exportación (Delgado, 2012). Por este motivo es necesario conocer los problemas fitosanitarios que afectan a este cultivo; siendo el pie negro una enfermedad importante que debe ser controlada, ya que reduce los rendimientos, altera la calidad de la fruta y disminuye la vida productiva de la planta.

En anteriores investigaciones realizadas en Ecuador se aisló e identificó a *C. destructans*, cuyo teleomorfo es *Ilyonectria radícicola*, de plantas de mora con sintomatología de marchitez. Sin embargo, no existen estudios en el país que demuestren la patogenicidad de estos hongos, por tal motivo, se deberían implementar pruebas de patogenicidad con un método de inoculación que sea altamente reproducible, significativo y confiable, y permita determinar el grado de virulencia y la sintomatología que causa el hongo sobre estas plantas.

Para poder realizar estas pruebas es necesario corroborar que el aislamiento con el que se va a realizar el estudio pertenezca a *Ilyonectria* sp., para lo cual se pueden usar técnicas moleculares como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la secuenciación para identificar al patógeno de manera precisa y rápida.

Las pruebas de patogenicidad formarían parte de programas de fitomejoramiento, cuyo principal objetivo es seleccionar los mejores genotipos de plantas dentro de una población, las cuales deben demostrar resistencia a la marchitez causada por el pie negro y generar buenas características en cuanto a la calidad de la fruta.

### **1.3 Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1 Objetivo general**

- Estandarizar un método de inoculación con *Ilyonectria* sp., agente causal de la marchitez en plantas de mora de castilla

#### **1.3.2 Objetivo específico**

- Identificar morfológica y molecularmente aislados de *Ilyonectria* sp. provenientes de plantas de mora de castilla con sintomatología de marchitez.
- Determinar el grado de virulencia de las cepas identificadas como *Ilyonectria* sp.
- Evaluar diferentes métodos de inoculación de *Ilyonectria* sp. en plantas de mora de castilla

### **1.4 Marco teórico**

#### **1.4.1 Generalidades de la planta de mora de castilla (*Rubus glaucus*)**

##### **1.4.1.1 Origen y distribución**

La mora (*Rubus* sp.) es nativa de Asia, Europa, norte y sur América. Existen alrededor de 300 especies dispersadas en casi todo el mundo excepto en las zonas desérticas. Estas abarcan un gran número de variedades que son comestibles y que tienen una buena aceptación comercial (Calero, 2010; Gonzalez, 2010).

Una de las variedades oriundas de las estribaciones de la cordillera de los Andes y de otras zonas altas tropicales de América es la mora de Castilla (*R. glaucus*), conocida principalmente en Ecuador, Colombia, Panamá, Guatemala, Honduras, México y Salvador (Andrade, 2012; Gonzalez, 2010).

Existen varias especies de *Rubus* en el Ecuador, sin embargo, la de mayor importancia comercial y la más cultivada en el país es *R. glaucus*, en tierras que están entre 2.500 y 3.000 metros sobre el nivel del mar. La producción de esta fruta se da principalmente en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura, Carchi (Farinango, 2010; MAGAP, 2013).

#### **1.4.1.2 Taxonomía**

Según De la Cadena & Orellana (1984) y Romoleroux (1996) la clasificación taxonomía de la mora es la siguiente:

Reino: *Plantae*

Clase: *Dicotyledonae*

Orden: *Rosae*

Familia: *Rosaceae*

Género: *Rubus*

#### **1.4.1.3 Descripción botánica**

Es una planta de vegetación perenne, conformada por varios tallos rastreros o semierguidos, espinosos, que pueden crecer de tres a cuatro metros (Martinez, 2007). Presenta hojas compuestas trifoliadas con el margen acuminado y aserrado, verde oscuros en el haz y blanquecino en el envés, de forma lanceolada con una longitud de 5 a 12 cm y espinas ganchudas (Garcia, 2006). Las raíces son abundantes, racimosas, filiformes, nudosas y profundas (Muñoz, 2012).

Las flores son hermafroditas y actinomorfas, se desarrollan tanto en racimos terminales como laterales, contienen cinco pétalos de color blanco o rosado. Poseen varios estambres y carpelos acoplados al receptáculo. Cada carpelo está compuesto de un ovario, dos óvulos y un pistilo largo, de los cuales se origina un pequeño fruto

carnoso llamado drupa. Los frutos son esféricos o elipsoides, de color rojo, cada fruto posee una gran cantidad de semillas diminutas (Delgado, 2012; Muñoz, 2012).

#### 1.4.1.4 Condiciones de cultivo

Según MAGAP (2013) los requerimientos climáticos para el cultivo son los siguientes:

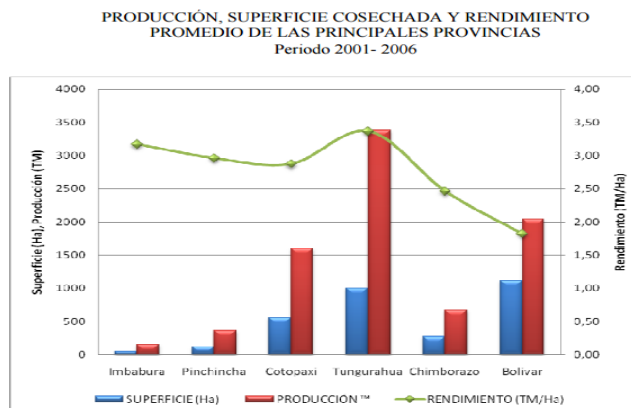
- **Precipitación:** debe oscilar entre 600 a 800 mm de lluvias durante todo el año
- **Temperatura media:** la óptima fluctúa entre 12 a 18 °C
- **Altitud:** el cultivo se adapta a alturas de 2500 – 3100 m.s.n.m
- **Suelo:** los aptos para la cosecha son francos, arenosos y negros, con pH 5,5 – 7,5

#### 1.4.1.5 Importancia económica

##### 1.4.1.5.1 Producción

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación), en el año 2007 el Ecuador produjo 6388 t/año, siendo la producción de mora superior en la provincia de Tungurahua seguido por Bolívar (figura 1). La primera presenta un aporte del 41% en la producción total de la fruta, y abarca el 32% de la superficie cosechada mientras que la última representa el 25% de la producción total y el 36% de la superficie cosechada. Los rendimientos son de 4.75 t/ha y 1.82 t/ha, respectivamente (SIGRAGRO, 2006 citado por Calero, 2010).

Por otro lado, las provincias que presentan menor productividad son Cotopaxi Chimborazo, Pichincha e Imbabura con un aporte del 19%, 8%, 5% y 2% respectivamente de la producción total y registran un rendimiento de 2.87 t/ha, 2.46 t/ha, 2.96 t/ha y 3.17 t/ha respectivamente. La provincia de Cotopaxi posee el 18% de la superficie cosechada de mora a nivel nacional, mientras que Chimborazo, Pichincha e Imbabura abarcan, en conjunto, el 15% (SIGRAGRO, 2006 citado por Calero, 2010).



**Figura 1.** Producción, superficie, cosecha y rendimiento de *Rubus* en el Ecuador.

Fuente: MAGAP, SIGAGRO,SICA.(2006)

El último reporte de producción del Departamento de Agricultura de Estados Unidos en el 2008, revela que la producción de cultivo de mora fue de 23600 t en este país y se encuentran 2711 ha cosechadas. El estado de Oregón es el principal productor de mora, con el 90.7% de la producción total del país, que corresponde a 21409 t, de las cuales, el 88% se destinan al procesamiento. El periodo de las cosecha de mora en Estados Unidos está entre mediados de junio y mediados de octubre (Ruiz & Ureña, 2009)

En el año 2005 se cultivaron en Europa 7692 ha, siendo Serbia el mayor productor con un aporte del 69% del área cultivada y el 58% de la producción (27558 t), con un rendimiento de 5.2 t/ha. Le sigue Hungría con una producción de 13227 t, en un área de 1600 ha. La producción en estos dos países es utilizada en el procesamiento y a la exportación del fruto congelado para suplir la demanda del resto de Europa (Ruiz & Ureña, 2009).

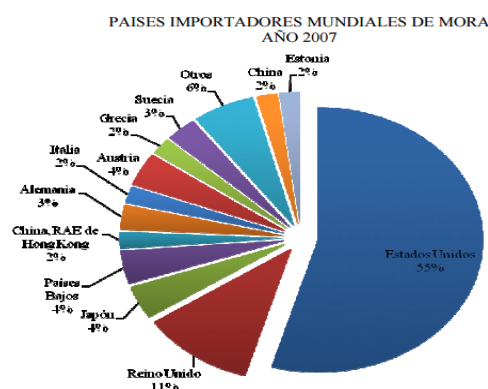
#### 1.4.1.5.2 Demanda

En los últimos años la demanda de mora fresca y procesada ha incrementado a nivel mundial. Los principales consumidores de esta fruta son Estados Unidos, Francia, Inglaterra Alemania y Japón. Para abastecer la demanda del mercado de Estados Unidos



es necesaria la importación de la fruta principalmente desde México, Guatemala, Costa Rica y Chile (Flor, 2007).

La cantidad de las importaciones a nivel mundial de la mora y otras bayas tienen un valor de \$217000000 y los principales países importadores se detallan en la figura 2 (Calero, 2010).



**Figura 2.** Países importadores de Mora año 2007

Fuente: FAOSAT, 2007

Debido al invierno, entre noviembre y marzo no se presenta producción de mora en Europa y Estados Unidos, por lo tanto, estos meses se convierten en una alternativa para la exportación de mora en Ecuador (Calero, 2010).

## 1.4.2 Enfermedad de pie negro

### 1.4.2.1 Sintomatología

Cuando las plantas de mora son infectadas por *Ilyonectria* sp. se deben tomar en cuenta determinados síntomas que se presentan en la enfermedad de pie negro la cual está relacionada con la marchitamiento de la parte aérea de la planta.

En cuanto a los síntomas aéreos se puede observar marchitez en las hojas, las cuales muestran una necrosis en las puntas y los bordes, también se tornan secas y

quebradizas con curvaturas en la superficie superior. Además se pueden distinguir algunos frutos momificados que revelan colores marrón verdoso y marrón oscuro a casi negro (Cedeño ,*et al.*, 2004). En plantas de vid las hojas también se vuelven cloróticas y presentan entrenudos más cortos. En ocasiones, algunas yemas o la planta entera no llegan ni a brotar. Estos síntomas son consecuencia de los daños sufridos en las raíces y cuello de la planta, que es dónde ocurre la infección (Alaniz, 2008).

Las raíces y la corona de las plantas muertas se ven afectados por una pudrición negra. En las raíces se observan grietas transversales, y en ellos la corteza se desprende con facilidad, revelando un color marrón claro, marrón oscuro y rayas negras en los tejidos vasculares. En ocasiones, para remediar la pérdida de masa radicular, algunas plantas desarrollan una nueva emisión de raíces, normalmente por encima de la zona afectada, quedando más cercana a la superficie del suelo. En la parte interna de la corona de las plantas muertas, también se observa rayas negras, que contrasta con el color blanco amarillento de los tejidos sanos circundantes. Todas las plantas muertas presentan un hueco central porción a la corona ( Cedeño et al.,2004; Alaniz, 2008).

En plantas de vid se ha logrado observar tilosis o goma de color marrón en los vasos conductores, así como la presencia de hifas en las células adyacentes al floema y al xilema joven bajo el microscopio (Alaniz, 2008).



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

Fuente: Cedeño et al, 2004

## 1.4.2.2 Agente causal

### 1.4.2.2.1 Taxonomía

Estudios filogenéticos utilizando la secuencia de la subunidad pequeña del ADN ribosomal revelaron que el grupo de especies de *Neonectria* antes llamados *Nectria* y sus anamorfos *Cylindrocarpon* son monofiléticas (Brayford et al., 2004; Mantiri et al., 2001) y están relacionadas con los sub-clados descritos por Booth (1996) , en donde se clasificó a *Cylindrocarpon* de acuerdo a la presencia o ausencia de microconidias y clamidosporas.

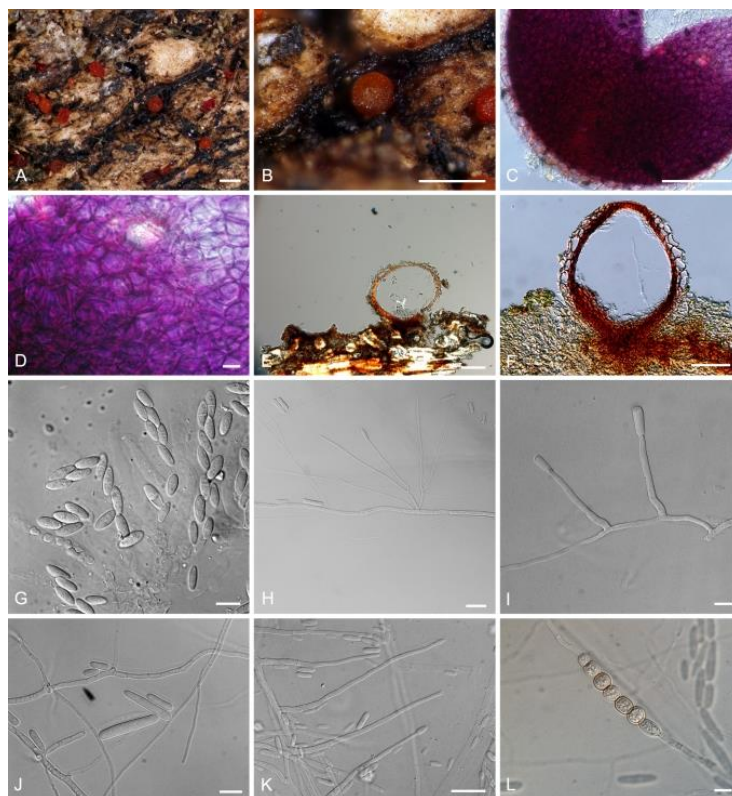
Sin embargo, los estudios filogenéticos multilocus realizados por Chaverri et al., (2011), revelaron que el grupo *Neonectria sensu stricto* y *Cylindrocarpon sensu stricto* eran monofiléticas al contrario del grupo *Neonectria sensu lato* y *Cylindrocarpon sensu lato* que eran parafiléticas, es decir, que *Neonectria/Cylindrocarpon* representan a más de un género. Por tal motivo, en este estudio se dividió a este grupo en 5 linajes independientes que podían ser interpretados como géneros, los cuales se clasificaron de acuerdo a la anatomía de los peritecios y a la presencia de los septos en los conidios. Entre estos géneros se describió por primera vez a *Ilyonectria* perteneciente al grupo *N. radiculicola* definida como *I. radiculicola* cuyo anamorfo es *C. destructans*.

Algunas especies de *Cylindrocarpon* que estaban relacionadas con la enfermedad del pie negro, como "*C. macrodidyma*", "*C. liriodendri*" (Halleen et al., 2006; Halleen, et al., 2004) fueron reclasificadas e incluidas en el grupo de *Ilyonectria* como *I. macrodidyma* e *I. liriodendri* con *I. radiculicola* previamente descrita como *I. destructans* como la especie tipo del género (Agusti-Brisach & Armengol, 2013; Chaverri et al., 2011).

#### 1.4.2.2.1 Morfología

La textura de las colonias de *Ilyonectria* sp. pueden ser algodonosas o con aspecto de fieltro, con micelio aéreo en el centro o en toda la colonia cuando estas crecen en PDA. Los colores de las colonias pueden variar de blanco a tonalidades amarillentas, cafés o canela (Pathrose, 2012).

Por otro lado, estos hongos se caracterizan por tener peritecios rojos de forma globosa a subglobosa, sus paredes periteciales tienen escamas o tienden a deformarse un poco. Sus anamorfos presentan abundantes microconidias y clamidosporas. Aparentemente tanto las macroconidias como las microconidias se originan de los mismos conidióforos. Las macroconidias son rectas, hialinas, por lo general con una prominencia basal, y no suelen presentar más de tres septos, su tamaño está en el rango de  $25-50(-55) \times 5-7.5 \mu\text{m}$ . Las microconidias muestran una forma elipsoide a ovalada con un hilum lateral o basal, son hialinas, tienen de cero a un septo, con un tamaño de  $3-15 \times 2.5-5(-6) \mu\text{m}$ . Las clamidosporas son abundantes, pueden estar intercaladas, solas o en cadenas, son globosas, y se tornan de amarillas a cafés (Chaverri et al., 2011).



**Figura 4.** Características morfológicas de *Ilyonectria* sp.

Fuente: Chaverri et al, (2011)

#### 1.4.2.2.2 Hábitat y distribución geográfica

Las especies del género *Ilyonectria* son hongos fitopatógenos que se encuentran en los suelos, las raíces, en plantas leñosas y herbáceas (Chaverri et al., 2011).

Estos hongos son cosmopolitas y algunos de los lugares donde se encuentran distribuidos son en Sudáfrica, Nigeria, Tanzania, Japón, Irán, Pakistán, Indonesia, Australia, Nueva Zelanda, Canadá, Francia, Portugal, España, Italia, Francia, Alemania, Uruguay, Venezuela, Brasil, Argentina y EE.UU (Abreo et al, 2010; Aiello et al, 2014; Alaniz, 2008; Booth, 1966; Cedeño et al., 2004; Halleen et al., 2006, 2004; Samuels & Brayford, 1990; Seifert & Axelrod, 1998).

### 1.4.2.3 Mecanismos de patogenicidad

#### 1.4.2.3.1 Toxinas y enzimas

Según Evans (1967) un cultivo de 14 días de *I. radicicola* en medio líquido puede producir de 31 a 82 µg/ml de nectrolide, fitotoxina relacionada con la patogenicidad del hongo (Andolfi et al., 2011), ya que a concentraciones menores de 6 µg/ml puede inhibir el crecimiento y ennegrecer las raíces de plántulas de *Eucalyptus pilularis* (Evans, 1967). Otra fitotoxina aislada de cultivos de *I. radicicola* fue brefeldin A, esta toxina inhibe la mitosis en las puntas de las raíces provocando el estancamiento de las mismas (Evans, 1967; Khorasani, 2013; Sweetingham, 1983).

Según Rahman & Punja (2005) las lesiones de color marrón oscuro causadas en raíces de ginseng por *C. destructans* se deben a la degradación de compuestos fenólicos por la actividad de poli fenol oxidasas, enzimas producidas por este hongo. Estos investigadores también encontraron un mayor nivel de actividad pectinasa en los aislamientos que son más virulentos. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Lyr & Kluge (1968) en árboles de pino, en el cual la patogenicidad de *C. destructans* se correlaciona con su actividad pectolítica.

#### 1.4.2.3.2 Modo de infección

El hongo puede invadir las raíces de las plantas a través de las clamidosporas, ya que en condiciones favorables estas germinan, producen hifas, se multiplican y crecen. Cuando el patógeno comienza a crecer en el suelo, las conidias germinan aumentando la eficacia del inóculo. La manera en que el hongo llega a infectar las plantas es por medio de heridas ya sea en la raíz o en el cuello de la planta. Estas pueden producirse por la aparición de raíces secundarias, las actividades de insectos, o nemátodos, o la abrasión por partículas del suelo (Horsfall & Dimond, 1960; Scheck, et al , 1998).

En plantas de Vid, al patógeno se lo puede encontrar a menudo en las raíces después de 3 meses de que haya ocurrido la infección en la planta, expandiéndose progresivamente al rizoma, la unión del injerto y vástagos (Halleen et al., 2003). A medida que el patógeno avanza hacia la extremidad de la vid, los tejidos se ennegrecen y exhiben una podredumbre seca cortical que rápidamente provoca la muerte regresiva de la planta. El xilema por lo general se obstruye con el tejido de hongos, mucílagos y tílides y el tejido vascular se oscurece (Probst, 2011). Por otro lado en las células de los radios del floema donde se almacena las reservas de almidón se pueden observar hifas fúngicas (Sweetingham, 1983).

El grado de infección del patógeno depende mucho de la edad de la planta. En el caso del vid mientras más joven sea la planta esta va ser más vulnerable al ataque del patógeno en comparación a las que tengan más edad, ya que las plantas jóvenes mueren rápidamente mientras que las otras pueden tardar más de un año en morir, debido a que la infección en las plantas viejas se propaga a un ritmo lento. Cuando las vides tienen menos de diez años de edad su muerte es irremediable (Scheck et al., 1998).

El patógeno puede producir clamidosporas cuando la planta de vid muere, y sobrevivir cuando se le provee de materia orgánica rica en hidratos de carbono y materia celulósica (como nuevas plantas de vid) o invadiendo las raíces de las plantas que se encuentran a su alrededor (Probst, 2011).

### **1.4.3 Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad se fundamentan en la inoculación de órganos aéreos o subterráneos de plantas sanas con cultivos puros previamente aislados de material enfermo proveniente del campo, con el objetivo de corroborar la patogenicidad del microorganismo aislado, determinar la variedad de hospedantes que puede tener el patógeno y para selección de la resistencia (Ames, 1997; French & Hebert, 1980).

Hay que tener en cuenta que las condiciones en las que se encuentren tanto el inóculo como la planta inoculada, ya que pueden llegar afectar los resultados de estas

pruebas. En el caso del inóculo este debe conservarse agresivo y virulento. También es necesario considerar que la planta puede o no ser resistente al patógeno de acuerdo a la fisiología que esta posea. Las condiciones ambientales también intervienen ya que los patógenos se ven afectados por la temperatura y disponibilidad del agua sobre la superficie de penetración (French & Hebert, 1980).

#### **1.4.3.1 Métodos de inoculación**

Cuando se trata de hongos saprofitos no obligados o facultativos es posible incrementar y uniformar el inóculo. Para la aplicación del mismo en el hospedante se cuenta con una variedad de métodos de inoculación (Ames, 1997; CIAT, 1981; French & Hebert, 1980) los cuales se mencionan a continuación:

- a) **Absorción por el hospedante:** Se realiza un corte transversal de los haces vasculares de una planta sana para facilitar el ingreso de los propágulos del microorganismo. El inóculo se prepara en una suspensión con agua y propágulos a una determinada concentración. El tiempo de sumersión de la parte cortada en la suspensión puede durar un instante o varios minutos.
- b) **Incorporación en el suelo:** El inóculo que va añadirse en el suelo se propaga en un sustrato amiláceo como granos de trigo o cebada previamente esterilizados. Se debe mantener la humedad para facilitar el ingreso del patógeno. La incorporación del inóculo se puede realizar antes de sembrar el cultivo, o alrededor de los órganos descubiertos por remoción momentánea del suelo. Este método se usa para infectar sistemas radiculares.
- c) **Depósito directo:** Se coloca un pedazo de micelio extraído del borde de una colonia en crecimiento sobre un tejido que este previamente desinfectado. El órgano inoculado se dispone en cámaras húmedas durante 24 o 48 horas, o más. Se utiliza este método para infectar tubérculos o frutas.



**d) Aspersión a presión:** Se prepara una suspensión de esporas en agua y se aplica el mismo con un atomizador manual o una bomba eléctrica de presión o de vacío, las plantas se cubren con plástico por 48 horas o más, para de esta forma mantener la humedad y facilitar la entrada del propágulo al tejido. Este método es usado cuando se trata de follaje o la parte aérea de la planta.

Cuando los patógenos son obligados no se los puede aislar en medio de cultivo ni ser multiplicados, por lo que estos deben cosecharse sobre el hospedante bajo condiciones controladas. Las estructuras propagativas se extraen con una brocha delicada y son colocadas en las hojas con la ayuda de un atomizador (Ames, 1997; French & Hebert, 1980).

## CAPÍTULO II

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1 Aislamiento de *Ilyonectria* sp.

El hongo fue aislado a partir de raíces y cuello que presentaron lesiones necróticas y de tonalidades cafés a negro en el tejido vascular (figura 5) de plantas de mora de Castilla con síntomas de marchitez, las cuales se lavaron con agua corriente para retirar suelo e impurezas. Posteriormente se tomaron pequeños trozos (2-3mm) de la interfaz de los tejidos sanos y enfermos, éstos inmediatamente se esterilizaron con hipoclorito de sodio 0,5% (NaClO) durante 3 min y se enjuagaron tres veces en agua destilada estéril, sembrándolos en cajas Petri con 44  $\mu$ L de ácido láctico por litro de medio PDA (Cedeño et al., 2004).



**Figura 5.** Cuello y raíces de *R.glaucus* con síntomas de pie negro

Nota: **A)** Corte transversal. **B)** Corte longitudinal (flechas indican de donde se aisló el hongo)

Después de siete días el hongo se purificó en PDA teniendo en cuenta la morfología de las colonias del género *Ilyonectria* cuya textura es de algodón o fieltro con micelio aéreo en el centro o en toda la colonia, con tonalidades que varían de blanco a canela.

Luego de siete días se obtuvieron cultivos monospòricos mediante diluciones seriadas, para lo cual se tomó dos pedazos de micelio de 5 mm<sup>2</sup> crecido en PDA y se los colocó en 9 ml de agua destilada estéril, para de esta forma obtener la dilución 10<sup>-1</sup>. De

esta dilución se colocó 1 mL a otro tubo con el mismo volumen de agua destilada estéril que el anterior y se prosiguió análogamente con el proceso hasta conseguir una dilución  $10^{-6}$ , finalmente se colocó 0.1mL de cada dilución en PDA y se observó que las esporas germinen para transferirlas individualmente a medio PDA. Los cultivos monospóricos se incubaron a 18-20°C en la oscuridad.

## **2.2 Identificación morfológica de *Ilyonectria* sp.**

Mediante microscopía óptica se identificaron las estructuras morfológicas de 7 cultivos monospóricos escogidos al azar utilizando las claves taxonómicas de Barnett y Hunter, 1999 y mediante de literatura (Chaverri et al., 2011; Pathrose, 2012; Samuels & Brayford, 1990). Para determinar el tamaño de las conidias se utilizó el programa Axio Vision LE, tomando 25 conidias de cada aislado para las respectivas mediciones.

## **2.3 Identificación molecular de *Ilyonectria* sp.**

Para de la identificación molecular se utilizarán cultivos monospóricos. La extracción de ADN se la realizó con el Kit “PureLink genomic plant DNA purification Invitrogen” siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se llevó a cabo un control de calidad del ADN para su cuantificación y validación (Martínez, 2014).

Se empleó la técnica de PCR para amplificar tres regiones dentro del genoma con cuatro pares de primers distintos (Tabla 1). Primeramente, se usaron los primers ITS1/ITS4 (White et al., 1990) para amplificar las secuencias de los espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 y el gen que codifica para el fragmento 5.8S del ARNr. También se amplificó un sector interno de la región ITS con los cebadores Dest1/Dest4 (Hamelin et al., 1996) y un fragmento del factor de elongación 1 alfa con los pares de primers Ef1/Ef2 (O’Donnell et al., 1998) y EF1-983/EF1-2218R (Rehner & Buckley, 2005).

Para cada reacción se utilizó 1X de buffer, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15 mM de dNTP's, 0,60 μM de cada primer, 1,20 U Taq ADN Polimerasa y 2,5μl de muestra de ADN con un volumen final de 25μl. Solo para los primers EF1-983/EF1-2218R se cambió la concentración de MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM. Las condiciones de PCR para los primers Dest1/Dest4 e ITS1/ITS4 fueron 94 °C durante 5 minutos en un ciclo para la desnaturalización, seguido por 35 ciclos de 95 °C durante 30 segundos, 71 °C (58 °C para ITS1/ITS4) durante 30 segundos y 72 °C por 1 minutos, finalmente un ciclo de 72 °C durante 10 minutos para completar las extensiones (Martínez, 2014). En cambio para los primers Ef1/Ef2 las condiciones fueron 94 °C por 10 min; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 53 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min y 72 °C por 10 min. Finalmente las condiciones PCR para EF1-983/EF1-2218R fueron 95 °C por 3 min; 35 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 1 min, y 72 °C por 3 min; 72 °C por 7 min.

Posteriormente los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %, preparado con tampón TAE 1X, por 30 min a 100 voltios. Las bandas se visualizaron en un transiluminador bajo luz ultravioleta. Las regiones amplificadas con los *primers* ITS1/ITS4, Ef1/Ef2 y EF1-983F/EF1-2218R se enviaron a secuenciar a Macrogen, Corea del Sur para determinar a qué especie del género *Ilyonectria* pertenecían.

**Tabla 1**

Secuencias de los *primers* utilizados como parte de la identificación molecular.

Primers	Secuencias	Amplición	Gen o región	Referencia
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAA CCTGCGG-3'	550pb	Región 5,8S- ITS	(White et al., 1990)
ITS4	5'-TCCTCCCGTTATT GATATGC-3'			

Continua



Dest1	5'TTGTTGCCTCGGCGG TGCCTG-3'	400pb	Sector interno de región ITS	(Hamelin et al.,1996)
Dest1	5'-TTGTTGCCTCGG CGGTGCCTG-3'			
Ef1a-983	5'- GCYCCYGGHCAY CG TGAYTTYAT-3	1000 pb	Región de traducción del factor de elongación 1 $\alpha$	(Rehner & Buckley, 2005)
Ef1a- 2218R	5'-ATGACACCACRG CRACRGTYTG-3'			
Ef1	5'-ATGGGTAAGGAR GACAAGAC-3'	600- 800pb	Región de traducción del factor de elongación 1 $\alpha$	(O'Donnell et al., 1998)
Ef2	5'-GGARGTACCA GTSATCATGTT-3'			

## 2.4 Evaluación de la virulencia de los aislados

Para determinar el grado de patogenicidad de cada uno de los 7 aislamientos se utilizó la técnica de depósito directo del inóculo, para lo cual se utilizaron tallos de mora de castilla cuya superficie fue desinfectada con 2% de NaOCl y cultivos monosporicos cultivados en medio PDA por 15 días como inóculo. Para las cámaras húmedas se colocó papel toalla humedecido con agua estéril en recipientes sellados previamente esterilizados con etanol al 70%. Los tallos fueron perforados con la ayuda de un sacabocados aproximadamente en el centro de los mismos, donde se colocó un pedazo de micelio de 5mm de diámetro y se lo envolvió con parafilm. Los tallos fueron colocados en las cámaras húmedas por un mes para su posterior evaluación.

Para poder evaluar el grado de patogenicidad de cada aislamiento se procedió a medir la longitud de la necrosis en los tallos con cuatro repeticiones por cada aislamiento, y finalmente se procedió re-asilar al patógeno y comprobar su identidad para completar los postulados de Koch (CIAT, 1981; Song et al., 2014). El aislamiento que se consideró como el más virulento fue utilizado posteriormente para realizar las pruebas de patogenicidad.

## **2.5 Inoculación de *Ilyonectria torresensis* en plantas de mora de castilla**

### **2.5.1 Métodos de inoculación**

#### **2.5.1.1 Inoculación con clamidosporas**

Para esta metodología se sembró un segmento de micelio de un cultivo monospórico de 5 días de edad en medio líquido papa – dextrosa (PDB), el cual permaneció en agitación por 15 días. Luego el micelio se homogenizó en una licuadora por 10 segundos y se colocó con la ayuda de una jeringuilla 50mL de inóculo en 1000 g de arena fina previamente esterilizada, contenida en una funda plástica. La arena se colocó por cuatro semanas en una estufa a 23°C hasta que se seque.

Posteriormente la arena fue sembrada en PDA a diferentes diluciones para de esta manera poder calcular la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) contenida en la arena. En el sustrato donde iban a ser transplantadas cada una de las plántulas, se colocaron 10 g de la arena inoculada la cual contenía una dosis de 15000 (UFC) de clamidosporas. Además se reinoculó con 20mL de suspensión de  $10^6$  clamidosporas/mL obtenidas del micelio cultivado en PDB por 30 días, colocando la suspensión en un agujero de 7 cm de profundidad en las plantas a inocular.

##### *2.5.1.1.1 Control sin clamidosporas (control clamidosporas)*

Las plantas control de esta metodología solo incluyeron el sustrato estéril y la arena sin el inóculo de clamidósporas.

#### **2.5.1.2 Inoculación con micelio**

Se esterilizó los granos de cebadas, para lo cual se colocó 400g de cebada con 500 mL de agua destilada y 250 mg de cloranfenicol en matraces de 1000mL, los

mismos fueron llevados a fuego hasta punto de ebullición, se los dejó reposar por 10 min y luego se los lavó tres veces con agua destilada, finalmente se los autoclavó dos veces con un intervalo de 24 horas (Probst, 2011). Ya estando estériles los granos de cebada, se procedió a colocar 10 pedazos de micelio de 6 mm de diámetro, tomado de un cultivo de *Ilyonectria* sp. de 5 días de edad, creciendo en PDA. Los cultivos se incubaron a 25°C por 30 días.

Para verificar que el hongo colonizador de los granos de cebada fuera el mismo que se identificó anteriormente, se procedió a sembrarlo en PDA, y se observó la morfología de las estructuras.

Para aplicar el inóculo se perforó un hueco de 5 cm de profundidad en el sustrato, donde se colocó 5 g de los granos colonizados con el hongo, luego se colocó una capa de tierra encima y se trasplantó las plantas de mora (Probst, 2011).

#### 2.5.1.2.1 Control cebada (control micelio)

Las plantas usadas como control sólo recibieron granos de cebada no colonizados por el hongo más el sustrato estéril

#### 2.5.1.3 Inoculación con conidias

Para obtener el inóculo se agregó 10 mL de agua destilada estéril (ADE) a un cultivo de 15 días de *Ilyonectria* sp. creciendo en PDA y se raspó mecánicamente la superficie del mismo con un portaobjetos. La suspensión de conidios se filtró a través de una gasa y se ajustó a una concentración  $1 \times 10^6$  conidios /mL con el uso de una cámara de Neubauer. Previo a la inoculación las raíces se desinfectaron mediante inmersión en solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante dos minutos y se enjuagaron con ADE dos veces. Las raíces de cada planta fueron sumergidas en la suspensión de conidios por 30 minutos, para inmediatamente ser trasplantadas al sustrato. Para garantizar la infección, transcurrido un mes desde la inoculación y plantación, se realizó una

inoculación adicional mediante un riego de 40 mL con una solución de igual concentración de conidios (Alaniz, 2008).

#### *2.5.1.3.1 Control agua estéril (control conidias)*

Las raíces de las plantas control fueron sumergidas en agua destilada estéril y colocadas posteriormente en sustrato estéril

## **2.6 Análisis estadístico**

### **2.6.1 Etapa 1 Evaluación de la virulencia de los aislados**

#### **2.6.1.1 Factor de estudio**

Siete aislamientos monospóricos pertenecientes al género *Ilyonectria*

#### **2.6.1.2 Unidad experimental**

Tallos de mora inoculados con 5mm de diámetro de micelio de 15 días crecido en PDA, colocados en cámaras húmedas.

#### **2.6.1.3 Diseño experimental**

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con 4 observaciones por aislamiento

Para determinar diferencias estadísticamente significativas se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de medias de LDS-Fisher con un  $\alpha = 0,05$ . Los cálculos se realizaron usando el programa computacional INFOSTAT



## **2.6.2 Etapa 2 Evaluación de la metodología de inoculación**

### **2.6.2.1 Factor de estudio**

- Métodos de inoculación (i)

Se evaluaron tres métodos de inoculación, de los cuales se escogió el más efectivo, es decir, el método que infecte al mayor número de plantas:

- i1: Método de inoculación con clamidosporas
- i2: Método de inoculación con micelio
- i3: Método de inoculación con conidias

Cada uno de los métodos mencionados conto con un control sin inóculo:

- Control i1: clamidósporas
- Control i2: micelio
- Control i3: conidias

- Tratamiento de raíz (h)

- h1: Plantas con herida de raíz
- h2: Plantas sin herida de raíz

### **2.6.2.2 Unidad experimental**

Una plántula de mora de castilla, trasplantada en una funda de polietileno con 500 gramos de sustrato esterilizado cuya composición fue de 1:3 pomina y tierra negra, en la que se aplicó un determinado tratamiento.

### 2.6.2.3 Tratamiento

Los tratamientos serán doce, resultantes de la interacción entre los factores en estudio  $i \times h$ , más los controles, Tabla 2.

**Tabla 2**

Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Codificación	Descripción
t1	i1h1	Método de inoculación con clamidósporas + herida de raíz
t2	i2h1	Método de inoculación con micelio + herida de raíz
t3	i3h1	Método de inoculación con conidias + herida de raíz
t4	i1h2	Método de inoculación con clamidósporas + sin herida de raíz
t5	i2h2	Método de inoculación con micelio + sin herida de raíz
t6	i3h2	Método de inoculación con conidias + sin herida de raíz
t7	Controli4h1	Control clamidósporas + herida de raíz
t8	Controli5h1	Control micelio + herida de raíz
t9	Controli6h1	Control conidias + herida de raíz
t10	Controli4h2	Control clamidósporas + sin herida de raíz
t11	Controli5h2	Control micelio + sin herida de raíz
t12	Controli6h2	Control conidias + sin herida de raíz

### 2.6.2.4 Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) con 9 observaciones por aislamiento.

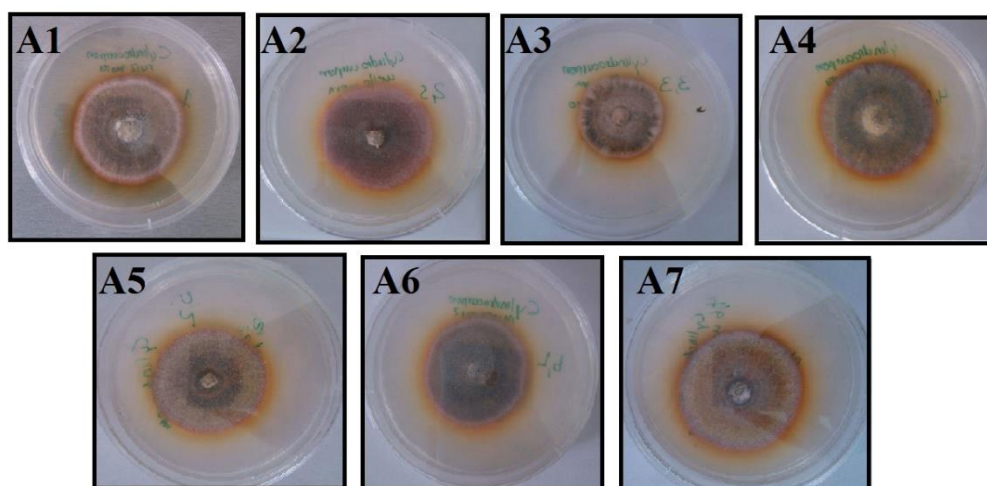
Para determinar diferencias estadísticamente significativas se realizó una prueba chi-cuadrado de Pearson. Los cálculos se realizaron usando el programa computacional INFOSTAT

## CAPÍTULO III

### RESULTADOS

#### 3.1 Identificación morfológica

Se identificaron 7 aislamientos monospóricos, en los cuales se evaluó el color y la textura de la colonia como se observa en la figura 6.

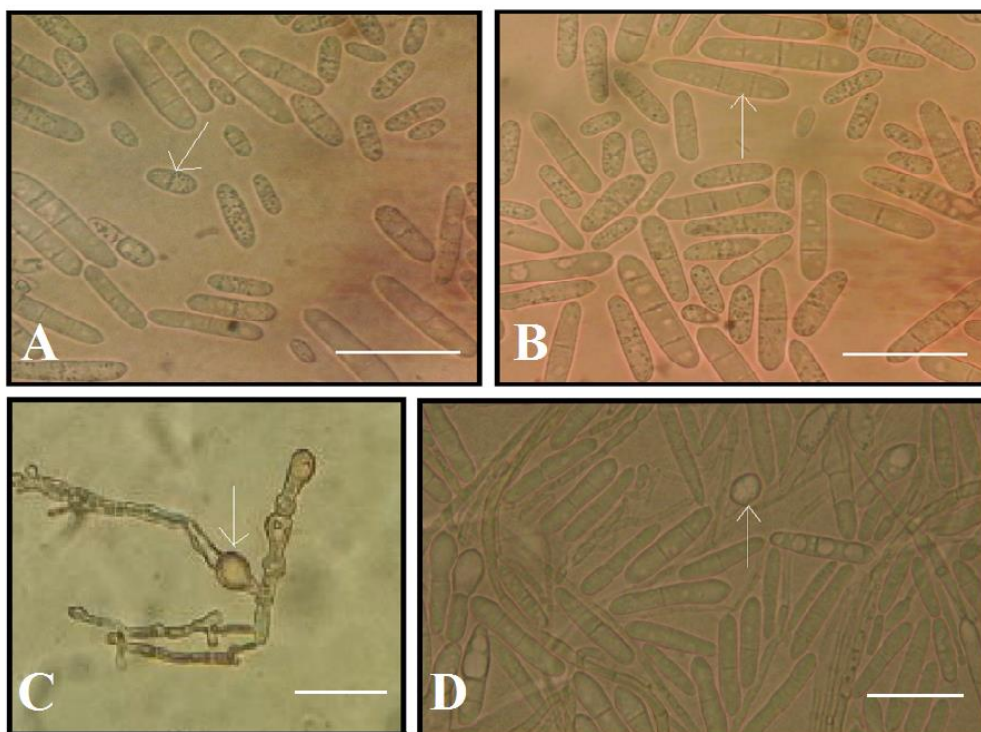


**Figura 6.** Aislamientos monospóricos de *Ilyonectria* sp. en PDA a los quince días de siembra

Las siete colonias presentaron tonalidades café-oscuras como base mezclado con pigmentos color miel. En cuanto a la textura se pudo observar micelio semiaéreo de aspecto flocoso en el centro (figura 6; A1 y A4) y en toda la colonia (figura 6; A7), mientras los otros cultivos (figura 6; A2, A3, A5 y A6) presentaron un micelio ralo de manera uniforme en toda la colonia. El crecimiento fue radial y uniforme en todos los aislados. Además el agar se llegó a pigmentar de color chocolate.

De todos los aislamientos se pudo visualizar tanto macroconidias, microconidias y clamidosporas. Las macroconidias y microconidias eran hialinas, cilíndricas,

elipsoides, rectas o curvas con los extremos redondeados, presentando de uno a tres septos en el caso de las macroconidias y de cero a un septo en las microconidias (figura 7; A y B). También se vio clamidosporas globosas y hialinas, formándose dentro de las células de macroconidias (figura 7; D) y de color marrón con paredes gruesas formando parte del micelio (figura 7; C).



**Figura 7.** Estructuras reproductoras de *Ilyonectria* sp.

Nota: A) Microconidia. B) Macroconidias. C) Clamidosporas en micelio. D) clamidospora en macroconidias, barra representa: 30  $\mu\text{m}$

Las macroconidias fueron las estructuras que se presentaron en mayor cantidad en cada una de las colonias crecidas en PDA. El ancho y largo de las mismas fueron medidas en el programa Axio visión LE, y se obtuvieron longitudes que varían de 27.71 a 30.48  $\mu\text{m}$  de largo y 5.73 a 7.31  $\mu\text{m}$  como se describe en la tabla 3

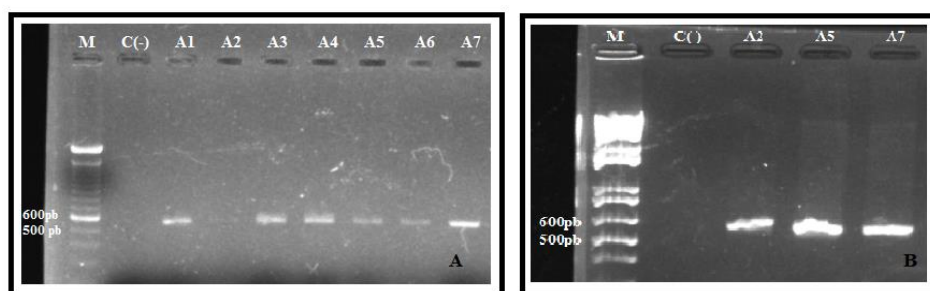
**Tabla 3**

Tamaño de macroconidias de aislamientos de *Ilyonectria* sp.

Aislamiento	Largo ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )
A1	30.20(26.85-34.85)	7.31(6.17-7.96)
A2	29.77(26.39-34.79)	6.32(5.56-7.37)
A3	30.48(26.98-35.02)	6.35(5.13-7.76)
A4	29.22(25.66-32.61)	6.21(5.16-7.40)
A5	28.55(26.08-31.34)	6.56(5.33-7.37)
A6	29.79(26.43-33.53)	5.73(5.08-6.90)
A7	27.71(24.58-33.83)	6.15(5.14-7.37)

### 3.2 Identificación molecular

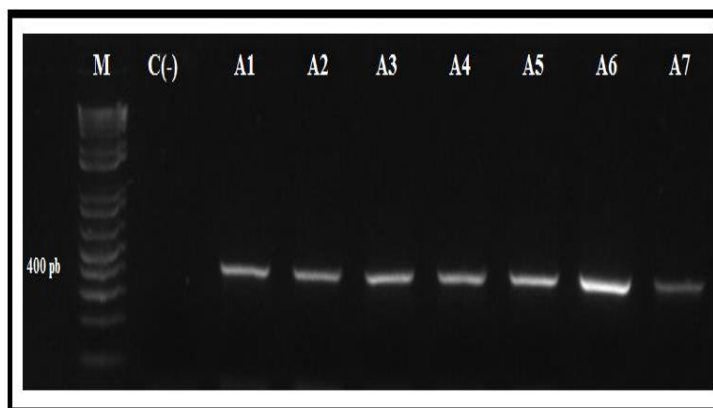
Los productos obtenidos con el par de primers ITS1/ ITS4 dieron un amplicón de 550 pb en todas las muestras excepto en A2 (figura 8;A) donde no se obtuvo ADN de buena calidad por lo que se repitió la extracción. Al igual que en las otras muestras se obtuvo un amplicón de 550 pb para el aislamiento A2 (figura 8;B). Con estos primers se pudo validar la cantidad y calidad de ADN presente en las 7 muestras.



**Figura 8.** Amplificación de 7 aislamientos pertenecientes a *Ilyonectria* sp. (A1- A7) con el par de cebadores ITS1/ITS4; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 100 bp ADN Ladder)

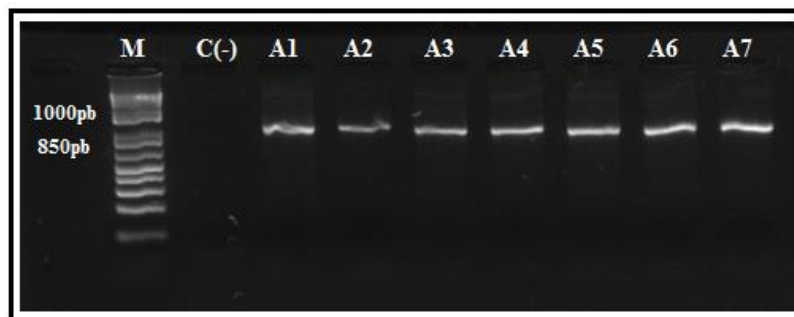
Nota: A) Amplificación de los aislamientos A1, A3, A4, A5, A6 y A7, B) Amplificación de A2 con los controles positivos A5 Y A7

Los productos obtenidos con el par de primers Dest 1/ Dest 4 dieron un amplicón de 400 pb en todas las muestras (figura 9), es decir, que los siete aislamientos analizados pertenecen al género *Ilyonectria*.

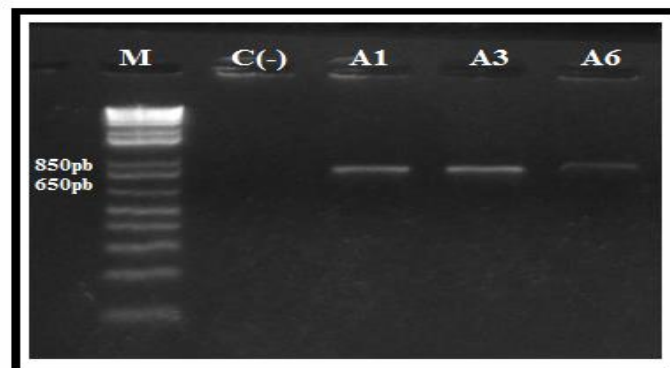


**Figura 9.** Amplificación de 7 aislamientos pertenecientes a *Ilyonectria* sp. (A1- A7) con el par de cebadores Dest1/Dest4; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 1 kb plus ladder)

También se amplificó el fragmento del factor de elongación 1 alfa con los dos pares de primers Ef1 $\alpha$ -983/Ef1 $\alpha$ -2218R y Ef1/Ef2. El producto PCR para el primer par de primers dio un amplicon de 850 a 1000 pb para las siete muestras (figura 10), mientras que para el segundo par de primer el amplicón estuvo entre 650 y 850 pb de tres aislamientos A1, A3, A6 (figura 11).



**Figura 10.** Amplificación de 7 aislamientos pertenecientes a *Ilyonectria* sp. (A1- A7) con el par de cebadores Ef1 $\alpha$ -983/Ef1 $\alpha$ -2218R; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 1 kb plus ladder)



**Figura 11.** Amplificación de 3 aislamientos pertenecientes a *Ilyonectria* sp. (A1, A3 y A7) con el par de cebadores Ef1/Ef2; control negativo (C(-)) y marcador molecular (M: 1 kb plus ladder)

Del aislamiento A6 se envió a secuenciar el fragmento de ADN obtenido con los primers ITS1/ITS4 y se identificó que este pertenecía al género *Ilyonectria*, sin embargo este par de cebadores no lograron discriminar entre las especies *I. macrodidyma*, *I. torresensis* e *I. destructans* (tabla 4) por lo que no se logró identificar a una sola especie de *Ilyonectria*.

**Tabla 4**

Porcentaje de cobertura e identidad de la muestra A6 mediante Blast-nucleotide en NCBI de la región ITS-5,8S

Género	Query cover	Ident	Número de accesoión
<i>Ilyonectria</i> sp.	100%	99%	KT264484
<b>Especies</b>			
<i>I. macrodidyma</i>	100%	99%	HQ703420
<i>I. torresensis</i>	100%	99%	JX231152
<i>I. destructans</i>	99%	99%	KT722597

De los siete aislamientos A1-A7 se envió a secuenciar el fragmento de ADN obtenido con los primers Ef1 $\alpha$ -983/Ef1 $\alpha$ -2218R y se creó una secuencia consenso la

cual no tuvo similitud con ninguna de las secuencias de las especies *Ilyonectria* sp. que se encuentran en la base de datos GenBank (tabla 5).

**Tabla 5**

Porcentaje de cobertura e identidad de la muestra A6 mediante Blast-nucleotide en NCBI de la región TEF

Especies	Query cover	Ident	Número de accesión
<i>Fusarium euwallaceae</i>	99%	95%	KU171722
<i>Nectria haematococca</i>	99%	95%	XM_003053163
<i>F. solani</i>	96%	95%	KT722597

Del aislamiento A1, A3 y A6 se envió a secuenciar el fragmento de ADN obtenido con los primer Ef1/Ef2 y se identificó que las tres muestras correspondían a la especie *I. torresensis* con un 100% de identidad (tabla 6).

**Tabla 6.**

Porcentaje de cobertura e identidad de la muestra A6 mediante Blast-nucleotide en NCBI de la región TEF

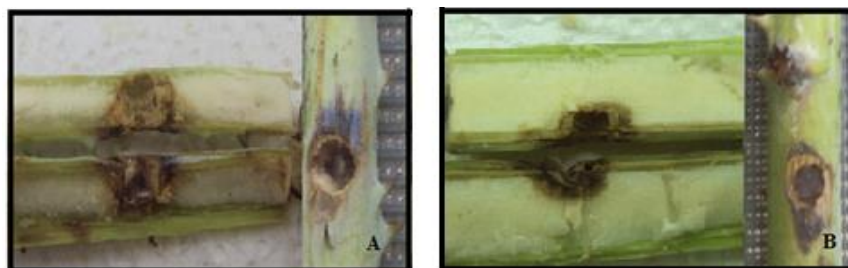
Especie	Query cover	Ident	Número de accesión
<i>I. torresensis</i>	98%	100%	KF511995
<i>I. macrodidyma</i>	98%	99%	KF511990
<i>I. Radicicola</i>	88%	83%	JF735695

Las secuencias obtenidas fueron depositadas en GenBank con número de accesión KY114516 para la región ITS y con número de accesión KY114517 para región TEF. Para esta última región se ligaron los dos fragmentos obtenidos con los dos pares de primers Ef1 $\alpha$ -983/Ef1 $\alpha$ -2218R y Ef1/Ef2



### 3.3 Evaluación de la virulencia de los aislados

En los tallos de mora inoculados con *I. torresensis* se pudo observar una lesión de color marrón alrededor del sitio donde se depositó el micelio del hongo (Figura 12), la cual fue medida para evaluar la patogenicidad de cada aislamiento.



**Figura 12.** Necrosis en tallos de *R. glaucus* transcurrido un mes después de la inoculación con *I. torresensis*.

El análisis de varianza (tabla 7) indicó que el tamaño de la lesión en los tallos de mora de castilla no presentaron diferencias significativas entre los aislamientos ( $P=0.5109$ ).

**Tabla 7**

Análisis de varianza (ANOVA) del tamaño de la lesión producido por aislamientos de *I. torresensis* en tallos de *R. glaucus*

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
<b>Modelo.</b>	3.59	6	0.60	0.90	0.5109
<b>Aislamiento</b>	3.59	6	0.60	0.90	0.5109
<b>Error</b>	13.90	21	0.66		

Sin embargo en la prueba de medias de LDS-Fisher (tabla 8), se pudo ver que el tamaño de lesión presentó una diferencia significativa mínima entre los aislamientos A6 y A7, siendo A6 el que causa un tamaño de lesión mayor que los otros aislamientos con una media de 3.38 cm, mientras que A7 es el que menor tamaño de lesión causó, con

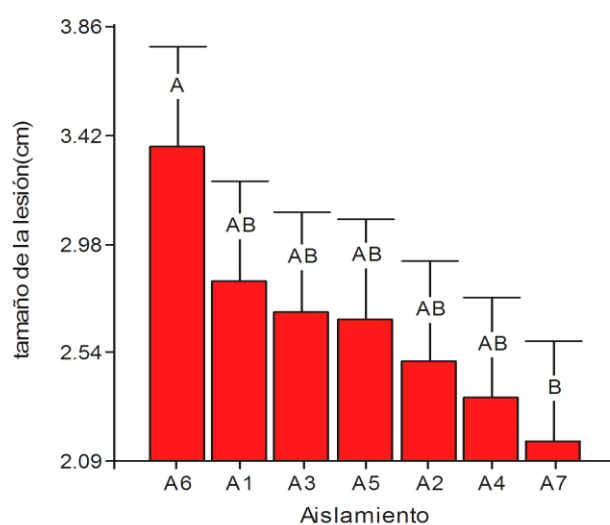
valor promedio de 2.18 cm. Por otro lado el tamaño de la lesión no es significativamente diferente entre los aislamientos A5, A3, A1, A2 y A4 como se muestra en la figura 13

### Tabla 8

Prueba de medias de LSD- Fisher para el tamaño de la lesión provocado por aislamientos de *I. torresensis* en tallos de mora, Error: 0.6619, gl: 21

Aislamiento	Tamaño de la lesión (cm)
A6	3.38 <sup>a</sup>
A1	2.83AB
A3	2.70AB
A5	2.68AB
A2	2.50AB
A4	2.35AB
A7	2.18B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 13.** Valor medio del tamaño de la lesión producida por los aislamientos *I. torresensis* (A1-A7) en tallos de mora de castilla (*R. Glaucus*)

### 3.4 Evaluación de métodos de inoculación

Después de tres meses y medio de la inoculación en las plantas de mora de castilla en un invernadero cuya temperatura promedio fue 15.7°C y una HR de 62%, se evaluaron los síntomas tanto de la parte aérea como del cuello y la raíz, para de esta manera analizar como intervinieron los métodos de inoculación y el tratamiento de raíz en la incidencia de la enfermedad, haciendo uso de la prueba estadística Chi- cuadrado Pearson.

#### 3.4.1 Evaluación de síntomas aéreos

Lo primero que se evaluó fue la parte aérea de las plantas inoculadas de las cuales en su mayoría se observó marchitez en las hojas basales al contrario de sus respectivos controles. Lo que se pudo visualizar fueron algunas hojas secas y otras tornándose cafés en los bordes o arqueándose hacia el haz (figura 14).



**Figura 14.** Síntomas aéreos en *R. glaucus* transcurridos tres meses y medio después de la inoculación con *I. torresensis*

Nota: A) Tratamiento control, B) Tratamiento con clamisodsporas, C) Tratamiento con micelio, D) Tratamiento con conidias.

Al realizar los análisis estadísticos se pudo ver que el porcentaje de incidencia de marchitez en las hojas basales está asociado con los métodos de inoculación cuando se toma en cuenta a sus respectivos controles ( $P=4.162e-06$ ). Por otro lado los resultados mostraron que el porcentaje de incidencia de marchitez no es significativamente diferente entre los tres métodos de inoculación planteados (tabla 9). Además en la figura

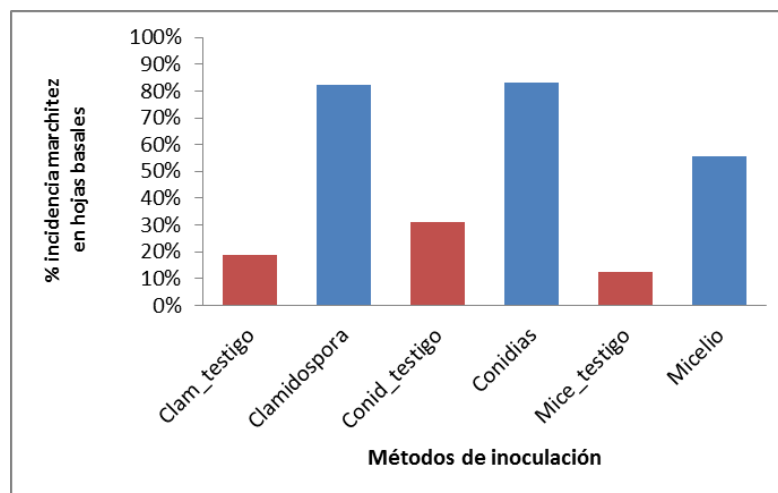
9 se puede ver que el método de inoculación que presento mayor porcentaje de incidencia de marchitez fue el de conidias con un 83,33% mientras que el de micelio genero un porcentaje de incidencia de marchitez menor con un 55.56%.

**Tabla 9**

Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de marchitez en las hojas basales en *R. glaucus*, entre los métodos de inoculación y sus controles

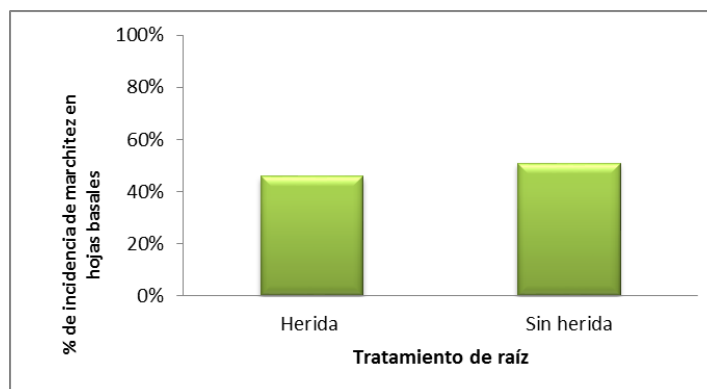
Métodos de Inoculación	% de incidencia Marchitez
Conidias	83.33A
Clamidospora	82.35A
Micelio	55.56AB
Conid_testigo	31.25 BC
Clam_testigo	18.75 BC
Mice_testigo	12.50 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p <= 0.05$ )



**Figura 15.** Porcentaje de incidencia de marchitez en hojas basales de *R. glaucus* entre los métodos de inoculación y sus respectivos testigos

En cuanto al tratamiento de raíz con herida y sin herida se pudo ver que este factor no está asociado a la marchitez de las hojas basales ( $P= 0.7629$ )



**Figura 16.** Porcentaje de incidencia de marchitez en hojas basales de *R. glaucus* entre los tratamientos de raíz con herida y sin herida.

También se pudo ver que existieron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de marchitez de hojas basales en los tratamientos resultantes de la interacción entre el método de inoculación y el tratamiento de raíz ( $P=0.0002$ ). En los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6 no se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de marchitez, sin embargo T3 y T4 tuvo un mayor porcentaje de incidencia mientras T2 presentó un menor porcentaje (Tabla 10).

**Tabla 10**

Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de marchitez en las hojas basales en *R. glaucus* cuando ocurre la interacción entre los métodos de inoculación y el tratamiento a la raíz

Tratamientos	% de incidencia de marchitez	
T3	88.80%	A
T4	88.80%	A
T6	77.70%	AB
T1	75%	AB

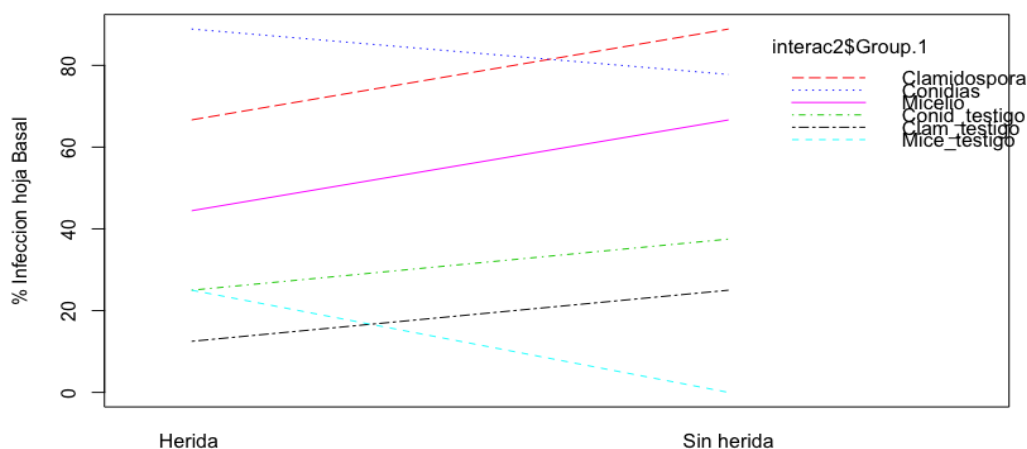
T5	66.60%	ABC
----	--------	-----

Continuar



<b>T2</b>	<b>44.00%</b>	<b>ABC</b>
<b>T12</b>	<b>37.50%</b>	<b>ABC</b>
<b>T10</b>	25%	BC
<b>T8</b>	25%	BC
<b>T9</b>	25%	BC
<b>T7</b>	12.50%	C
<b>T11</b>	0.00%	C

Los tratamientos T3 y T4 con un porcentaje de incidencia de marchitez del 88.8% se diferenciaron significativamente de sus controles T9 y T10 que presentaron un porcentaje del 25% en ambos casos. Por el contrario, los tratamientos T5 y T2 con un porcentaje de incidencia de marchitez del 66.6% y 44% respectivamente no se diferenciaron significativamente de sus controles T8 y T11 que presentaron un porcentaje del 25% y 0%. El tratamiento T6 con un porcentaje del 77,7 % de plantas con síntomas de marchitez no se diferenció significativamente de su control T12 con un 37.5% y finalmente el tratamiento T1 con un porcentaje de 75% se diferenció significativamente de su control T7 que presentó un 12.5% de incidencia de marchitez.



**Figura 17.** Porcentaje de incidencia de marchitez en hojas basales de *R. glaucus* cuando hay interacción entre los métodos de inoculación y tratamiento de raíz con sus respectivos controles

### 3.4.2 Evaluación de síntomas a nivel de raíz

La siguiente variable que se evaluó fue el síntoma en la raíz, del cual se observó ligeras lesiones de color marrón en el tejido vascular de las raíces primarias. Para poder realizar el análisis estadístico se re aisló el hongo que fue inoculado de las plantas que presentaron el síntoma.

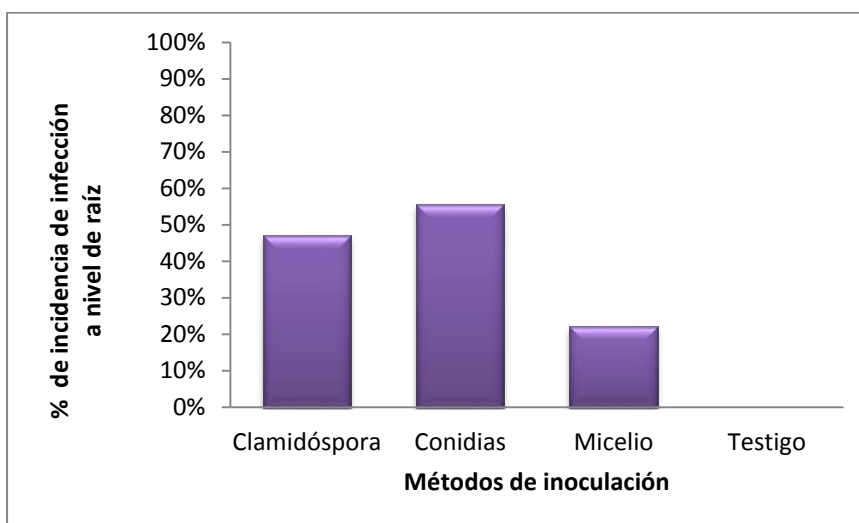
Como resultado se obtuvo que el reaislamiento de está relacionado con los métodos de inoculación tomando en cuenta a sus respectivos controles ( $P=6.523e-06$ ). Se pudo ver que no existieron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz producida por cada metodología de inoculación (tabla 11), sin embargo, se pudo ver que el método de conidias y clamidosporas con un porcentaje de incidencia del 56% y 47% respectivamente, fue significativamente diferente a los controles mientras que el método micelio con un 22% de incidencia de infección a nivel de raíz no lo fue (figura 18).

**Tabla 11**

Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en *R. glaucus* entre los métodos de inoculación

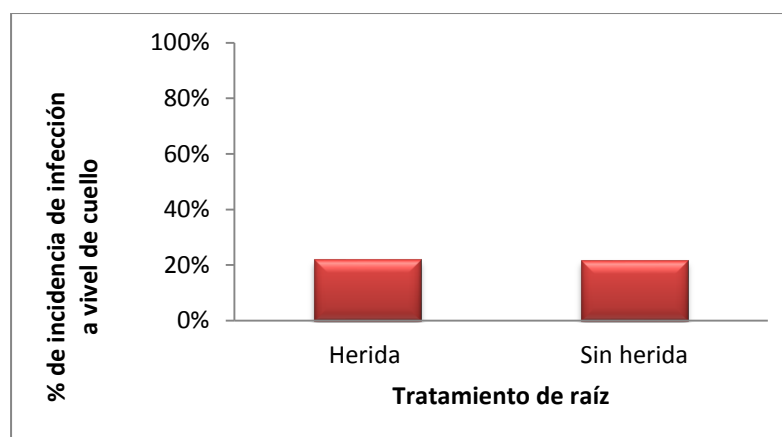
Métodos de inoculación	% incidencia infección raíz	Rango
Conidias	56.00%	A
Clamidosporas	47%	A
Micelio	22.20%	AB
Testigo	0.00%	B





**Figura 18.** Porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en *R. glaucus* entre los métodos de inoculación y respectivos testigos

En cuanto al factor de raíz con herida y sin herida se pudo ver que no existieron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz al aplicar estos tratamientos ( $P= 1$ )



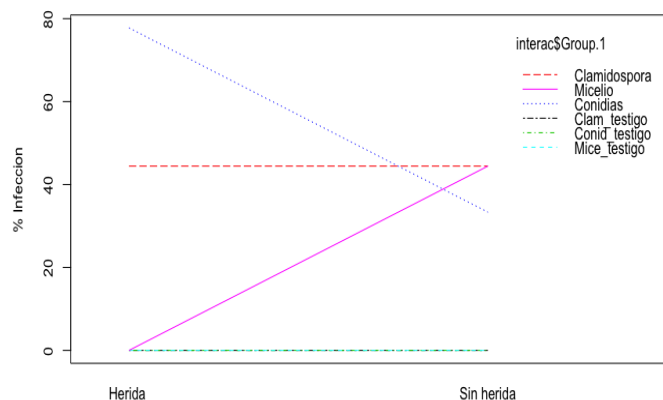
**Figura 19.** Porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en *R. glaucus* entre los tratamiento de raíz con herida y sin herida.

Por otro lado se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz entre los tratamientos descritos en la tabla 12 ( $P=1.434e-05$ ). Entre los tratamiento T3, T2 el porcentaje de incidencia de infección de *I. torresensis* en la raíz es significativamente distinto, con un 77% en caso del tratamiento T3 siendo este el mayor, mientras que en tratamiento T2 no presenta infección en la raíz. Además T3 es significativamente diferente a su control T9 donde no se presentó la infección. El porcentaje de incidencia de infección en la raíz entre los tratamientos T1, T4, T5, T6 y T2 y sus respectivos controles T7, T10, T11, T12, T8 no es significativamente diferente.

**Tabla 12**

Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel de raíz en *R. glaucus* entre la interacción de métodos de inoculación y el tratamiento a la raíz.

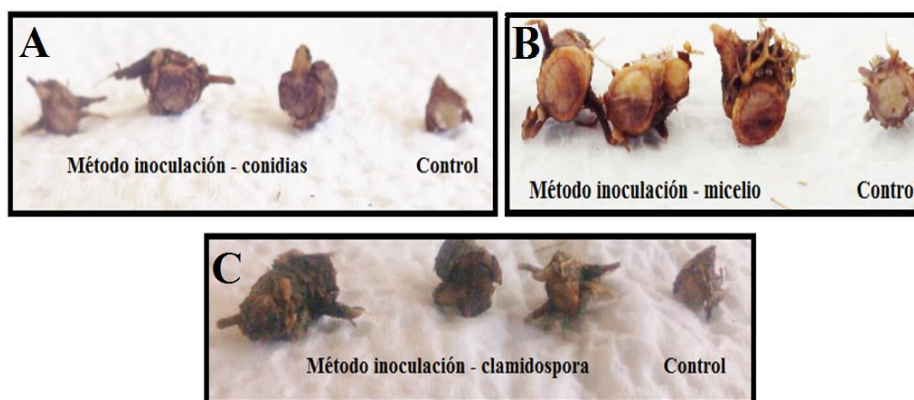
Tratamientos	%incidencia de infección raíz	
T3	77%	A
T1	50%	AB
T4	44%	AB
T5	44%	AB
T6	33%	AB
T2	0.00%	B
T7-T12	0.00%	B



**Figura 20.** Porcentaje de incidencia en la infección a nivel de raíz cuando hay interacción entre los métodos de inoculación y tratamiento de raíz con sus respectivos controles

### 3.4.3 Evaluación de síntomas a nivel de cuello

La última variable que se evaluó fue la sintomatología a nivel de cuello (Figura 21), donde se observó lesiones en tonalidades cafés en algunas partes del tejido vascular las cuales contrastaban con el color claro amarillento del tejido sano.



**Figura 21.** Sintomatología en el cuello de *R. glaucus* transcurrido tres meses y medio de su inoculación con *I. torresensis*.

Nota: A) cuellos de mora infectado por medio del método de inoculación con conidias y su respectivo control B) cuellos de mora infectado por medio del método de inoculación micelio y su respectivo control.

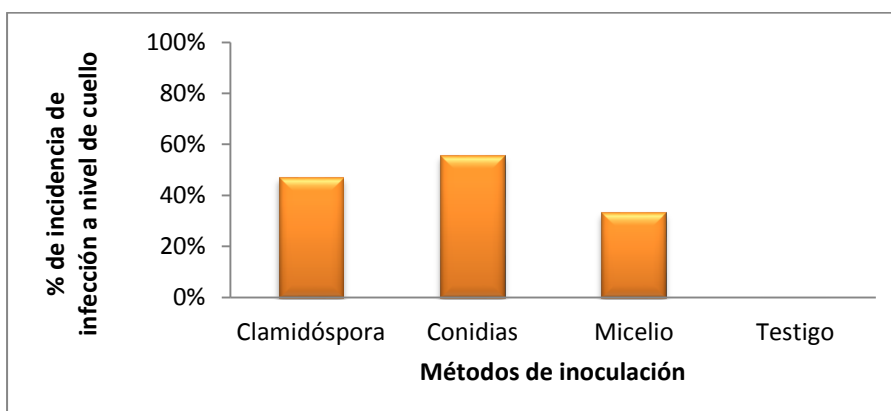
C) cuellos de mora infectado por medio del método de inoculación con clamidospora y su respectivo control.

De igual manera que en la raíz, se realizó el hongo del cuello en plantas que presentaron la sintomatología para el respectivo análisis estadístico. Como resultado del mismo se obtuvo que el porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello está relacionado con los métodos de inoculación tomando en cuenta a sus respectivos controles ( $P=9.335e-06$ ). Se pudo ver también que no existieron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello entre las metodologías de inoculación (tabla 13), siendo el método de inoculación de conidias el que presentó mayor porcentaje de incidencia con un 56%. Por otro lado cada una de las metodologías presentó diferencias significativas con sus respectivos controles (figura 22)

**Tabla 13**

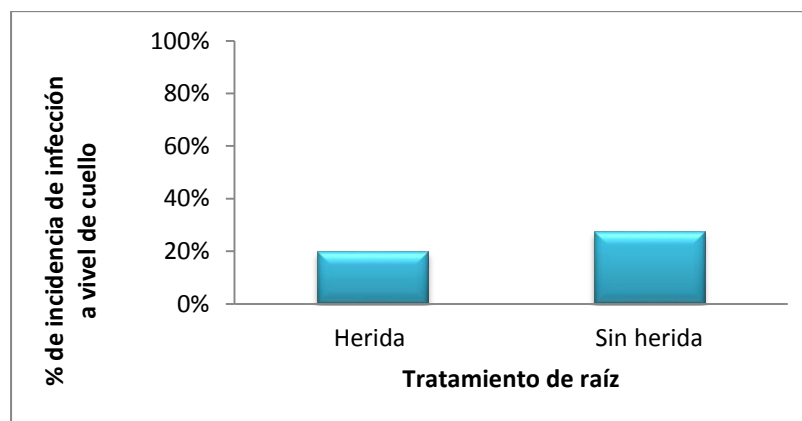
Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel cuello en *R. glaucus* entre los métodos de inoculación.

Métodos de inoculación	% de incidencia de infección en cuello	
Conidias	56.00%	A
Clamidosporas	47%	A
Micelio	33.30%	A
Testigo	0.00%	B



**Figura 22.** Porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello en *R. glaucus* entre los métodos de inoculación y sus respectivos testigos

En el factor de raíz con herida y sin herida se pudo ver que no existió diferencia significativa en el porcentaje de incidencia de infección en el cuello ( $P= 0.3791$ ).



**Figura 23.** Porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello en *R. glaucus* entre los tratamiento de raíz con herida y sin herida.

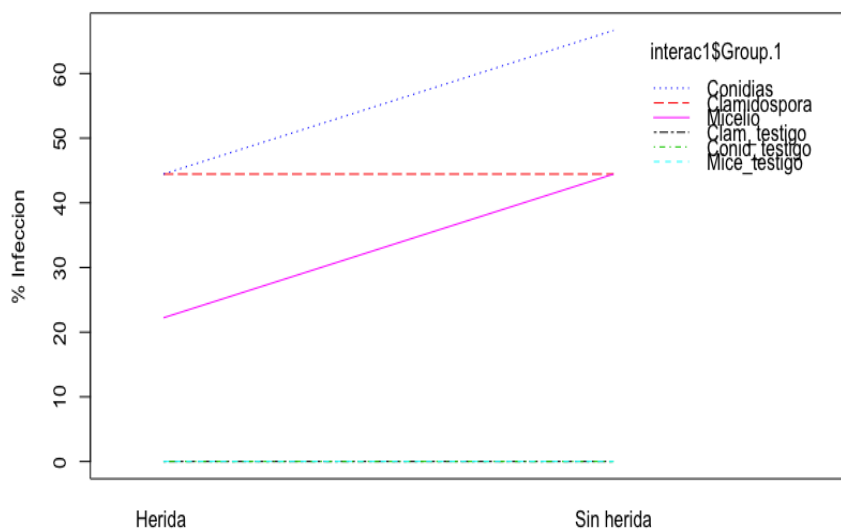
Por otro lado se presentaron diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello entre los tratamientos descritos en la tabla 14 ( $P= 0.0004$ ). El tratamiento T6 no se diferenció significativamente del resto de los tratamientos T1, T5, T4, T3, T2, sin embargo, si de su control T12. Los tratamientos

T1,T5,T4,T3,T2 no se diferencian significativamente de sus controles T7,T11,T10,T9 y T8 respectivamente. El tratamiento T6 tuvo un porcentaje de incidencia de infección en el cuello del 67.7% superior al resto de tratamientos, mientras que T2 presento un porcentaje de incidencia del 22.2% siendo inferior al resto de tratamientos (Tabla 14).

**Tabla 14.**

Prueba de Chi- cuadrado Pearson para el porcentaje de incidencia de infección a nivel de cuello en *R. glaucus* cuando ocurre la interacción entre los métodos de inoculación y el tratamiento a la raíz.

Tratamientos	% de incidencia infección en cuello	
T6	66.70%	A
T1	50.00%	AB
T5	44.00%	AB
T4	44.00%	AB
T3	44.00%	AB
T2	22.20%	AB
T7-T12	0.00%	B



**Figura 24.** Porcentaje de incidencia en la infección a nivel de cuello cuando hay interacción entre los métodos de inoculación y tratamiento de raíz con sus respectivos controles.

## CAPÍTULO IV

### DISCUSIÓN

En este estudio se llevó a cabo la identificación morfológica de 7 aislamientos monosporicos previamente aislados de plantas de mora de castilla (*R. glaucus*) con sintomatología de marchitez. De acuerdo a la literatura (Barnett & Hunter, 1999; Chaverri et al., 2011; Samuels & Brayford, 1990), la textura y el color de estas colonias, así como la forma y el tamaño de los conidios concordaban con las especies del género *Ilyonectria* sp.

Basándose en un estudio anterior realizado por Cedeño, et al (2004), en el cual se identificó a *Cylindrocarpon destructans* var *destructans* (telemorfo *I. radícicola*) como el agente causal del pie negro en *R. glaucus*, enfermedad relacionada con la marchitez, se utilizaron los primers Dest1/Dest4 diseñados por Hamelin, et al. (1996) específicamente para la identificación de la especie *C. destructans* de raíces y cuello de plantas de vivero de coníferas, para corroborar que los aislamientos de este estudio también pertenezcan a esta especie. Los siete aislamientos amplificaron un fragmento de 400 pb, lo cual concuerdan con los resultados obtenidos por Martínez (2014), donde se identificó a *C. destructans* como uno de los hongos fitopatógenos causantes de la marchitez en mora de castilla.

Sin embargo en estudios realizados por Alanis (2008) y Probst (2011) se encontró que estos pares de primers amplificaron inespecíficamente secuencias internas de la región ITS de las especies *C. liriodendri* y *C. macrodidymum*. Teniendo en cuenta estas referencias, de que los cebadores Dest1/Dest4 no eran específicos para la especie *C. destructans*, se enviaron a secuenciar fragmentos de ADN de la región ITS 5,8S, donde se identificó el género al que pertenecían la muestra, el cual fue *Ilyonectria* sp. con un 99% de identidad confirmando los resultados obtenidos en la parte morfológica, sin embargo, no se pudo discriminar entre las especies *I. macrodidyma*, *I. torresensis* y *I. destructans* que presentaron un 99% de identidad en los tres casos. Con estos resultado



se concluye que el fragmento 5.8S-ITS no permite identificar de manera específica a las especies de género *Ilyonectria* sp.

También se amplificó un fragmento de la región TEF con el par de primers EF1-983F/EF1-2218R obteniéndose secuencias similares a las del complejo de especies de *Fusarium solani* (tabla 5). Estos resultados no concuerdan con la secuenciación de la región ITS donde se identificó al género *Ilyonectria*, tampoco concuerda con los resultados obtenidos con los primers Dest1 y Dest4, ya que en este estudio todos los aislamientos fueron amplificados con este par de cebadores y según Martínez (2014) estos no amplifican secuencias de ADN pertenecientes a *Fusarium* sp. Otro aspecto que no se relaciona a este resultado es la morfología, ya que las características como la velocidad de crecimiento, la forma de las conidias y el número de septos que puede llegar hasta 5, el color de las colonias que puede ir de tonalidades blancas, verdes, azules, grises y purpuras; y la abundante producción de clamidosporas de las especies *F. solani*, se diferencian de los aislamientos analizados en este estudio (Chehri et al, 2015; Freeman et al., 2013; Hafizi et al, 2013).

El motivo por el cual no se pudo identificar a las especies de *Ilyonectria* sp. con estas secuencias puede ser porque en la base de datos del GenkBank no se ha ingresado hasta el momento una secuencia de *Ilyonectria* sp. que haya sido amplificada con los primers EF1-983F/EF1-2218R, por lo que no se recomienda el uso de estos primers para la identificación de especies del género *Ilyonectria*.

Para descartar los resultados de la anterior secuenciación se amplificó otra región de TEF con los primers EF1/EF2, fragmento que ha sido utilizado en anteriores estudios para identificar tanto especies del complejo *F. solani* (Chehri et al., 2015) como especies de *Ilyonectria* sp. (Cabral et al., 2011; Cabral et al, 2012). De esta manera, en la secuenciación de este otro fragmento de TEF se obtuvo como resultado que los aislamientos de este estudio pertenecían a la especie *I. torresensis* con un 100% de identidad y ya no hubo similitud con las secuencias de las especies del complejo *F. solani*, es decir, que esta otra región de TEF si puede ser utilizada para identificar especies correspondientes al género *Ilyonectria*.

Estos resultados de secuenciación con ambas regiones ITS y TEF sugieren que los aislamientos obtenidos de plantas de mora con sintomatología de marchitez pertenecen a *I. torresensis*, además de que las características morfológicas concuerdan con los anamorfos de esta especie que se describen en la literatura (Cabral, et al., 2011).

Cabe mencionar que en estudios realizados por Cabral, et al, 2011, se analizaron las secuencias  $\beta$ - tubulina (TUB), histona 3 (HIS) , ITS y TEF (las dos últimas analizadas en el presente estudio) de aislados identificados erróneamente como *I. macrodidyma*, con las cuales se logró detectar niveles de polimorfismos que permitieron reconocer cuatro nuevas especies entre las cuales se identificó por primera vez a *I. torresensis*. Solo se pudieron reconocer cuatro polimorfismos únicos para *I. torresensis* en TEF en las posiciones 137, 441, 450, 521 pb y en HIS en las posiciones 111, 216, 280 y 297 pb que diferencian a esta especie de las otras del complejo *I. macrodidyma*. Por el contrario las secuencias ITS y TUB fueron inefectivas para distinguir polimorfismos entre estas especies. Con estos datos se puede decir que solo el análisis de las secuencias TEF, que también se utilizaron en el presente estudio y el análisis de la región HIS son eficaces para la identificación de *I. torresensis*.

Sin embargo, el análisis molecular no coincide con el trabajo realizado por Cedeño, et al, (2004), anteriormente mencionado. Esto puede deberse a que las especies de *Cylindrocarpon* que causan el pie negro, entre ellas *C. destructans*, fueron renombradas por miembros del género *Ilyonectria* (Chaverri, et al., 2011). Por otro lado *I. torresensis* es una especie monofilética del complejo *I. macrodidyma* (Cabral, et al., 2012) y esta a su vez de *I. radicolata* (Chaverri, et al., 2011), y al tener entre si una relación de parentesco muy cercana, es muy probable que haya errores al momento de querer identificarlas solo morfológicamente como ocurrió en el trabajo de Cedeño, et al., (2004), ya que las características de las colonias y conidios pueden ser bastante similares.

Además, Samuel y Bradford (1990), mencionaron que las cepas de *C. destructans* se podrían diferenciar en más de un taxón, debido a que estas presentan una gran variabilidad en la morfología de las colonias y sus conidios dependiendo de las

fuentes y localidades donde se encuentren, y esto concuerda con los estudios de Chaverri, et al. (2011), donde sugirieron que *C. destructans* comprenden un complejo de especies.

Debido a que la variabilidad de los rasgos morfológicos de *C. destructans* es difícil de interpretar, pues estos tienden a ser plásticos (Samuel y Bradford, 1990), es necesario el uso de técnicas moleculares que permitan identificar polimorfismos que no pueden ser detectados morfológicamente entre especies del mismo género. La identificación morfológica no es fiable a nivel de especie, sin embargo, las características morfológicas como el color, textura, densidad y zonación de una colonia, así como el tamaño, la forma y número de septos que estas producen en PDA, pueden ser utilizadas para la descripción taxonómica de una especie (Herder, 2014).

En cuanto a la patogenicidad de los aislamientos se pudo observar que los tallos inoculados presentaron una pigmentación café en el sitio de la lesión, tal como se cita en la literatura (Arévalo et al., 2011) donde se observa la misma coloración en la parte leñosa de los tallos de las plantas que presentaban la enfermedad de pie negro.

Dentro del ciclo de vida infectivo de los patógenos se presentan rasgos cuantitativos que pueden ser utilizados para medir la agresividad o virulencia de los mismos. Entre estos rasgos cuantitativos esta la eficacia de la infección y el tamaño de la lesión. En este estudio, todos los aislados infectaron los tallos de mora de castilla en ausencia de interacciones competitivas, infección que se evidenció con la presencia de lesiones en los tallos inoculados (Pariaud et al., 2009).

Sin embargo, los únicos aislamiento que presentaron diferencias significativas mínimas en el tamaño de la lesión fueron A6 Y A7, siendo A6 el que posee mayor tamaño de la lesión con respecto A7, es decir que el área superficial donde se producen las esporas es mayor (Pariaud et al., 2009) lo que indica que A6 es más agresivo que el resto de los aislados, y por ende el grado de virulencia también es superior.

A pesar que el aislamiento A6 fue el que causó un tamaño de lesión mayor al resto de los aislamientos, este provocó un porcentaje de incidencia de la enfermedad

menor al 88% tomando en cuenta los síntomas en la parte aérea, raíz y cuello y las respectivas interacciones entre los factores de estudio. Según (Song et al., 2014) en plantas de ginseng los aislamientos de *C. destructans* que presentaron este porcentaje, se reportaron como aislados menos virulentos, los cuales provocaron pudrición de raíz solo en algunas partes de la planta y un crecimiento normal de ginseng, como se observó también en las plantas de mora. Sin embargo, en este estudio se pudo observar también síntomas en el cuello y marchitez de hojas basales que se diferencian significativamente de sus controles.

Todos los métodos de inoculación implementados con *I. torresensis* sin tomar en cuenta al tratamiento de raíz, fueron capaces de inducir la enfermedad del pie negro en *R. glaucus* produciéndose síntomas tanto aéreos como de la parte radicular, esto concuerda con el estudio realizado por Probst, 2011 donde estos mismos métodos generaron la enfermedad de pie negro en plantas de Vid con inóculos de *C. macrodidyma*, *C. destructans* y *C. liriodendri* especies pertenecientes al género *Ilyonectria* (Chaverri et al., 2011).

Por otro lado al tomar en cuenta los tratamientos de raíz sin los métodos de inoculación se pudo ver que el porcentaje de incidencia de la enfermedad fue igual en ambos tratamientos, por lo cual no sería necesario generar una herida artificial en la raíz para producir la enfermedad, ya que se pueden producir heridas naturales causadas por la aparición de raíces secundarias o la abrasión de partículas del suelo, que permiten la infección del patógeno en la planta (Horsfall & Dimond, 1960; Scheck et al., 1998).

Sin embargo, al haber una interacción entre los métodos de inoculación y el tratamiento de raíz se pudo ver que el porcentaje de incidencia de la enfermedad fue mayor al que se produjo de forma individual por cada factor de estudio, siendo el mejor tratamiento el método de inoculación con conidias y herida en la raíz (marchitez y infección en la raíz) y sin herida de raíz (infección en el cuello). Esto puede deberse a que las conidias estuvieron en contacto directo con la raíz a una concentración de  $10^6$  conidias/mL, además se reinoculó en el suelo con una concentración igual de

conidias, lo cual asegura la infección y posterior manifestación de los síntomas ( Alaniz, 2008).

Hay que tener en cuenta que los inóculos con conidios y micelio son inóculos primarios que pueden disminuir en el suelo debido a una rápida germinación de estos a clamidosporas y a la lisis causada por la actividad bacteriana (Matturi & Stenton, 1964). Esto concuerda con el bajo porcentaje de incidencia de la enfermedad provocado por la metodología de inoculación con micelio en el sustrato que estaba previamente esterilizado donde el micelio dos semanas después de la inoculación llega a tener una actividad máxima descomponiendo materia orgánica, sin embargo después de dos meses las hifas tienen a desaparecer y pueden encontrarse en la superficie del suelo como clamidosporas (Taylor, 1964). Estas clamidosporas pueden permanecer en estado latente en el suelo hasta que las condiciones ambientales y la presencia de un huésped adecuado permiten su germinación (Probst, 2011).

*Ilyonectria* y sus anamorfos son comunes en el suelo y rizosfera, además son agentes causales de la pudrición de raíz o enfermedad del Pie negro (Chaverri et al., 2011). La patogenicidad de estos microorganismos está relacionada con factores que pueden inducir un estrés en la planta o favorecer las condiciones para su desarrollo (Brayford, 1991; Horsfall & Dimond, 1960). Entre los factores se encuentra las variantes de la temperatura, la disponibilidad de agua y tipo de suelo. La circulación del agua se ve afectada por la capacidad de retención que esta tiene con cada tipo de suelo. El exceso de agua en los suelos (tipo arcillosos), provocan una deficiencia de oxígeno que induce a las plantas a estrés, ya que se puede producir una asfixia radicular facilitando la infección del patógeno (Beyer-Ericson, et al., 1991; Galet, 1996; Unestam, et al., 1989; Unestam & Stenström, 1989). Por otro lado los bajos niveles de oxígeno y la humedad, proporcionados por el exceso de agua en el suelo, los cuales fueron proporcionados a las plantas inoculadas con *I. torresensis* en este estudios, permitieron el crecimiento y desarrollo rápido del hongo, y de esta manera generar la enfermedad (Galet, 2000; Ludeking & Relab den Haan, 2002 citado por Cedeño et al, 2004).

En cuanto a la temperatura esta puede intervenir en el crecimiento y potencial reproductivo del micelio, conidias y clamidosporas del complejo de especies de *I. macrodidyma* (Agustí-Brisach & Armengol, 2012) grupo en el cual se encuentra inmerso *I. torresensis*, especie con la que se implementó los métodos de inoculación en este estudio. Estos hongos son capaces de crecer en un rango de temperaturas de 5 a 30°C, siendo la temperatura 20 a 25 ° C óptima para su crecimiento, pero no crecen a 35°C, es decir, son mesófilos. (Agustí-Brisach & Armengol, 2012; S Alaniz et al., 2007; Halleen et al., 2004). Por otro lado a temperaturas más bajas entre 5 y 10°C, la producción de conidios y el crecimiento micelial es menor (Agustí-Brisach & Armengol, 2012; S Alaniz et al., 2007). En cuanto a la producción de clamidosporas estas se pueden observar en PDA a temperaturas entre 15 to 30°C, mientras que a 5 o 10°C no (Agustí-Brisach & Armengol, 2012)

Otro factor que hay que tener en cuenta para que se desarrolle la enfermedad es la edad de la raíz, que es donde se va a dar la infección. En este estudio las plántulas de mora inoculadas con *I. torresensis* tenían alrededor de un año de edad y se pudo ver que la frecuencia de infección a nivel de raíz fue bajo, tal como ocurre en raíces de Ginseng de un año de edad inoculadas con *C. destructans*. Sin embargo, al analizar la severidad de la enfermedad en las raíces de ginseng infectadas, se observó que estas tendían a pudrirse rápidamente (Rahman & Punja, 2005), situación que también podría ocurrir en las raíces de plantas de mora de castilla infectadas con *I. torresensis*.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES

- El agente causal de la enfermedad de pie negro, relacionado con el síntoma de marchitez en mora de Castilla ( *R. glaucus* ) fue identificado como *I. torresensis* mediante la secuenciación de la región TEF que dio 100% de identidad para esta especie, además de que las características morfológicas de colonia y conidias se correlacionaron con las del género *Ilyonectria*.
- *C. destructans* var. *destructans* identificado en anteriores estudios como el causante de la enfermedad de pie negro que está relacionada con la marchitez en plantas de mora de Castilla, es una especie de la que se derivan otras especies monofileticas entre las cuales se encuentra *I. torresensis*
- El par de cebadores Dest1/Dest4, no fueron específicos para la identificación de *C. destructans* ya que amplificaron otras especies del género *Ilyonectria*.
- El par de primers ITS1/ITS4 ayudo a corroborar que los aislamientos pertenecían al género *Ilyonectria* con un 99% de identidad, sin embargo no fueron efectivos para la identificación específica de *Ilyonectria*.
- La secuencia obtenida con los cebadores EF1-983F y EF1-2218R no permiten identificar hongos del género *Ilyonectria*.
- El tamaño de lesión en tallos de mora de castilla (*R. glaucus*) generado por el aislamiento A6 fue mayor al compararlo con los seis aislamientos restantes, determinado que este era el más virulento, por lo cual se utilizó el mismo para realizar las pruebas de patogenicidad.
- Los tres métodos de inoculación utilizados causaron los síntomas tanto de marchitez como necrosis en las raíces y cuello en las plántulas de mora de castilla, sin embargo, el porcentaje de incidencia de los tres síntomas fue bajo. El método de conidias fue el que causo mayor porcentaje de incidencia de los tres síntomas en comparación con el resto de los tratamientos, se puede considerar que este método es más eficiente para reproducir la enfermedad.

- El porcentaje de incidencia de marchitez, infección en cuello y raíz en las plántulas de mora fue bajo y similar en ambos tratamientos con herida de raíz y sin herida de raíz, por lo cual se puede considerar que la enfermedad puede generarse con plantas que presenten, o no, herida en la raíz.
- Al haber la interacción entre los métodos de inoculación y el tratamiento de raíz el porcentaje de incidencia de marchitez, infección de cuello e infección de raíz fue superior que al usar estos dos factores de estudio por separado, siendo el mejor tratamiento el de conidios con herida, es decir que la herida en la raíz contribuye a que el método de inoculación con conidias sea más eficiente.
- El método de inoculación con conidios puede ser implementado en programas de fitomejoramiento que ayuden a crear nuevos genotipos para el control de la enfermedad de marchitez en plantas de mora de castilla (*R. glaucus*)



## CAPÍTULO VI

### RECOMENDACIONES

- Se puede diseñar un primer específico para identificar a la especie *I. torresensis* amplificando las regiones HIS o TEF que es en donde se observa la mayor cantidad de polimorfismos entre las especies del complejo *I. macrodidyma*.
- Identificar los genes que estén relacionados con la virulencia de *I. torresensis* mediante técnicas moleculares de ISSRs junto con pruebas de patogenicidad.
- Aislar cepas más virulentas de *I. torresensis* que aumenten el porcentaje de incidencia de la enfermedad de pie negro.
- Controlar las temperaturas bajas dentro del invernadero para que el método de inoculación sea más eficiente.
- Conservar las cepas aisladas de *I. torresensis* y mantener activa su patogenicidad para que estas puedan ser usadas posteriormente en programas de fitomejoramiento.

## CAPÍTULO VII

### BIBLIOGRAFÍA

- Abreo, E., Martinez, S., Bettucci, L., & Lupo, S. (2010). Morphological and molecular characterisation of *Campylocarpon* and *Cylindrocarpon* spp . associated with black foot disease of grapevines in Uruguay. *Australasian Plant Pathology*, 39, 446–452.
- Agrios, G. . (2008). *Fitopatología* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
- Agusti-Brisach, C., & Armengol, J. (2013). Black foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea*, 52(2), 245–261.
- Agustí-Brisach, C., & Armengol, J. (2012). Effects of temperature , pH and water potential on mycelial growth , sporulation and chlamydospore production in culture of *Cylindrocarpon* spp . associated with black foot of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 51(1), 37–50.
- Aiello, D., Guarnaccia, V., Epifani, F., Perrone, G., & Polizzi, G. (2014). “ *Cylindrocarpon* ” and *Ilyonectria* Species Causing Root and Crown Rot Disease of Potted *Laurustinus* Plants in Italy. *Journal of Phytopathology*, 3, 1–6. <http://doi.org/10.1111/jph.12306>
- Alaniz, S. (2008). *Caracterización y control de Cylindrocarpon spp. agente causal del pie negro de la vid.* ( tesis doctoral).Universidad Politécnica de Valencia.
- Alaniz, S., León, M., Vicent, A., García-Jiménez, J., Abad, P., & Armengol, J. (2007). Characterization of *Cylindrocarpon* species associated with black foot disease of grapevine in Spain. *Plant Disease*, 91, 1187–1193.
- Ames, T. (1997). *Enfermedades fungosas y bacterianas de raices y tuberculos andinos* (Lima). CIP.
- Andolfi, A., Mugnai, L., Luque, J., Surico, G., Cimmino, A., & Evidente, A. (2011).

Phytotoxins produced by fungi associated with grapevine trunk diseases. *Toxins* 3, 1569–1605. <http://doi.org/10.3390/toxins3121569>

Andrade, C. (2012). *EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE Trichoderma MARCHITIZ EN MORA DE CASTILLA ( Rubus glaucus Benth )*.(Tesis de pregrado), ESCUELA SUPERIOR POLITECNICA DE CHIMBORAZO.

Arévalo, E., Díaz, A., Galindo, J., & Rivero, M. (2011). Manejo fitosanitario del cultivo del mora (*Rubus glaucus Benth*) Medidas para la temporada invernal. *Ica*, 32.

Barnett, H., & Hunter, B. (1999). *Illustrated genera of imperfect fungi* (tres). Minnesota: Burgess publishing company.

Beyer-Ericson, L., Damm, E., & Unestam, T. (1991). An overview of dieback and its causes in Swedish forest nurseries. *European Journal of Plant Pathology*, 21, 439–443.

Booth, C. (1966). The genus *Cylindrocarpon*. *Mycological Papers*, 104, 1–56.

Brayford, D. (1991). *Nectria* canker of raspberry. In *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Insects*.

Brayford, D., Honda, B., Mantiri, F., & Samuels, G. (2004). *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. *Mycologia*, 96(3), 572–597. <http://doi.org/10.2307/3762176>

Cabral, A., Groenewald, J. Z., Rego, C., Oliveira, H., & Crous, P. W. (2012). *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycol Progress*, 11, 655–688. <http://doi.org/10.1007/s11557-011-0777-7>

Cabral, A., Nascimento, T., Oliveira, H., Groenewald, J. Z., Crous, P. W., & Spatafora, J. W. (2011). Multi-gene analysis and morphology reveal novel *Ilyonectria* species associated with black foot disease of grapevines. *Fungal Biology*, 116, 62–80.

<http://doi.org/10.1016/j.funbio.2011.09.010>

- Calero, V. (2010). *Alimentos y Nutrición Estudio de prefactibilidad para la producción de mora ( Rubus lanciniatus ) variedad brazos, en Atuntaqui, Imbabura*. (Tesis de pregrado). Universidad San Francisco de Quito.
- Cedeño, L., Carrera, C., Quintero, K., Pino, H., & Espinoza, W. (2004). *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans* and *neonectria discophora* var. *rubi* associated with black foot rot on blackberry (*Rubus glaucus* Benth.) in Merida, Venezuela. *Interciencia*, 29(8), 455–460.
- Chaverri, P., Salgado, C., Hirooka, Y., Rossman, A., & Samuels, G. (2011). Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs P. *Studies in Mycology*, 68, 57–78. <http://doi.org/10.3114/sim.2011.68.03>
- Chehri, K., Salleh, B., & Zakaria, L. (2015). Morphological and Phylogenetic Analysis of *Fusarium solani* Species Complex in Malaysia. *Microbial Ecology*, 69(3), 457–471. <http://doi.org/10.1007/s00248-014-0494-2>
- CIAT. (1981). Pruebas de patogenicidad. In *Tecnicas para el aislamiento, identificacion y conservacion de hongos patógenos del frijol*. Cali.
- De la Cadena, J., & Orellana, A. (1984). *El cultivo de la mora, Manual del Capacitador*. Quito.
- Delgado, F. (2012). *Manejo orgánico del cultivo de mora (Rubus sp.)*.
- Evans, G. (1967). The production of a phytotoxin, nectrolide, by some root-surface isolates of *Cylindrocarpon radiculicola*. *Plant and Soil*, 26, 253–260.
- Farinango, M. E. (2010). *ESTUDIO DE LA FISILOGIA POSTCOSECHA DE LA MORA DE CASTILLA (Rubus glaucus Benth) Y DE LA MORA VARIEDAD BRAZOS (Rubus sp.)*.(Tesis de pregrado). Escuela Politecnica Nacional.
- Flor, M. (2007). *Situación del mercado de mora*.

- Freeman, S., Sharon, M., Maymon, M., Mendel, Z., Protasov, A., & Aoki, T. (2013). *Fusarium euwallaceae* sp. nov. — a symbiotic fungus of *Euwallacea* sp., an invasive ambrosia beetle in Israel and California. *Mycologia*, *105*(6), 1595–1606. <http://doi.org/10.3852/13-066>
- French, E., & Hebert, T. (1980). Inóculo e inoculación. In *Métodos de investigación fitopatológica*. San Jose: Editorial IICA.
- Galet, P. (1996). Grape diseases. In *Oenoplurimedia*.
- Galet, P. (2000). General viticulture. In *Oenoplurimedia*.
- Garcia, E. (2006). Actividad antifungica de aceites esenciales de canela (*Cinannmomum Zeylanicum* Blume) y oregano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la podruccion de aflatoxinas en nuez pecanera. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *24*(1), 8–12.
- Gonzalez, M. (2010). *Conservación de mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela (Cinnamomum zeynalicum)*. (Tesis de pregrado).Escuela Superior Politecnica de Chimborazo.
- Hafizi, R., Salleh, B., & Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium. solani* and *F. oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*, *44*(3), 959–968.
- Halleen, F., Crous, P., & Petrini, O. (2003). Fungi associated with healthy grapevine cuttings in nurseries, with special reference to pathogens involved in the decline of young vines. *Australasian Plant Pathology*, *32*(1), 47–52.
- Halleen, F., Schroers, H., Groenewald, J., & Crous, P. (2004). Novel species of *Cylindrocarpon* (*Neonectria*). and *Campylocarpon* gen. nov. associated with black foot disease of grapevines (*Vitis* spp. *Studies in Mycology*, *50*, 431–455.
- Halleen, F., Schroers, H., Groenewald, J., Rego, C., Oliveira, H., & Crous, P. (2006). *Neonectria liriodendri* sp. nov., the main causal agent of black foot disease of

- grapevines. *Studies in Mycology*, 55, 227–234. <http://doi.org/10.3114/sim.55.1.227>
- Hamelin, R., Bérubé, P., Gignac, M., & Bourassa, M. (1996). Identification of root rot in nursery seedling by nested multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4026–4031.
- Herder, M. C. (2014). *Identification of Ilyonectria species associated with and determining their role in Avocado decline.* (Tesis de masterado) Lincoln University.
- Horsfall, J., & Dimond, A. (1960). *Plant Pathology: an advance treatise* (Academic P). New York.
- Khorasani, M. (2013). *Cylindrocarpon Species in Pacific Northwest Douglas-fir Nurseries: Diversity and Effects of Temperature and Fungicides on Mycelial Growth Mahsa.* ( Tesis de masterado). University of Washington.
- Ludeking, D., & Relab den Haan, B. (2002). *Cylindrocarpon destructans*. Retrieved from [www.denhaan.nl/02maren.%0Ahtm](http://www.denhaan.nl/02maren.%0Ahtm)
- Lyr, H., & Kluge, E. (1968). Relationship between pathogenicity, enzyme and toxin production in *Nectria radicularis*. *Phytopathologische Zeitschrift*, 62(3), 220–231.
- MAGAP. (2013). La Mora de Castilla, 1–20.
- Mantiri, F., Samuels, G., Rahe, J., & Honda, B. (2001). Phylogenetic relationships in *Neonectria* species having *Cylindrocarpon* anamorphs inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Canadian Journal of Botany*, 79(3), 334–340.
- Martinez, A. (2007). *Cultivo de la mora*. Quito.
- Martínez, D. (2014). *Identificación de hongos fitopatógenos relacionados con la marchitez de mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en la provincia de Tungurahua mediante la microscopia óptica y PCR.* (Tesis de postgrado).Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Matturi, S., & Stenton, H. (1964). The behaviour in soil of spores of four species of *Cylindrocarpon*. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(4), 589–599.

- Muñoz, J. (2012). *Diagnóstico de la producción y comercialización de mora de castilla (Rubus glaucus, Benth) en el recinto matapalo, cantón chillanes, provincia de bolívar.* (Tesis de pregrado). Universidad Estatal de Bolívar.
- O'Donnell, K., Kistler, H., Cigelnik, E., & Ploetz, R. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 2044–2049.
- Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J., & Lannou, C. (2009). Aggressiveness and its role in the adaptation of plant. *Plant Pathology*, 58, 409–424. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>
- Pathrose, B. (2012). *Characterising subspecies variation in New Zealand Cyldrocarpon species that cause black foot of grapevines.*(Tesis de doctorado). Lincoln University.
- Pilapaña, G. (2013). *Rentabilidad de aguacate, durazno, mora y tomate de árbol Carchi, Imbabura y Tungurahua.* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador.
- Probst, C. (2011). *Cylindrocarpon Black Foot disease in grapevines : Identification and epidemiology.* (Tesis de doctorado). Lincoln University.
- Rahman, M., & Punja, Z. K. (2005). Factors Influencing Development of Root Rot on Ginseng Caused by *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 95(12), 1381–1390.
- Romoleroux, K. (1996). *Flora of Ecuador* (uno).
- Ruiz, M., & Ureña, M. (2009). *Situación Actual y Perspectivas del Mercado de la Mora.*
- Samuels, G., & Brayford, D. (1990). Variation in *Nectria radicola* and its anamorph, *Cylindrocarpon destructans*. *Mycological Research*, 94(4), 433–442. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562\(10\)80001-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0953-7562(10)80001-2)
- Scheck, H., Vasquez, S., Fogle, D., & Gubler, W. (1998). Grape growers report losses to

- black-foot and grapevine decline. *California Agriculture*, 52(4), 19–23.
- Seifert, K. A., & Axelrood, P. E. (1998). *Cylindrocarpon destructans* var. *destructans*. *Canadian Journal Plant Pathology*, 20, 115–117.
- Song, J. Y., Seo, M. W., Kim, S. I., Nam, M. H., Lim, H. S., & Kim, H. G. (2014). Mycobiology Genetic Diversity and Pathogenicity of *Cylindrocarpon destructans* Isolates Obtained from Korean *Panax ginseng*. *Mycobiology*, 42(2), 174–180.
- Sweetingham, M. (1983). *Studies on the nature and pathogenecity of soilborne Cylindrocarpon spp.*( Tesis de doctorado). University of Tasmania.
- Taylor, G. (1964). *Fusarium oxysporum* and *Cylindrocarpon radicum* in relation to their association with plant roots. *Transactions of the British Mycological Society*, 47, 381–391.
- Unestam, T., Beyer-Ericsson, L., & Strand, M. (1989). Involvement of *Cylindrocarpon destructans* in root death of Scotch pine seedlings: pathogenic behavior and predisposing factors. *Scandinavian Journal Offorest Research*, 4, 521–535.
- Unestam, T., & Stenström, E. (1989). A method for observing and manipulating roots and root associated fungi on plants growing in nonsterile substrate. *Scandinavian Journal Offorest Research*, 4, 51–58.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetic. In M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, & T. White (Eds.), *PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications* (pp. 315–322). San Diego: Academic Press.