



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DETECCIÓN DE *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. EN EL CULTIVO DE  
UVA (*Vitis* spp.) EN EL ECUADOR

Autoras

Cynthia Estefanía Guerrón Sánchez

Andrea Estefanía Mora Landívar

Año  
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

DETECCIÓN DE *Alternaria alternata* Y *Fusarium* spp. EN EL  
CULTIVO DE UVA (*Vitis* spp.) EN EL ECUADOR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingenieras en Biotecnología.

Profesor guía

M.Sc Wilson David Tapia López

Autoras

Cynthia Estefanía Guerrón Sánchez

Andrea Estefanía Mora Landívar

Año

2019

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido el presente trabajo, Detección de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. en el cultivo de uva (*Vitis* spp.) en el Ecuador, a través de reuniones periódicas con las estudiantes Cynthia Estefanía Guerrón Sánchez y Andrea Estefanía Mora Landívar, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

---

Wilson David Tapia  
Magíster en Gestión y Planificación Ambiental  
CC: 1714205281

## DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, Detección de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. en el cultivo de uva (*Vitis* spp.) en el Ecuador, de las estudiantes Cynthia Estefanía Guerrón Sánchez y Andrea Estefanía Mora Landívar, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

---

Vinicio Danilo Armijos Jaramillo  
Doctor en Agrotecnología  
CI: 1716829666

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”.

---

Cynthia Estefanía Guerrón Sánchez

CI: 1724232887

---

Andrea Estefanía Mora Landívar

CI: 1718132143

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a Dios, por darme la mentalidad suficiente para superar cualquier obstáculo.

A mis maravillosos padres, Ober y Nelly, por siempre ser mi más grande ejemplo para seguir y por brindarme su amor incondicional, su confianza y consejos para alcanzar mis más grandes metas, y a mi hermano Leandro por todo el apoyo durante toda mi carrera y en el transcurso de la realización de este trabajo.

A mi compañera y amiga Andrea, por el cariño, esfuerzo y la paciencia que ha sabido tener para que el presente trabajo pueda culminar de la mejor manera.

A los analistas y amigos del área de Fitopatología de AGROCALIDAD, Hernando, Alex y Jairo, quienes han confiado en nuestras capacidades y compartiendo sus conocimientos nos han permitido llevar a cabo el presente estudio.

*Cynthia Guerrón*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por darme la fortaleza y perseverancia para superar cada etapa de mi vida universitaria.

A mis padres Patricio y Lucía por ser el pilar fundamental de mi vida, por su amor, paciencia, dedicación y apoyo, los amo.

A mi hermana Gaby y a mi novio Víctor por su cariño y apoyo incondicional.

A mis grandes amigos de carrera Cynthia y Ronald, por los lindos momentos que compartidos.

Al M.Sc Wilson Tapia por guiarnos y aconsejarnos durante el transcurso del proyecto. Y a AGROCALIDAD, especialmente al Ing. Hernando Regalado, Ing. Jairo Guevara e Ing. Alexander Toaza por confiar en nosotras y darnos la oportunidad de participar en este proyecto y por el apoyo constante durante su desarrollo.

*Andrea Mora*

## **DEDICATORIA**

A una persona muy especial, mi abuelito César, quien durante toda su vida supo ser, y seguirá siendo, un gran ejemplo de dedicación y fortaleza.

A mis padres, y hermano, por ser siempre las personas a las que amaré incondicionalmente, ustedes son mi soporte día tras día, y a ustedes les debo todo lo que he conseguido y conseguiré en un futuro.

*Cynthia Guerrón*

## **DEDICATORIA**

A mis padres Patricio y Lucía, ustedes son el motor de mi vida, por quienes me esforzaré para seguir adelante. A mis abuelitos Luchito y Shulitos quienes me han compartido su sabiduría, y a mis sobrinas Melina y Doménica, las niñas que alegran mis días y me inspiran a querer ser un ejemplo para ellas.

*Andrea Mora*

## RESUMEN

En el Ecuador, la producción de uva de mesa (*Vitis* spp.) ha ido aumentando conforme avanzan las demandas nacionales de consumo, e incluso se pretende abarcar el mercado internacional, por lo que se requieren frutas de alta calidad. Una de las principales preocupaciones para los productores de uva a nivel mundial es la presencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, especialmente los del género *Alternaria* y *Fusarium*. Debido a que la uva en el Ecuador aún es un cultivo en progreso, no se han reportado hongos de estos géneros hasta el momento. El presente estudio pretende detectar la presencia de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp, ambos fitopatógenos, en cultivos de uva (*Vitis* spp.) de zonas productoras del Ecuador mediante técnicas morfométricas, bioquímicas y moleculares, con el fin de aportar con información para el estatus fitosanitario de este cultivo. Para lo cual, se recolectaron muestras de hojas, tallos, frutos y raíces de diferentes variedades de uva con sintomatología relacionada a los hongos en cuestión, en las provincias de Santa Elena, Pichincha, el Guayas, Carchi y El Oro. A partir de las muestras se aislaron posibles cepas de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. en medios de cultivo y se identificaron por técnicas morfométricas y morfológicas mediante microscopía, medición de conidias y pruebas bioquímicas del sistema BIOLOG. Finalmente, se aplicaron técnicas moleculares como PCR y secuenciación genética tipo *Sanger* en base a la amplificación de las regiones ITS y EF-1 $\alpha$ . Las secuencias genéticas resultantes permitieron la identificación molecular de las especies *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium incarnatum-equiseti*, mismas que fueron identificadas a nivel morfológico y morfométrico y corresponden a fitopatógenos de la uva, a excepción del complejo *F. incarnatum-equiseti*, cuyas especies que no se lograron diferenciar a nivel morfométrico ni molecular debido a la similitud mostrada para el gen EF-1 $\alpha$ .

## ABSTRACT

In Ecuador, the production of table grapes (*Vitis* spp.) has been increasing as national consumption demands advance, and it is even intended to cover the international market, which requires high quality fruits. One of the main concerns for grape producers worldwide is the presence of diseases caused by phytopathogenic fungi, especially those of the genus *Alternaria* and *Fusarium*. The grape in Ecuador is under a rising production. For the moment, the phytopathogenic fungi of both genera have not been reported. The present study aims to detect the presence of *Alternaria alternata* and *Fusarium* spp, both phytopathogens, in grape crops (*Vitis* spp.) from producing areas of Ecuador. We used morphometric, biochemical and molecular techniques, in order to provide information on phytosanitary status of this crop. For which, samples with fungal associated symptoms of leaves, stems, fruits and roots of different varieties of grape were collected. the samples were collected from Santa Elena, Pichincha, Guayas, Carchi and El Oro provinces. Possible strains of *Alternaria alternata* and *Fusarium* spp were isolated in culture media and were identified by morphometric and morphological techniques by microscopy, conidial measurement and biochemical tests through BIOLOG system. Finally, molecular techniques such as PCR and Sanger sequencing were applied to analyze the ITS and EF-1 $\alpha$  regions. The resulting genetic sequences allowed the molecular identification of *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Fusarium incarnatum-equiseti*. These results were validated with morphological, morphometrical and biochemical evidence, with the exception of the *F. incarnatum- equiseti* complex. These species were not able to differentiate at the morphometric or molecular level due to their wide similarity.

# ÍNDICE

1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Antecedentes .....	1
1.2. Planteamiento del problema .....	3
1.3. Objetivo General .....	3
1.4. Objetivos específicos .....	4
1.5. Justificación del trabajo .....	4
2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 Antecedentes de la vid.....	5
2.2 Género <i>Vitis</i> .....	6
2.3 Descripción botánica .....	7
2.3.1 Enfermedades del cultivo de la Uva .....	10
2.4 Métodos de detección de hongos.....	17
2.4.1 Identificación por sintomatología .....	17
2.4.2 Métodos morfológicos y morfométricos.....	18
2.4.3 Métodos bioquímicos.....	19
2.4.4 Métodos moleculares.....	19
3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL.....	22
4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS.....	23
4.1. Población y muestra .....	23
4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos .....	24
4.2.1. Aislamiento de hongos fitopatógenos .....	24
4.2.2 Obtención de cultivos axénicos .....	24
4.2.3 Identificación morfológica y morfométrica.....	25
4.2.3.1 Morfología macroscópica .....	25
4.2.3.2 Morfología microscópica .....	25

4.2.3.3 Morfometría.....	26
4.2.4 Identificación por pruebas bioquímicas .....	26
4.2.4.1 BIOLOG .....	26
4.2.5 Conservación de micelio y esporas.....	26
4.2.6 Obtención de cultivos monospóricos.....	27
4.2.7 Identificación por métodos moleculares .....	28
4.2.7.1 Extracción de ADN .....	28
4.2.7.2 PCR.....	28
4.2.7.3 Electroforesis .....	30
4.2.7.4 Secuenciación y análisis de secuencias .....	30
4.2.8 Análisis estadístico de resultados .....	31
<b>5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>31</b>
5.1. Aislamiento de <i>Alternaria alternata</i> y <i>Fusarium</i> spp.....	31
5.2. Identificación morfológica y morfométrica .....	36
5.2.1 <i>Alternaria alternata</i> .....	37
5.2.2 <i>Fusarium</i> spp.....	43
5.2.2.1 <i>Fusarium equiseti</i> .....	43
5.2.2.2 <i>Fusarium oxysporum</i> .....	46
5.2.2.3 <i>Fusarium solani</i> .....	48
5.3. Identificación bioquímica.....	50
5.4. Identificación molecular .....	53
5.4.1 Extracción de ADN .....	53
5.4.2 PCR y Electroforesis .....	55
5.4.3 Identificación molecular de secuencias por homología .....	62
5.4.4 Alineamiento de secuencias y reconstrucción filogenética.....	66
5.4.4.1 <i>Alternaria alternata</i> .....	66
5.4.4.2 <i>Fusarium</i> spp.....	68
<b>6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>72</b>
6.1. Conclusiones .....	72
6.2. Recomendaciones .....	73

REFERENCIAS.....	74
ANEXOS .....	83

## 1. CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

La uva, o vid, es un cultivo perenne de ciclo anual de la familia de las Vitáceas que crece en regiones de clima templado y en menor proporción en zonas tropicales. El género *Vitis* spp. es un cultivo hortícola de amplia producción a nivel mundial debido a que su fruto se comercializa como producto fresco, seco o procesado como en el vino (Martínez de Toda, 2011).

En Ecuador, la uva se cultiva en las provincias de Imbabura, Carchi, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, El Oro, Manabí, Guayas y Santa Elena. Según el Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP), la producción nacional bruta de uva junto con manzana y pera fue de 12445 TM para el año 2015, con una superficie sembrada de 2908 hectáreas (MAGAP, 2016). No obstante, debido a la elevada demanda interna, nuestro país importó cerca de \$25,3 millones en uvas (SENAE, 2016). Por ende, se ha optado por aumentar las zonas cultivables de esta fruta, con el fin, no solo de cumplir la demanda, sino de obtener frutas de alta calidad para exportación. Un ejemplo de esto es la comuna El Azúcar en Santa Elena, la cual está ampliando el cultivo de uva de mesa de la variedad ARRA15, cuyo fruto es de coloración verde y no posee semilla (PRO-ECUADOR, 2016).

Por otra parte, en el año 2017 la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosanitario (AGROCALIDAD) junto con el Delegado y Agregado Comercial de la Embajada de Canadá han acordado el intercambio comercial de varios cultivos entre ellos el de uva, para lo cual se solicitó remitir el estatus fitosanitario del mismo.

Las enfermedades del género *Vitis*, al igual que las de otros cultivos, pueden causar pérdidas notables en la producción. Generalmente, las enfermedades se originan debido a una interacción entre un organismo patógeno vivo

(fitopatógono) y un huésped susceptible. Dichos patógenos o agentes causales pueden ser hongos, bacterias, virus y nematodos, cuyo desarrollo depende en gran manera de las condiciones ambientales (Pearson & Goheen, 2001). Las clasificaciones epidemiológicas de las enfermedades de las plantas se basan en la interacción del patógeno y el hospedero (biótrofo o necrótrofo, obligados o facultativos), en el número de ciclos de infección (enfermedades mono y policíclicas), y en la importancia de la latencia del patógeno. Cabe mencionar que, numerosos patógenos de plantas, están presentes en diversos hábitats no agrícolas o sobreviven saprófitamente en contextos agrícolas (Stewart & Globig, 2011).

Los agentes fitopatógenos que generalmente afectan a la uva son hongos del género *Oidium* sp., *Plasmopora* sp., *Fusarium* sp., *Guignardia* sp., *Phomopsis*, *Coniella* sp., *Botrytis* sp., *Botryosphaeria* sp., *Diplodia* sp., *Colletotrichum* sp., *Mycosphaerella* sp., *Physopella* sp., *Pseudocercospora* sp., *Alternaria* sp., *Cristulariella* sp., *Verticillium* sp. y *Rosellinia* sp.; bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas ampelina*, *Xylella fastidiosa* y virus como *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV), *Tomato Ringspot Virus* (TomRSV), *Tobacco Ringspot Virus* (TRSV), *Peach Rosette Mosaic Virus* (PRMV), *Grapevine Virus B* (GVB), *Arabis Mosaic virus* (ArMV), *Grapevine Virus A* (GVA), *Grapevine Fleck Virus* (GFkV) y *Rupestris Stem Pitting-associated Virus* (RSPaV) (Gambino & Gribaudo, 2006; Pearson & Goheen, 2001).

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos patógenos son una de las principales preocupaciones en los productos agrícolas en todo el mundo. Por ejemplo, el género *Alternaria* abarca aproximadamente 100 especies reportadas a nivel mundial en varias zonas agroclimáticas y ecosistemas, capaces de afectar cerca del 20% de productos agrícolas (P. Kumar, Kamle, Kumar, & Ajay, 2016). Además, especies del género *Fusarium* pueden causar marchitamientos, pudriciones y canchros (Satyanarayana, Deshmukh, & Johri, 2017b), en consecuencia estos microorganismos se encuentran dentro del grupo de hongos fitopatógenos más relevantes. En el caso de uva, ambos géneros afectan considerablemente a estos cultivos a nivel global (CABI, 2018

y Farr & Rossman, 2018). Es importante destacar que, tanto *Alternaria* como *Fusarium* no han sido reportados hasta la actualidad en los cultivos de uva de zonas productoras del Ecuador (AGROCALIDAD, 2018).

## 1.2. Planteamiento del problema

Actualmente, se ha optado por aumentar las zonas cultivables de esta fruta, con el fin, no solo de cumplir la demanda, sino de obtener frutas de alta calidad para exportación. El proceso de exportación de productos agrícolas en el Ecuador exige que los productores cumplan ciertas Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF), ya que son un requerimiento de la Organización Mundial del Comercio (FAO, 2018) y de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria (CIPF) (FAO, 2006). Dentro de las normas NIMF número 2, 11 y 21 se establece el análisis de riesgo de plagas y enfermedades. La entidad encargada de la regulación y control de la sanidad del sector agropecuario y la inocuidad de los alimentos en la producción primaria del Ecuador es la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario-AGROCALIDAD, que otorga los Certificados Fitosanitarios de Exportación. No obstante, debido a la falta de actualización del estatus fitosanitario de la uva, la exportación de este cultivo se ve limitada (AGROCALIDAD, 2018). Dicho estatus corresponde a un documento que evalúa el riesgo de plagas en un área determinada, por ende en este se muestran las principales plagas identificadas en diversos cultivos nacionales (FAO, 2008). En este aspecto, la detección de agentes fúngicos como *Alternaria* y *Fusarium* en uva, aportará con información para el estatus fitosanitario de este cultivo, ya que ambos géneros solo han sido reportados en otros cultivos hasta el momento (AGROCALIDAD, 2018).

## 1.3. Objetivo General

Detectar la presencia de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. en cultivos de uva (*Vitis* spp.) de zonas productoras del Ecuador mediante técnicas morfométricas, bioquímicas y moleculares.

#### 1.4. Objetivos específicos

- Aislar *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. a partir de plantas de uva con sintomatología característica de estos fitopatógenos.
- Identificar *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. mediante técnicas morfométricas, morfológicas y bioquímicas.
- Detectar *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. a través del empleo de las técnicas moleculares PCR y secuenciación genética.

#### 1.5. Justificación del trabajo

Actualmente, en el Ecuador, el cultivo de uva se encuentra expandiéndose en varias zonas productivas del país, con el fin de cumplir la demanda nacional e incrementar la gama de productos de exportación. Para ello, es necesaria la identificación de los fitopatógenos presentes en este cultivo, lo cual contribuirá a la actualización del estatus fitosanitario de la uva, un requerimiento indispensable para la exportación (AGROCALIDAD, 2018). Una de las principales preocupaciones para los productores de uva a nivel global es la presencia de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, especialmente los del género *Alternaria* y *Fusarium* (CABI, 2018 y Farr & Rossman, 2018), los cuales no han sido reportados en los cultivos de uva del Ecuador hasta el momento (AGROCALIDAD, 2018).

Los métodos convencionales de detección se basan en técnicas morfométricas y pruebas bioquímicas y son fundamentales para determinar ciertas características fenotípicas de los fitopatógenos (Hoshi et al., 2009). Por otro lado, una de las principales técnicas moleculares que se emplean para la identificación de agentes fitopatógenos es la PCR pues permite la detección rápida y específica de patógenos a nivel de género y especie (Gherbawy & Voigt, 2010). El empleo de estas metodologías, permitirá una mejor detección e identificación de microorganismos fitopatógenos presentes en el cultivo de uva de las zonas productoras del país.

Es importante mencionar que el diagnóstico e identificación de fitopatógenos permite controlar las plagas que ocasionan una enfermedad, mediante lo cual se pueden evitar grandes pérdidas económicas (Duan, Christian, Schwachtje, Walther, & Ebenhöh, 2013).

El presente proyecto pretende detectar *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. en los cultivos de uva de las zonas productoras del Ecuador, a través de la aplicación de métodos morfométricos, bioquímicos y moleculares, siendo este un tema de importancia nacional ya que la detección de dichos patógenos aportará con información al estatus fitosanitario de dicho cultivo.

## **2. CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 Antecedentes de la vid**

Actualmente, la distribución de la familia *Vitaceae* a la que pertenece la vid, incluye el Norte, Centro y Sur de América, Asia, Australia y Europa (Gerrath, Melville, & Posluszny, 2015).

El cultivo de uva y el consumo de vino posiblemente comenzaron cerca del año 6000 a.C. El vino era considerado como la bebida de los dioses e incluso era recetado por los médicos como es el caso de Hipócrates en la Antigua Grecia. Literatura encontrada en las tumbas del antiguo Egipto considera que el vino se empezó a consumir allí alrededor del año 2700 a.C. y que los egipcios fueron los que desarrollaron los métodos de pérgolas con ramas para los viñedos. Aproximadamente en el año 1600 a.C., el vino se extendió a Europa gracias a la influencia romana, lo cual reforzó la viticultura en Europa occidental (Terral et al., 2010). Roma contribuyó en gran parte a la clasificación de las variedades de uva conforme a su color, además se dedicaron a la observación de las características de maduración de los frutos, identificación de enfermedades y tipos de suelo en donde mejor se desarrollaba la vid. Los romanos adquirieron habilidades en cuanto a la poda y en la mejora del rendimiento mediante el riego y fertilización. De esta manera, la producción de uva se ha basado en una

amplia cantidad de variedades adaptadas y mejoradas a diversas condiciones ambientales, por lo que las vides conservan altos niveles de diversidad genética (Myles et al., 2011).

Gran parte de los cultivos de Europa occidental se derivan de variaciones de ADN cloroplástico de genotipos de *V. vinífera* ssp. *vinífera* y *sylvestris* (Arroyo et al., 2006). Las variedades heterocigotas existentes, especialmente las empleadas para la producción de vino se deben a la hibridación sexual. Los cambios ocurridos durante dicho proceso favorecieron el rendimiento, producción y adaptación de la uva a diferentes ambientes, adicionalmente generaron un aumento de la concentración de azúcares. Otro de los cambios que fomentó la productividad de la vid fue el incremento del tamaño de las bayas y racimos, además de la transformación de plantas dioicas silvestres a hermafroditas. Con el paso del tiempo, los cruces sexuales dieron lugar a nuevos fenotipos y a la propagación vegetativa de genotipos específicos con caracteres deseables que inciden en la calidad y producción de uva. El germoplasma de la uva silvestre es la principal fuente de alelos que permiten mejorar la calidad de uva destinada a la producción de vino (This, Lacombe, & Thomas, 2006).

La evolución de la familia Vitaceae posiblemente ocurrió mediante la hibridación y posterior duplicación de cromosomas. Según análisis genómicos, es probable que hayan ocurrido tres eventos separados de duplicación del genoma completo, e incluso se cree que el último evento involucró al menos 10 cromosomas (Jackson, 2014).

## **2.2 Género *Vitis***

La familia Vitaceae abarca cerca de 900 especies, divididas en 16 géneros, dentro de la cual se encuentra *Vitis*, un género de zona templada que se presenta principalmente en el hemisferio norte y cuenta con 68 especies (Simmonds & Preedy, 2016).

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) y el Identificador del Servicio de Conservación de Recursos Naturales (NRCS), las especies de uva oficialmente reconocidas son: *Vitis vinifera* L. (uva de Europa), *Vitis arizonica* Engelm. (uva del cañón), *Vitis acerifolia* Raf. (Uva de hoja de arce), *Vitis monticola* Buckley (uva de montaña dulce), *Vitis amurensis* Rupr. (Uva Amur), *Vitis mustangensis* Buckley (uva de mustang), *Vitis cinerea* Engelm. ex Millardet (uva de graybark), *Vitis rotundifolia* Michx. (muscadine), *Vitis aestivalis* Michx. (uva de verano), *Vitis x novae-angliae* Fernald (uva peregrino), *Vitis labrusca* L. (uva de zorro), *Vitis rupestris* Scheele (uva de arena), *Vitis californica* Benth. (Uva silvestre de California), *V. vinifera* L. ssp. *sylvestris* Hegi (uva silvestre), *Vitis girdiana* Munson (uva silvestre del desierto), *Vitis tiliifolia* Humb. y Bonpl. ex Schult. (Uva de las Indias Occidentales), *Vitis palmata* Vahl (uva avícola), *V. vulpina* L. (uva helada), *Vitis riparia* Michx. (uva de ribera) y *Vitis shuttleworthii* House (uva caloosa) (Simmonds & Preedy, 2016).

El género *Vitis* se divide en dos subgéneros, *Vitis* o *Eu vitis* (racimo de uvas) y *Muscadinia* (uvas muscadine). El subgénero *Vitis* comprende la mayoría de las especies productoras de vino, entre ellas *Vitis vinifera*, originaria de Asia y capaz de producir los mejores vinos. Mientras que el subgénero *Muscadinia* incluye a *Vitis rotundifolia*, especie oriunda del sureste de los Estados Unidos, *Vitis munsoniana*, nativa de Florida y Bahamas y *Vitis popenoei*, de México, Belice y Guatemala (Simmonds & Preedy, 2016). No obstante, algunos taxónomos afirman que *Muscadinia* se debería considerar un género aparte debido a las diferencias presentes en caracteres morfológicos, anatómicos y citológicos con relación al subgénero *Vitis*.

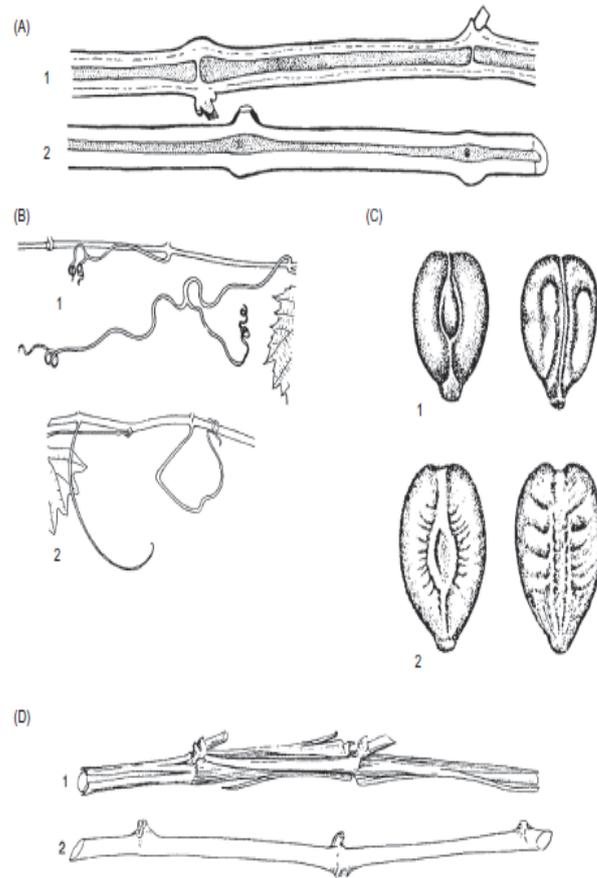
### 2.3 Descripción botánica

Las plantas del género *Vitis* presentan 38 cromosomas, poseen una corteza leñosa a manera de capas fácilmente desprendibles, lenticelas no prominentes, médula interrumpida en los nodos por tejido leñoso llamado diafragma, fibras

del floema ordenadas de forma tangencial, zarcillos ramificados (Figura 1), hojas generalmente palmeadas con cinco venas principales y racimos de flores alargados (Jackson, 2014).

El género *Vitis* se destaca principalmente por sus características florales. Las flores se disponen en racimos alargados, suelen ser unisexuales, las masculinas poseen anteras erectas funcionales y un pistilo poco desarrollado, mientras que las flores femeninas contienen un pistilo funcional, estambres recurvados, polen estéril y carecen de anteras (Figura 2). Los pétalos se encuentran fusionados conformando la caliptra o cap y se mantienen enlazados en el vértice hasta la madurez, ya que en dicha etapa se dividen a lo largo de la base al desprenderse la caliptra. Sin embargo, en ciertas ocasiones los pétalos pueden disociarse en la parte superior, lo cual da lugar a flores con forma de estrella; este acontecimiento genera bayas sin semilla como es el caso de la variedad Chardonnay. En cuanto a los nectarios, estos se generan en la base del ovario y no producen néctar sino un aroma para atraer a los insectos polinizadores; los sépalos del cáliz se degeneran tempranamente durante el desarrollo floral (Jackson, 2014).

Las frutas de las Vitáceas son generalmente bayas de color púrpura oscuro con una a cuatro semillas en forma de pera, aunque algunas variedades de uva tienen bayas verdes o rojas (Gerrath et al., 2015).



*Figura 1.* Características de los subgéneros *Vitis* (1) y *Muscadinia* (2).

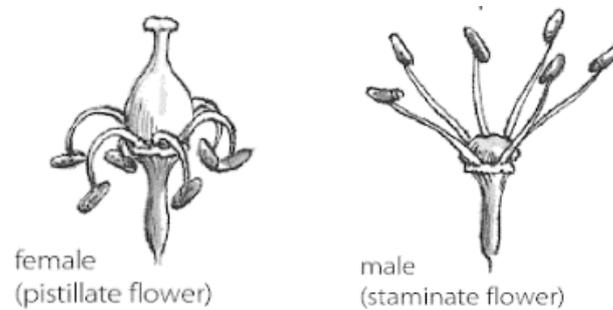
Tomado de Jackson, (2014).

**A:** Morfología interna de la caña

**B:** Zarcillo

**C:** Morfología frontal y posterior de la semilla

**D:** Corteza



*Figura 2.* Flores femeninas y masculinas del género *Vitis*.

Tomado de Rombough, (2002).

### 2.3.1 Enfermedades del cultivo de la Uva

La vid (*Vitis* spp.) constituye un cultivo frutal de gran importancia mundial, el cual se ve afectado por una amplia cantidad de microorganismos patógenos que originan enfermedades pre y post cosecha. Estos repercuten en la calidad de la fruta y por ende su producción, procesamiento y exportación. Se reportan enfermedades ocasionadas por bacterias, hongos, oomicetos y virus. De entre estos, los agentes fúngicos son los principales patógenos (Armijo et al., 2016).

#### 2.3.1.1 Agentes fúngicos

Se ha reportado una amplia variedad de hongos que atacan al género *Vitis*. Uno de los principales síntomas generados por patógenos fúngicos es el necrosamiento de hojas, tallos o frutos. Las enfermedades ocasionadas por hongos afectan directamente a la calidad de la baya debido a que disminuye la capacidad de asimilación de nutrientes de la vid. Cuando estos patógenos infectan las bayas, descomponen el tejido de la fruta, impiden la maduración y producen sabores desagradables debido a las micotoxinas que generan. No obstante, los efectos concretos sobre los frutos están ligados estrechamente a la etapa en la que ocurre la infección (Konig, Unden, & Frohlich, 2017).

Los patógenos fúngicos de la vid de mayor preocupación económica son el mildiú vellosa (*Plasmopara viticola*), mildiú polvoriento (*Erysiphe necator*), la podredumbre del racimo (*Botrytis cinerea*), al igual que aquellos del género *Alternaria* y *Fusarium* (Hafizi, Salleh, & Latiffah, 2013).

- ***Alternaria alternata***

La infección ocasionada por *Alternaria* es ubicua y distribuida en todo el mundo. En el género *Alternaria* existen numerosas especies de las cuales *Alternaria alternata* es la más común en la vid. Varias frutas y cultivos pueden verse afectados, así como alimentos y materiales orgánicos como textiles,

cuero y papel. Este patógeno coloniza principalmente bayas maduras ocasionando pudrición. Las bayas colonizadas muestran una mancha negra en la superficie, la cual aumenta el sabor mohoso de las uvas y el vino, además de producir micotoxinas (Konig et al., 2017).

Los conidióforos de *A. alternata* producen conidias de color marrón a verde oliva, las cuales tienen septos transversales y longitudinales y un pico cónico cilíndrico y corto; además están organizados en cadenas largas, a menudo ramificadas, tal como se observa en la Figura 3. El hongo tiene un estilo de vida saprófito y prefiere un sustrato azucarado, pero ocasionalmente se vuelve parásito. El patógeno disemina sus conidias a través del viento o la lluvia; la infección ocurre cuando estas germinan al estar en contacto con las hojas e ingresan a través de heridas o por la apertura de estomas. La infección se ve reflejada en lesiones circulares de color marrón oscuro en hojas, tallos y frutos, lugar en donde se acumulan nuevas conidias que pueden desprenderse por los factores ambientales antes mencionados (Figura 4). Para establecer una infección, es necesaria una alta humedad relativa (entre 98–100%), por lo tanto las precipitaciones frecuentes en invierno son favorables para este proceso (Konig et al., 2017).

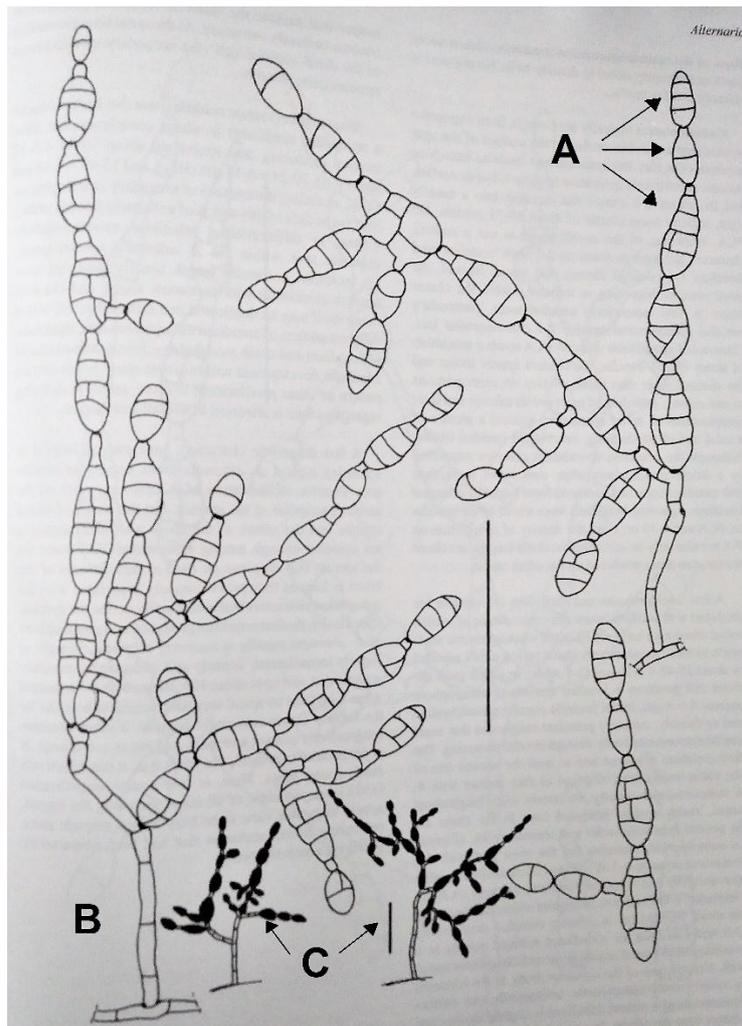


Figura 3. Características morfológicas de *Alternaria alternata*.

Adaptado de Simmons, (2007).

**A:** Conidias

**B:** Conidióforos

**C:** Patrones de esporulación de *Alternaria alternata*

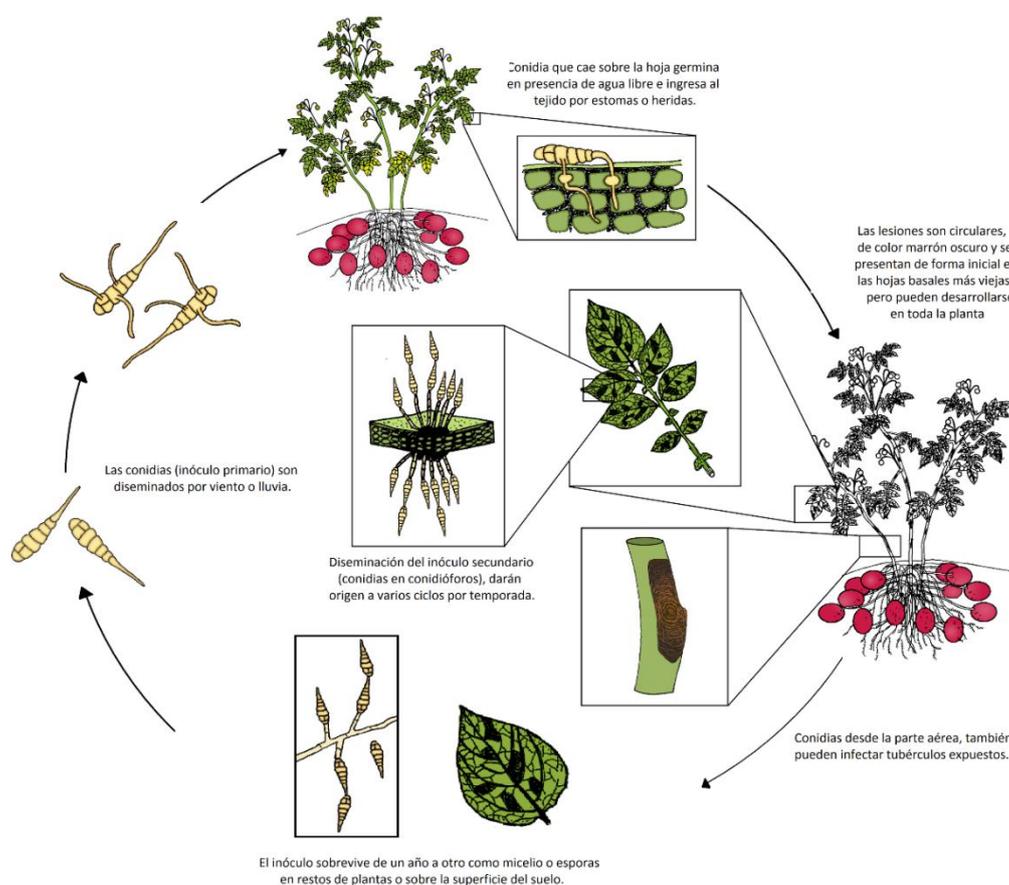


Figura 4. Proceso de infección de *Alternaria alternata*.

Tomado de Acuña & Tejeda, (2018).

Al aislar *A. alternata*, el tamaño y la coloración de las colonias depende en gran medida del medio de cultivo, de esta manera a 25°C en medio CYA (Czapek yeast extract agar) y MEA (Malt Extract Agar) las colonias pueden medir de 50 a 70 mm de diámetro o abarcar toda la placa Petri y poseen un micelio marrón blanquecino a grisáceo. En medio G25N (25% Glycerol Nitrate Agar) el micelio mide de 10 a 15 mm de diámetro y es de color marrón oliva a gris; mientras que en medio DCMA (Dichloran Chloramphenicol Malt Agar) el diámetro suele ser de 60 a 70 mm y el micelio de color gris oscuro. El tamaño de las colonias también puede variar con cambios drásticos de temperatura, en un rango de entre 5 a 6.5 °C crece con un diámetro de hasta 4 mm y en muy pocos casos se desarrolla hasta 10 mm a 37 °C. El crecimiento óptimo de *A. alternata* ocurre

a pH de 4 a 5.4 e incluso es capaz de sobrevivir en ambientes con concentraciones de aire tan bajas como 0.25% (v/v) de nitrógeno (Pitt & Hocking, 2009).

- ***Fusarium* spp.**

*Fusarium* es conocido como uno de los agentes fitopatógenos de mayor preocupación a nivel mundial debido a que ocasiona severas enfermedades que afectan a numerosos cultivos económicamente importantes tales como: maíz, cebada y trigo (Magliano & Chulze, 2013). Las enfermedades producidas por *Fusarium* tienen el potencial de destruir grandes extensiones de cultivos, donde la sintomatología asociada a este patógeno puede incluir pudriciones de raíces y tallos, canchales, marchitamientos, pudriciones de frutas o semillas, y rara vez enfermedades de las hojas (Gherbawy & Voigt, 2010).

En la actualidad, este agente fúngico se ha extendido de manera gradual alrededor del mundo. La Sociedad Americana de Fitopatología reveló que más de 81 de las 101 plantas económicamente importantes en la lista tenían al menos una enfermedad asociada con *Fusarium*, entre ellas se incluye la vid (*Vitis* spp.) (The American Phytopathological Society., 2018).

Dado que estos hongos también pueden crecer como endófitos aparentemente sin síntomas en muchas condiciones, la identificación visual de este patógeno es casi imperceptible por lo que es necesario recurrir a otras técnicas de detección (Magliano & Chulze, 2013).

De manera general los patógenos del género *Fusarium* no tienen estructuras especializadas para la penetración de la célula huésped; más bien, el hongo ingresa a través de aberturas naturales o penetra en las paredes de las células epidérmicas directamente con hifas de infección corta (Konig et al., 2017). La maduración y germinación de las esporas son pasos esenciales del desarrollo en el ciclo de vida de hongos y son fundamentales para la colonización de las plantas (Magliano & Chulze, 2013). El modelo generalizado para la progresión

de la infección de *Fusarium* implica la entrada del patógeno en la planta. Los peritecios (fase sexual, con ascosporas) y las conidias (esporas asexuales) se desarrollan en la superficie de plantas infectadas o residuos de cultivos donde el hongo se desarrolla saprofiticamente, por lo que se garantiza su conservación. Las ascosporas se liberan de los peritecios durante al menos 18 h en condiciones favorables de temperatura (12 a 34°C), preferiblemente 25°C y una humedad relativa superior al 80%. Las conidias se producen en masas viscosas llamadas esporodoquios (estructuras hifales en forma de cojín), las cuales pueden dispersarse solo una corta distancia a través de la lluvia (Konig et al., 2017).

El género *Fusarium* se caracteriza por poseer macroconidias, microconidias y clamidiosporas como estructuras principales. Las macroconidias o ascosporas presentan al menos tres septos, con una célula apical diferenciada que puede ser puntiaguda, redondeada, enganchada o filamentosa, y una célula basal que puede ser similar a un pie. Las macroconidias de *Fusarium* generalmente exhiben cierto grado de curvatura, los lados convexo y cóncavo se conocen como los lados dorsal y ventral, respectivamente como se observa en la Figura 5. Aunque algunas macroconidias se producen generalmente en el micelio aéreo, la forma y el tamaño de los esporodoquios son más regulares y se utilizan con fines de identificación cuando es posible (Gherbawy & Voigt, 2010). Generalmente, las macroconidias son las que inician la fase patógena al estar en contacto con la planta (Konig et al., 2017).

Las microconidias no son producidas por todas las especies de *Fusarium*, por lo que su presencia es un factor importante para la identificación de especies de este género. De igual manera, la célula conidiógena sobre la cual se generan y su disposición sobre y alrededor de la célula conidiógena son todos caracteres importantes para su diagnóstico. Las formas más comunes de las microconidias son: ovalada, reniforme (forma de riñón), obovoide con una base truncada, piriforme (forma de pera), napiforme (forma de nabo), globosa y fusiforme (Figura 5). Un solo cultivo puede producir microconidias con más de una forma (Leslie, Summerell, & Bullock, 2006).

Las clamidiosporas comprenden una parte importante en muchas descripciones de especies de *Fusarium*. Se pueden formar ya sea de manera individual, doble, en grupos o en cadenas (Figura 5). A menudo tardan mucho tiempo (más de 6 semanas) en producirse, y es posible que no se produzcan en grandes cantidades. Al aislarse en medios de cultivo, estas estructuras se pueden encontrar en los micelios aéreos o incrustadas en el agar, dependiendo de la especie (Leslie et al., 2006).

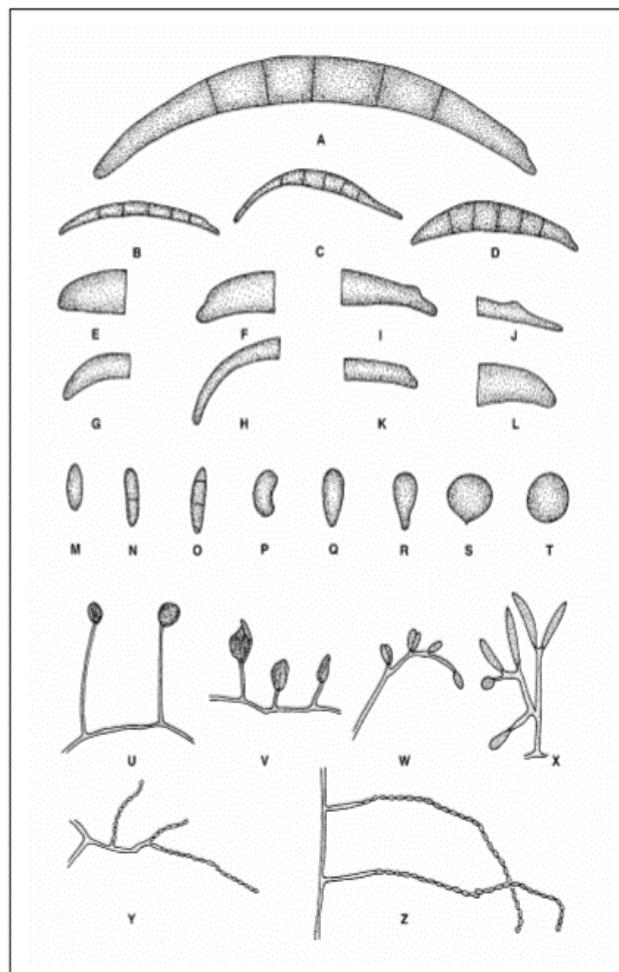


Figura 5. Características morfológicas de especies de *Fusarium*.

Tomado de Leslie et al. (2006).

**A-D:** Formas macroconidiales (célula apical a la izquierda, célula basal a la derecha)

**E-H:** Formas de células apicales macroconidiales.

**I-L:** Formas de células basales macroconidiales.

**M-T:** Formas de esporas microconidiales.

**U-X:** Morfología fiálida (producción de conidias).

**Y-Z:** Cadenas microconidiales.

Las diferentes especies de *Fusarium* se diferencian unas de otras gracias a la forma y método de producción de las microconidias y el tipo de fiálides sobre los cuales se producen, por tanto representan un criterio de diagnóstico útil. Por ejemplo, *F. poae* produce microconidias esféricas o apiculadas y *F. sporotrichioides* produce una variedad de formas: elipsoidal, piriforme y esférica. *F. verticillioides* produce sus microconidias en cadenas largas, delicadas y secas, que se observan mejor utilizando el objetivo del microscopio compuesto. Algunas especies producen microconidias en falsas cabezas (pequeñas, mucoides, bolas de conidias adherentes) y otras las producen por separado. En algunas especies, las microconidias se producen en los fiálidos con un solo poro, y estos se denominan monofiálidos, pero algunas especies producen fiálidos con más de un poro (polifiálidos). Las especies que producen polifiálidos generalmente también producen monofiálidos (Pitt & Hocking, 2009).

## **2.4 Métodos de detección de hongos**

La identificación precisa de los organismos responsables de una enfermedad en plantas es un requisito previo esencial para la generación de estrategias de control, debido a que muchos patógenos fúngicos producen síntomas similares y, por lo tanto, es importante poder distinguir entre diferentes especies (Raya et al., 2017).

### **2.4.1 Identificación por sintomatología**

Los hongos fitopatógenos son capaces de infectar varias partes de la planta como raíces, tallos, hojas, flores y frutos, induciendo síntomas característicos visibles mediante los cuales se puede inferir los posibles agentes causantes.

Los síntomas más comunes en las hojas son antracnosis, manchas, royas, destellos, agujeros y hongos polvorientos. En el tallo generalmente se presenta pudrición, cancro y tumores. Mientras que en la fruta los síntomas son podredumbre de la cápsula y decoloración del grano. Por otro lado, la naturaleza sistémica de las enfermedades de desprendimiento, marchitez, tizón y mildiú veloso puede deberse a la capacidad de los patógenos para propagarse a diferentes órganos desde el sitio inicial de la infección (Narayanasamy, 2013).

#### **2.4.2 Métodos morfológicos y morfométricos**

A diferencia de los demás microorganismos patógenos de las plantas, los hongos poseen un talo o cuerpo bastante organizado y generalmente multicelular con formas de esporas distintivas que se producen durante las etapas de reproducción asexual y sexual. Los métodos tradicionales de detección de patógenos fúngicos incluyen el aislamiento de estos microorganismos en medios de agar para su posterior identificación microscópica por morfología, el cual comprende aspectos como: color y producción de estructuras asexuales como esporangios, conidias, clamidiosporas, esclerocios, etc., lo cual va ligado a los análisis morfométricos de las estructuras. Conforme a esta metodología, se puede identificar una amplia variedad de hongos fitopatógenos a nivel de género e incluso de especie según la experiencia del observador. Cabe mencionar que no todos los hongos pueden aislarse en medios artificiales, por lo que se pueden realizar análisis *in situ* de los tejidos infectados a través de la observación microscópica de montajes temporales con cinta adhesiva (Narayanasamy, 2013).

Durante años la identificación de hongos se ha fundamentado en sus características morfológicas, fisiológicas y químicas. Generalmente, estas metodologías funcionan bastante bien y proporcionan una identificación concreta de especies a bajo costo ya que requieren de equipos como microscopios y reactivos químicos que no implican grandes inversiones. La

clasificación de nivel superior basado en morfología suelen ser precisas, no obstante requieren de una alta capacitación técnica por parte de los investigadores (Arora, 2004).

### **2.4.3 Métodos bioquímicos**

Los métodos bioquímicos empleados para la detección de hongos fitopatógenos están basados, por lo general, en las rutas bioquímicas que emplean estos microorganismos para consumir los sustratos. Los hongos filamentosos tienen vías bioquímicas únicas para asimilar una amplia gama de nutrientes simples y complejos disponibles para ellos y para producir una variedad de metabolitos. La singularidad morfológica y bioquímica de estos organismos se usa comúnmente para su identificación, pero la diferenciación de cepas estrechamente relacionadas requiere investigaciones fenotípicas y genómicas extensas. Uno de los ensayos mayormente usados en la identificación bioquímica de agentes fúngicos es BIOLOG FF-MicroPlate, el cual se introdujo recientemente para la rápida identificación y caracterización de hongos filamentosos comunes en función de sus capacidades para asimilar sustratos (Narayanasamy, 2013). El FF-MicroPlate contiene 95 pocillos con distintos sustratos y un pocillo control, cada pocillo posee colorante de tetrazolio redox, el cual cambia de color como resultado de la respiración celular, proporcionando una huella dactilar metabólica. Por ende, los resultados de este ensayo se reflejan en un cambio de coloración y turbidez proporcional al consumo de los sustratos. Las microplacas FF empleadas para este ensayo se ubican en el lector de placas BIOLOG, donde la huella dactilar metabólica resultante se compara con una base de datos (constantemente actualizada) que contiene las diferentes especies de hongos filamentosos, lo que permite la rápida identificación de agentes fúngicos (M. P. Singh, 2009).

### **2.4.4 Métodos moleculares**

La mayoría de los métodos de identificación molecular se fundamentan en la interacción entre enzimas y ácidos nucleicos. Las enzimas que mayormente se

usan son las endonucleasas de restricción y las ADN polimerasas. Las primeras cortan moléculas de ADN en secuencias de nucleótidos específicas y se emplean en la técnica RFLP (Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción) para producir fragmentos de ADN únicos que son la base de esta técnica. Por otra parte, el segundo grupo son enzimas que catalizan la síntesis de ADN a partir de precursores de nucleótidos y se utilizan para su amplificación a través de la PCR (Arora, 2004).

La tecnología de PCR permite la rápida amplificación de regiones específicas de ADN a través de una ADN polimerasa termoestable conocida como *Taq polimerasa* y de dos cebadores o primers que reconocen y se unen a una región de una cadena de ADN y dan inicio a la replicación del material genético. Este proceso se repite y el ADN en cuestión se replica de manera indefinida (Arora, 2004). El desarrollo de cebadores específicos de genes ha facilitado los estudios sistemáticos y la detección e identificación de patógenos fúngicos. La región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosomal nuclear generalmente se ha considerado un marcador conveniente de identificación molecular de los hongos a nivel de especie debido a su característica conservada dentro de las mismas y al número de copias múltiples por genoma (Gherbawy & Voigt, 2010).

Una técnica avanzada de PCR es la PCR en tiempo real, la cual cuantifica el material genético mientras lo amplifica. La cuantificación ocurre mediante señales fluorescentes proporcionales al número de moléculas de producto de PCR o amplicones generados. El cambio de fluorescencia durante la reacción se mide por medio de un instrumento que combina ciclos térmicos con capacidad de escaneo de tinte fluorescente, y al representar la fluorescencia en función del número de ciclo, el instrumento forma una gráfica de amplificación que representa la acumulación de producto a lo largo de toda la reacción de PCR. Esta tecnología ofrece oportunidades cada vez mayores en la identificación de hongos fitopatógenos y se ha utilizado en varios estudios para la detección e identificación de varias especies de *Fusarium* (B. P. Singh &

Gupta, 2017).

Las técnicas moleculares, especialmente la tecnología de PCR, han permitido el progreso de la biología molecular y por ende el diagnóstico de microorganismos fúngicos. La incorporación de técnicas moleculares a las metodologías tradicionales de identificación y clasificación de hongos basadas en morfología favorece la diferenciación de especies y variedades de hongos en base a su genética. La constante creación de bases de datos de genomas y marcadores moleculares empleados como fuentes de códigos de barras de ADN se está llevando a cabo gracias al gran desarrollo de la bioinformática (Gherbawy & Voigt, 2010). Adicionalmente, las secuencias de ADN que se obtienen a través de las técnicas de secuenciación proporcionan información que permite determinar la relación filogenética entre especies, reflejado en árboles filogenéticos.

Una de las ventajas de los métodos moleculares es que se pueden identificar hongos que no esporulan en medios de cultivo o patógenos fúngicos estrictos u obligados, es decir aquellos que no se pueden cultivar en medios artificiales ya que dependen del huésped. La identificación se da a través de la comparación de los datos de secuencia de ADN del hongo desconocido con las secuencias de especies conocidas. Por otra parte, las técnicas moleculares también permiten distinguir especies fuertemente relacionadas con pocas diferencias morfológicas o subespecies (Arora, 2004).

### 3. CAPÍTULO III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

El diseño experimental del presente estudio se puede observar en la Figura 6.

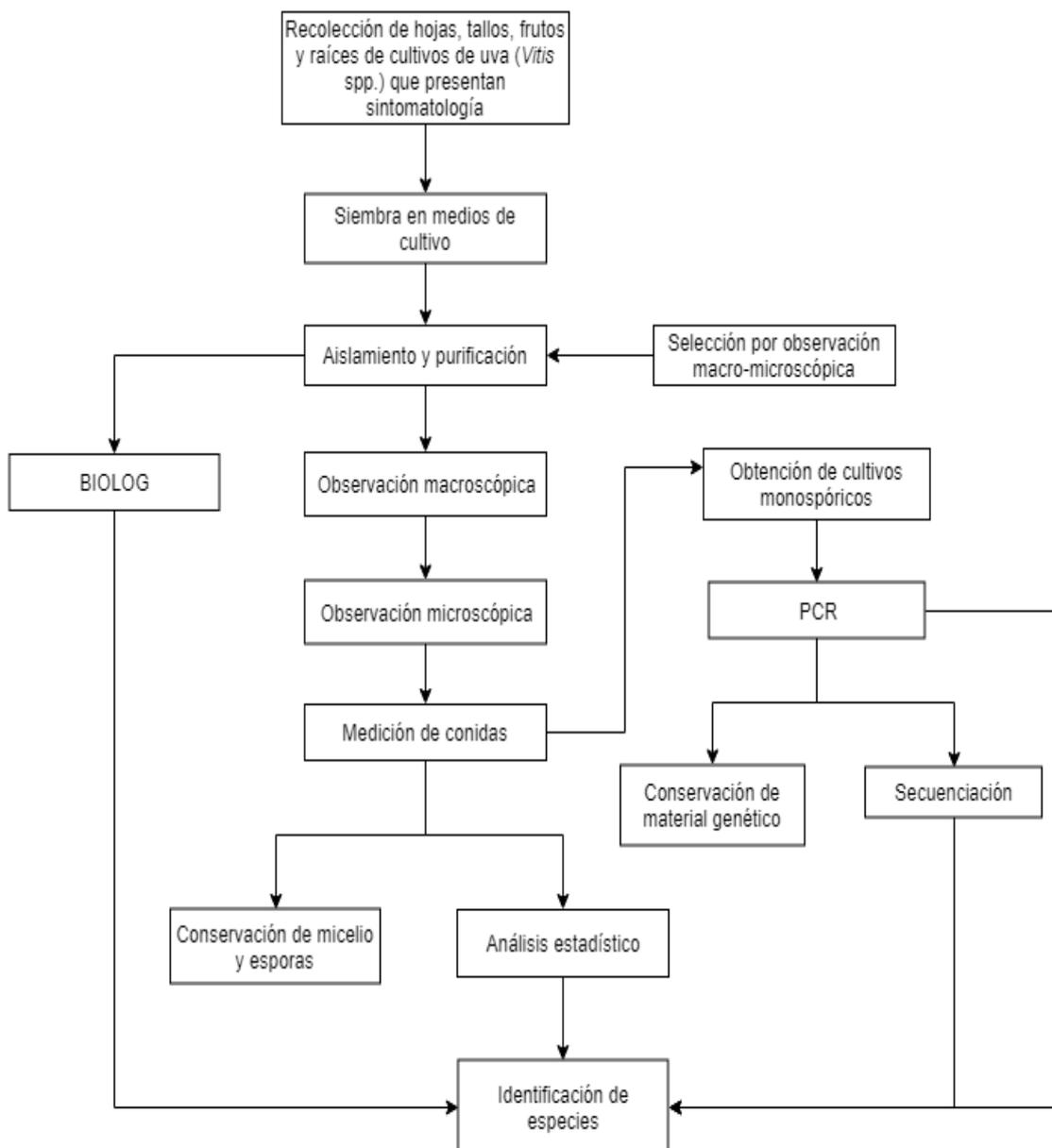


Figura 6. Esquema del diseño experimental usado en el presente estudio.

## 4. CAPÍTULO IV. PROCEDIMIENTOS

### 4.1. Población y muestra

Población: Se emplearon cultivos de uva (*Vitis* spp.) de las parroquias de Pomasqui, Yaruquí y Puembo en la provincia de Pichincha; de la parroquia Chanduy en Santa Elena; de la comuna Mascarilla en el Carchi; del cantón Santa Rosa de la provincia de El Oro y del cantón Playas del Guayas (Figura 7).



Figura 7. Sitios muestreados a lo largo del estudio.

Adaptado de (Google Maps, 2018).

Muestra: Se recolectaron 53 muestras entre hojas, tallos, frutos y raíces de diferentes variedades de uva (*Vitis* spp.) con sintomatología relacionada a los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. Se recolectaron 18 muestras en la provincia de Santa Elena, 17 en la provincia de Pichincha, 3 en la provincia del Guayas, 14 en el Carchi y 1 en El Oro.

De las plantas seleccionadas se cortaron de manera aséptica partes vegetativas con evidente necrosis, manchas negras, pudriciones o tonalidades cafés en los haces vasculares.

Las muestras se envolvieron en papel, se colocaron en fundas ziploc y se transportaron bajo cadena de frío hacia el laboratorio de fitopatología de AGROCALIDAD-Tumbaco para los posteriores análisis.

## **4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos**

### **4.2.1. Aislamiento de hongos fitopatógenos**

Para el aislamiento de los hongos se tomó una sección de cada una de las muestras, se colocaron en diferentes vasos de precipitación y se agregó una solución de hipoclorito de sodio al 2% con agitación constante durante 1 min para eliminar microorganismos epífitos. Después se realizaron tres lavados con agua autoclavada durante 1 min para descartar contaminantes y restos de hipoclorito de sodio. Por último, se esterilizó la cámara de flujo laminar con los materiales y los medios de cultivo PDA. A continuación, se realizaron cortes de aproximadamente 1 cm del tejido afectado y se sembraron directamente en 4 cuadrantes de una placa con medio PDA (*Potato Dextrose Agar*). Las cajas Petri fueron colocadas en una incubadora a 25°C durante 7 días, tiempo en el cual se observó crecimiento (Madigan, Martinko, Bender, Buckley, & Stahl, 2015; Pugliese, Gullino, Garibaldi, & Marengo, 2014). Cabe mencionar que el medio PDA es ampliamente utilizado en el aislamiento de hongos, ya que posee los nutrientes necesarios para que estos microorganismos se desarrollen correctamente (Zimbro, Power, Miller, Wilson, & Johnson, 2009).

### **4.2.2. Obtención de cultivos axénicos**

Los hongos provenientes de la siembra en PDA que presentaron morfología macroscópica y microscópica similar a *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. se purificaron hasta lograr un cultivo axénico. Para ello, se transfirió un pequeño segmento de micelio a un nuevo medio de cultivo mediante una aguja de inoculación esterilizada por flameo y se incubó a 25°C durante 7 días (Narayanasamy, 2013). Se emplearon los medios de PDA para *Fusarium* spp. y

PDA, MEA (*Malt Extract Agar*) y CMA (*Corn Meal Agar*) para *Alternaria alternata* (Campbell, Johnson, & Warnock, 2013).

#### **4.2.3. Identificación morfológica y morfométrica**

##### **4.2.3.1. Morfología macroscópica**

Los cultivos puros se observaron después de 5 a 7 días de su crecimiento y se compararon con evidencia bibliográfica de guías y libros con descripciones morfológicas de los géneros *Fusarium* y *Alternaria*. Los libros utilizados fueron *Alternaria: An Identification Manual* (Simmons, 2007), *The Fusarium Laboratory Manual* (Leslie et al., 2006), *Compendium of Soil Fungi* (Domsch, Gams, & Anderson, 2007) y *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (Watanabe, 2010).

##### **4.2.3.2. Morfología microscópica**

Para la identificación de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. en base a estructuras morfológicas microscópicas, los cultivos puros se observaron en un microscopio campo claro-campo oscuro (Olympus BX43F) en 40X de aumento, a través de la tinción de un pequeño fragmento de cada uno de los hongos con los colorantes azul de metileno y ácido láctico en un portaobjetos (González, Diamont, & Gutiérrez, 2011).

Adicionalmente, se realizaron microcultivos en medio PDA. Para ello, se esterilizó un portaobjetos, cubreobjetos y papel filtro dentro de una caja Petri. Se añadió 1 ml de agua destilada en el papel filtro, se colocó una sección de medio sólido PDA en el centro del portaobjetos, se cubrió con el cubreobjetos y se trasladó un segmento de micelio de cultivo puro. El medio de cultivo fue retirado cuidadosamente después de 7 días de incubación a 25°C, de tal manera que las conidias y parte de micelio queden impregnadas en el portaobjetos, al cual se colocó ácido láctico para la observación de los hongos en el microscopio.

#### **4.2.3.3. Morfometría**

Se midieron las dimensiones de las conidias de los hongos a través del microscopio campo claro-campo oscuro (Olympus BX43F) mediante el software *Olympus cellSens* (Olympus, 2009) y en un microscopio láser confocal (Olympus Fluoview FV1000). De igual forma, a través de las medidas y de los libros: *Alternaria: An Identification Manual* (Simmons, 2007), *The Fusarium Laboratory Manual* (Leslie et al., 2006), *Compendium of Soil Fungi* (Domsch et al., 2007) y *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi* (Watanabe, 2010), se identificó los hongos a nivel de especie.

#### **4.2.4. Identificación por pruebas bioquímicas**

##### **4.2.4.1. BIOLOG**

Se utilizó el ensayo BIOLOG, el cual se basa en la aplicación de varias pruebas bioquímicas como un sistema de identificación bacteriana y fúngica. Este método es rápido y permite la detección e identificación de una amplia variedad de hongos (Narayanasamy, 2013).

Para el ensayo, se sembró el micelio de cada hongo en microplacas BIOLOG FF (*Filamentous Fungi*) y se realizaron lecturas en el equipo BIOLOG cada 24 horas durante 7 días consecutivos. El sistema BIOLOG brinda resultados procedentes de su base de datos (Biolog, 2018).

#### **4.2.5. Conservación de micelio y esporas**

Se conservaron los hongos y esporas que, en concordancia a su morfología, morfometría y ensayos bioquímicos, correspondieron a especies del género *Alternaria* y *Fusarium*. Este proceso es de vital importancia ya que períodos prolongados de crecimiento en medio de cultivo artificial generan cambios

morfogenéticos que podrían afectar en su identificación a futuro. De esta manera, el método de conservación mantiene la pureza, viabilidad y estabilidad morfológica y genética de los microorganismos (Panizo, Reviákina, Montes, & González, 2005).

La conservación se realizó mediante dos métodos, los cuales reducen el metabolismo del microorganismo a casi cero, lo que permite el almacenamiento a largo plazo. El primer método, de conservación en agua estéril, se basa en extender la vida de un cultivo fúngico en agar hasta por diez años o incluso más. Para ello se autoclavaron tubos de ensayo con 10 ml de agua destilada durante 20 min a  $15 \text{ lb in}^{-2}$ . Posteriormente se suspendieron pequeños fragmentos circulares de hongo junto con el medio de cultivo en donde se desarrollaron los hongos y se almacenaron a  $8^{\circ}\text{C}$  (Satyanarayana, Deshmukh, & Johri, 2017). El otro método de conservación se denomina criopreservación en peptona y sucrosa. El principio radica en que todas las funciones metabólicas permanecen en un estado prolongado de dormancia mediante la congelación de las estructuras fúngicas. La función de las soluciones de peptona y sucrosa es proteger la membrana celular de la acción destructiva del congelamiento (Gutiérrez, Bustamante, & Buitrago, 2009). Este método consistió en colocar fragmentos del hongo en papel, para lo cual se cubrieron los cultivos axénicos con sucrosa (10% p/v) y peptona (20% p/v), se adicionaron trozos de papel autoclavado de  $0.5 \text{ cm}^2$ , se dejó reposar durante 10 min y se raspó mediante un asa de Digrafsky de vidrio con el fin de que el micelio quede impregnado en el papel; finalmente se colocaron los trozos en tubos Falcon a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

#### **4.2.6. Obtención de cultivos monospóricos**

Se obtuvieron cultivos monospóricos mediante la técnica de colonia (Cañedo & Ames, 2004). En primer lugar, se preparó una solución de Tween 80 al 0.1% y se esterilizó por autoclave durante 15 min. Seguidamente, se realizaron diluciones seriadas de las esporas de los hongos en agua destilada estéril, para lo cual se añadió 1 ml de la solución preparada de Tween 80 en un tubo

Falcon. Se colocó una porción del cultivo puro del hongo y se agitó en un vórtex entre 15 a 20 s con el fin de separar las esporas. Posterior a ello, se contó el número de esporas en una cámara de Neubauer mediante un microscopio y se realizó una segunda dilución al traspasar 100  $\mu$ L de la suspensión anterior en 900  $\mu$ L de agua destilada estéril. Con esta dilución se obtuvo una concentración de 50 a 100 esporas por mL, lo cual es lo recomendable para la obtención de un cultivo monospórico. Finalmente, se sembró 100  $\mu$ L de dicha dilución a una caja Petri con medio PDA y se esparció con un asa de Drigalski bajo condiciones asépticas.

#### **4.2.7. Identificación por métodos moleculares**

Los análisis que se detallan a continuación se realizaron en el laboratorio de Biología Molecular de Agrocalidad, a excepción de la secuenciación, que fue enviada a la empresa *Macrogen* en Corea del Sur.

##### **4.2.7.1. Extracción de ADN**

Se obtuvieron aislados fúngicos, tanto de *Alternaria alternata* como de *Fusarium* spp., procedentes de los cultivos monospóricos. Se colocó 0.1 g de micelio en un mortero, se añadió una pequeña cantidad de nitrógeno líquido y se procedió a macerar hasta pulverizarlo. El producto de esta maceración se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml. Se empleó el kit PhytoPure® Genomic DNA Extraction Kit siguiendo el protocolo para 0.1 g de aislado fúngico que sugiere el fabricante y se explica en el Anexo 1 (House, Park, & Road, 2016). Finalizada la extracción, se procedió a cuantificar el ADN extraído a través de un espectrofotómetro de microvolumen NanoDrop™ 8000 UV-Vis en el cual se colocaron 3  $\mu$ L de muestra en cada canal (Thermo Scientific, 2010).

##### **4.2.7.2. PCR**

Para la identificación molecular de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp., se empleó la técnica de la PCR con primers específicos. En el caso de *Alternaria*

*alternata* se amplificó la región ITS con los primers ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') descritos por Pavón, González, Martín, & Lacarra (2012) cuyo producto de amplificación corresponde a 570 pb. Por otro lado, para *Fusarium* spp. se amplificó el gen EF-1 $\alpha$  (Factor de Elongación 1-alfa) con los cebadores Ef-1 (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC 3') y Ef-2 (5' GGARGTACCAGTSATCATG 3') que abarca 680 pb, tal como se describe en Karlsson et al. (2016). Es importante mencionar que el gen ITS permite la identificación de hongos en general, mientras que el gen EF-1 $\alpha$  es específico para la identificación de especies del género *Fusarium*.

La reacción de PCR para la amplificación de las regiones ITS1 e ITS4 de *Alternaria alternata* consistió en 46  $\mu$ L de *Master mix* y 4  $\mu$ L de ADN extraído de cada una de las muestras, con lo que se obtuvo un volumen final de 50  $\mu$ L. El *Master mix* se preparó con agua libre de nucleasas, Buffer de PCR (Invitrogen) a una concentración 1X, Cloruro de Magnesio (MgCl<sub>2</sub>) (Invitrogen) a 1.5 mM, dNTP's (Promega) a 0.2 mM, primers ITS1 e ITS4 a 0.5  $\mu$ M, y enzima *Platinum Taq DNA Polymerase* a una concentración de 1U. Estos reactivos se adicionaron en el mismo orden mencionado, finalizando con la adición del ADN de cada muestra. El control negativo fue 4  $\mu$ L de agua libre de DNasas y el control positivo fue ADN de *Lasiodiplodia theobromae*.

Para la amplificación del gen EF-1 $\alpha$  de *Fusarium* spp., la reacción de PCR se basó en 45  $\mu$ L de *Master mix* y 5  $\mu$ L de ADN extraído de cada una de las muestras, con lo que se obtuvo un volumen final de 50  $\mu$ L. Las concentraciones de los reactivos para preparar el *Master mix* fueron las mismas que en la amplificación con ITS. El control negativo constó en 5  $\mu$ L de agua libre de DNasas y como control positivo se usó ADN de *Fusarium solani*.

Una vez ensambladas las reacciones finales, se establecieron las condiciones específicas de cada PCR en un Termociclador (*BIO-RAD T100 Thermal Cycler*) para ambas regiones (ITS y EF-1 $\alpha$ ). En el caso de la región ITS se empleó: una desnaturalización inicial por 3 min a 95°C, 35 ciclos de: desnaturalización a

94°C por 1 min, hibridación a 58°C por 30 s, elongación a 72°C por 1 min, y por último una elongación final a 72°C por 7 min. En el caso del gen EF-1 $\alpha$ , la desnaturalización inicial y la elongación final llevan las mismas condiciones de PCR para ITS, sin embargo, los 35 ciclos consistían en: desnaturalización a 94°C por 40 s, hibridación a 52°C por 30 s, y elongación a 72°C por 1 min.

#### **4.2.7.3. Electroforesis**

Los productos de amplificación fueron observados mediante electroforesis en gel, para lo cual se preparó un gel de agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X, al que se añadió 3  $\mu$ L de *Promega Diamond™ Nucleic Acid Dye* para teñir los amplicones y facilitar su visualización. El gel se colocó en una cámara de electroforesis *BIO-RAD* hasta su gelificación. Se procedió a preparar el marcador de peso molecular con 4  $\mu$ L de *Invitrogen Low DNA Mass Ladder* más 1  $\mu$ L de buffer de carga *Invitrogen™ BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X)*. De igual manera, se prepararon las muestras y los controles con 4  $\mu$ L del producto de PCR o del control más 1  $\mu$ L de buffer de carga. El tiempo de corrida del gel se programó a 100 V durante 30 min. Pasado dicho tiempo, las bandas se visualizaron en un transiluminador modelo DR-46B.

#### **4.2.7.4. Secuenciación y análisis de secuencias**

Los productos obtenidos en la PCR, que presentaron resultados positivos, fueron enviados a la empresa *Macrogen* en Corea del Sur para su secuenciación (método sanger por electroforesis capilar). Las secuencias obtenidas fueron editadas en el programa *Geneious R9*. Se eliminaron gaps y picos de mala calidad observados en los electroferogramas. Las secuencias editadas se compararon contra la base de datos *GenBank* del *NCBI* (National Center for Biotechnology Information) mediante la herramienta *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*) y adicionalmente contra las bases de datos *Q-bank* en el caso de *A. alternata* y *Fusarium MLST* en el caso de *Fusarium*. Por último, se empleó el software *MEGA* versión 7.0 para realizar el alineamiento

de las secuencias obtenidas y sus correspondientes árboles filogenéticos. Es importante mencionar que todos los alineamientos se realizaron en el programa *Geneious* en base al algoritmo *Log-Expectation (MUSCLE)*, el cual permite la comparación de secuencias múltiples de proteínas y nucleótidos. Mientras que los árboles filogenéticos se obtuvieron con el algoritmo *Neighbor-joining (NJ)* usando 1000 repeticiones de *Bootstrap* como medida de soporte. El árbol presentado en este trabajo corresponde al consenso de todos los árboles generados por *Bootstrap*. (Nei & Kumar, 2000).

#### **4.2.8. Análisis estadístico de resultados**

No se aplicó un análisis estadístico específico, debido a que los datos que se obtuvieron en el presente estudio fueron mayormente cualitativos. Los únicos datos cuantitativos fueron los valores de las mediciones de las colonias y conidias de *Alternaria alternata* y *Fusarium spp.*, los cuales fueron analizados a través de estadísticos de tendencia central. En este caso solamente se utilizó la media o promedio ya que éste es el valor que típicamente se usa al analizar una distribución (Berg & Latin, 2008).

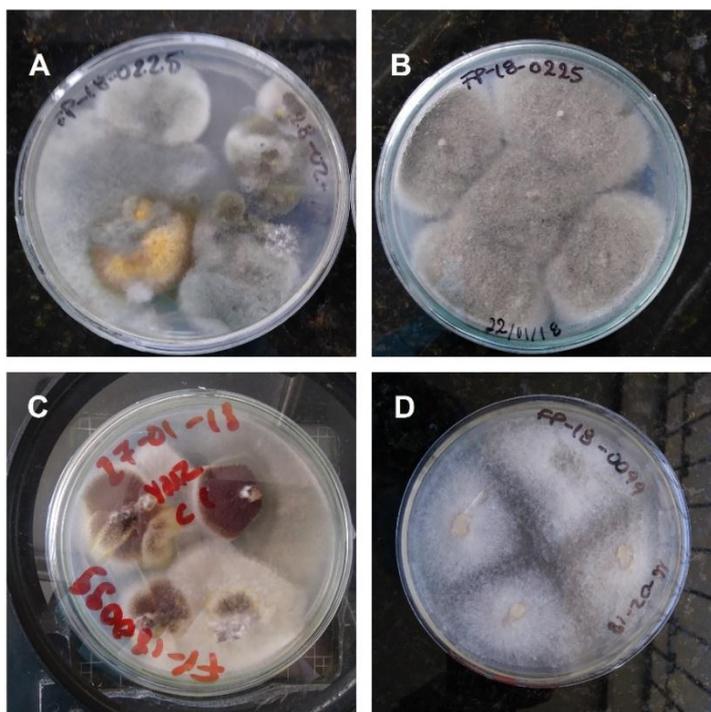
## **5. CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Aislamiento de *Alternaria alternata* y *Fusarium spp.***

Los datos generales de las 53 muestras de plantas de uva con aparente sintomatología relacionada a *Alternaria alternata* y *Fusarium spp.* se observan en la Tabla 1 del Anexo 2. Al sembrar las muestras en el medio de cultivo PDA, trece cepas presentaron una morfología macroscópica semejante a hongos del género *Alternaria*, las cuales fueron aisladas y purificadas. De este grupo, dos cepas provenían de Santa Elena, nueve de Pichincha y dos del Carchi (Tabla 2 del Anexo 2). En el caso de *Fusarium*, de igual manera trece cepas fueron morfológicamente similares a hongos de este género, siete provenían de la provincia de Santa Elena, una de Pichincha, una de Guayaquil, tres del Carchi y una de El Oro (Tabla 3 del

Anexo 2).

A pesar de la selección de las muestras en base a sintomatología de *Fusarium* y *Alternaria* y de las precauciones para evitar contaminación, existió crecimiento de hongos endófitos que fueron eliminados (sección procedimientos). En la Figura 8 se puede observar una muestra de placas de cultivo antes y después de la purificación.

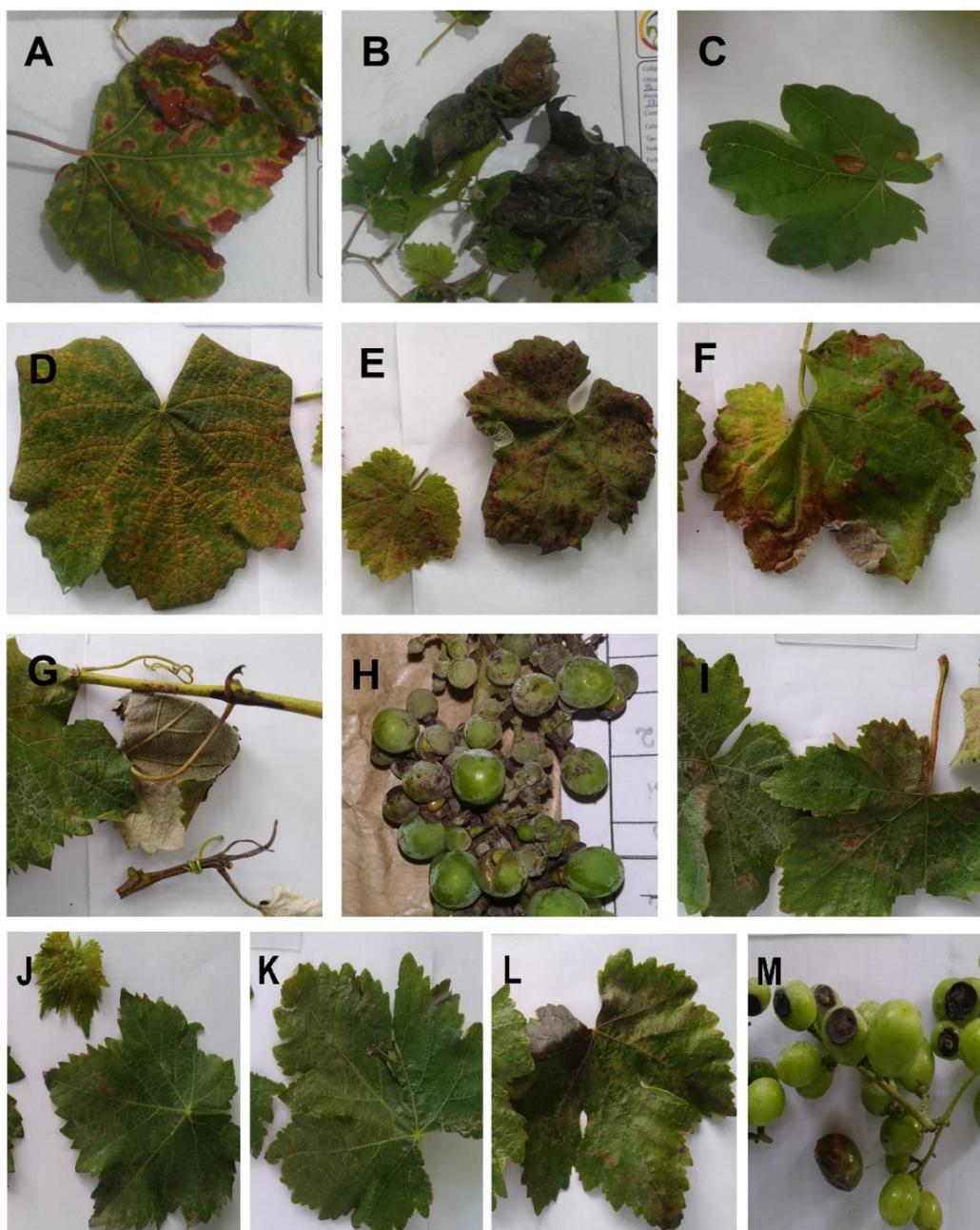


**Figura 8.** Aislamiento y purificación de hongos.

- A:** Muestra de *A. alternata* antes de la purificación
- B:** Cepa pura de *A. alternata*
- C:** Muestra de *Fusarium* spp. antes de la purificación
- D:** Cepa pura de *Fusarium* spp.

La sintomatología de los posibles hongos del género *Alternaria* se muestra en la Figura 9. Se destacan tallos con manchas entre marrón oscuro a negro en forma de anillo concéntrico (Figura 9 G), lesiones en las hojas (Figura 9 A-F e I-L) y manchas negras o micelio esponjoso en los frutos (Figura 9 H y M). En la Figura 10 se presentan las muestras con sintomatología relacionada a *Fusarium* spp., abarcando pudrición en raíces; micelio blanquecino (Figura 10 B-D y J, K, M); lesiones de color marrón claro en las hojas (Figura 10 E-I y L);

áreas necróticas en los tallos (Figura 10 H) y pudrición en frutos (Figura 10 A).



*Figura 9.* Manchas negras u oscuras en forma de anillo concéntrico y pudrición en tallo, hojas y frutos de uva, posiblemente ocasionada por *Alternaria alternata*.

Códigos de muestra:

**A:** FP-18-102

**B:** FP-18-108

**C:** FP-18-217

**D:** FP-18-218

**E:** FP-18-222

**F:** FP-18-223

**G:** FP-18-224

**H:** FP-18-225

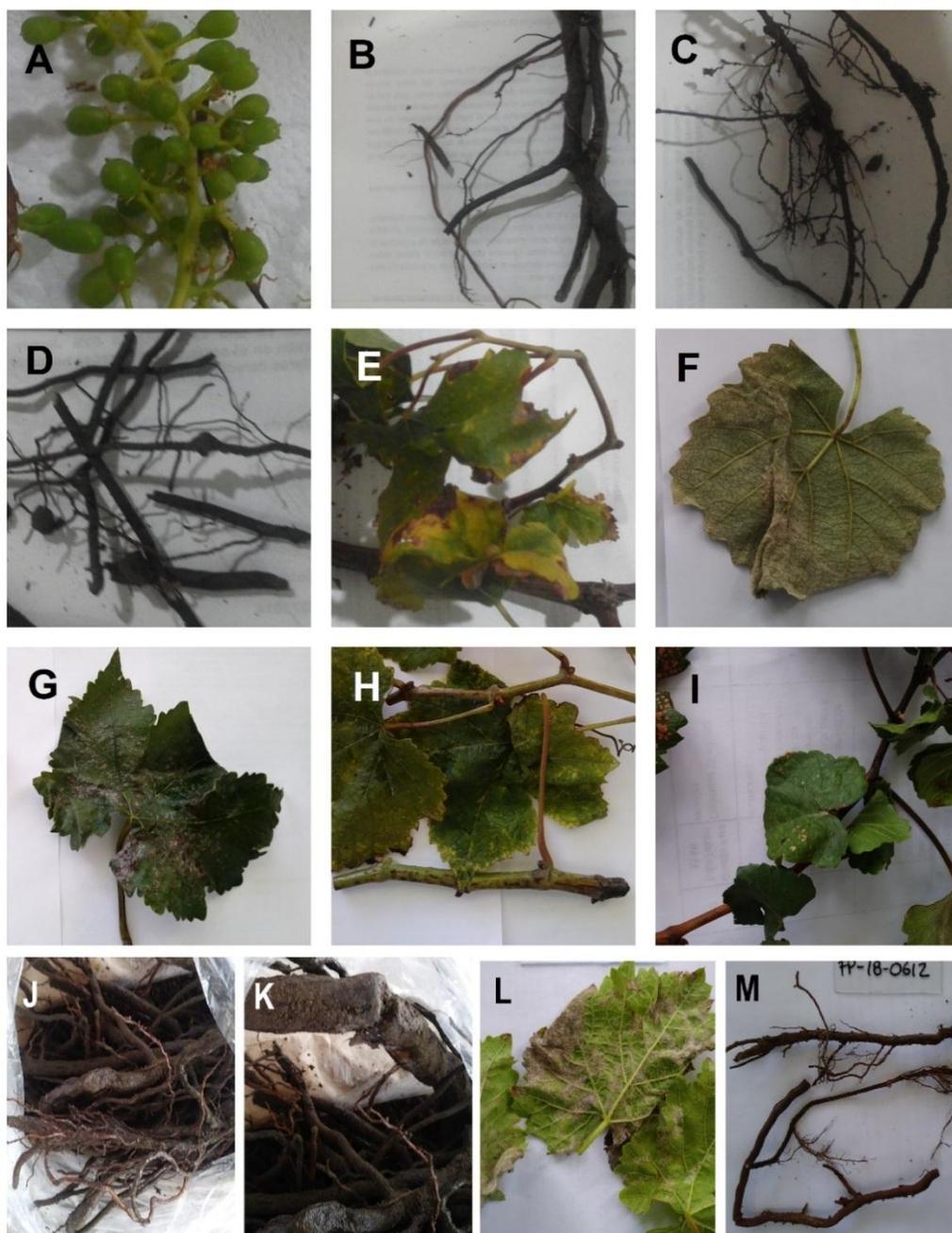
**I:** FP-18-316

**J:** FP-18-318

**K:** FP-18-320

**L:** FP-18-587

**M:** FP-18-591



*Figura 10.* Pudrición de raíz, presencia de micelio blanquecino y antracnosis en tallo, hojas y frutos de uva posiblemente ocasionados por *Fusarium*.

Códigos de muestra:

**A:** FP-18-099

**B:** FP-18-103

**C:** FP-18-104

**D:** FP-18-106

**E:** FP-18-107

**F:** FP-18-219  
**G:** FP-18-270  
**H:** FP-18-271  
**I:** FP-18-575  
**J:** FP-18-585  
**K:** FP-18-589  
**L:** FP-18-594  
**M:** FP-18-612

La selección de las muestras por sintomatología relacionada al posible hongo *A. alternata*, se basó en literatura previa. Según el estudio de Swart, Lennox, & Holz (1995) en uva, *A. alternata* causa pudrición de las bayas que se caracteriza por lesiones superficiales de color marrón oscuro a negro cerca del pedicelo, y mechones grises, esponjosos de hongos que crecen en el raquis y pedicelos, lo que se aproxima a lo observado en el presente estudio. De igual manera, en los cultivos de uva de la India se describen síntomas como la producción de anillos concéntricos alrededor de la zona de infección de este fitopatógeno (Mamgain, Roychowdhury, & Tah, 2013).

De igual manera para *Fusarium* spp., los síntomas que se encontraron en este estudio se aproximaron a los encontrados en otros trabajos como el de Parikh, Kodati, Eskelson, & Adesemoye (2018) y de Omer, Granett, & Wakeman (1999) en los cuales se verificó que este agente fúngico causa pudrición de las raíces en uva. Según Forero et al. (2018) *F. oxysporum* es la especie causal del marchitamiento vascular, mientras que *F. solani* puede originar necrosis en la base del tallo de uva, síntomas que también se observaron en las muestras analizadas, lo que podría indicar la presencia de estas dos especies en los cultivos.

## **5.2. Identificación morfológica y morfométrica**

De las 26 cepas aisladas inicialmente por morfología macroscópica que se presumieron son hongos de los géneros *Alternaria* y *Fusarium*, al realizar la

identificación por morfología microscópica se determinó que el 42% (11 muestras) correspondió a *Alternaria alternata*, 35% (9 muestras) a *Fusarium* spp. y el 23% restante consistió en hongos diferentes a los esperados como *Neopestalotiopsis*, *Plasmopara viticola*, *Verticillium* y *Diplodia* que de igual manera son patógenos en uva (Figura 11).

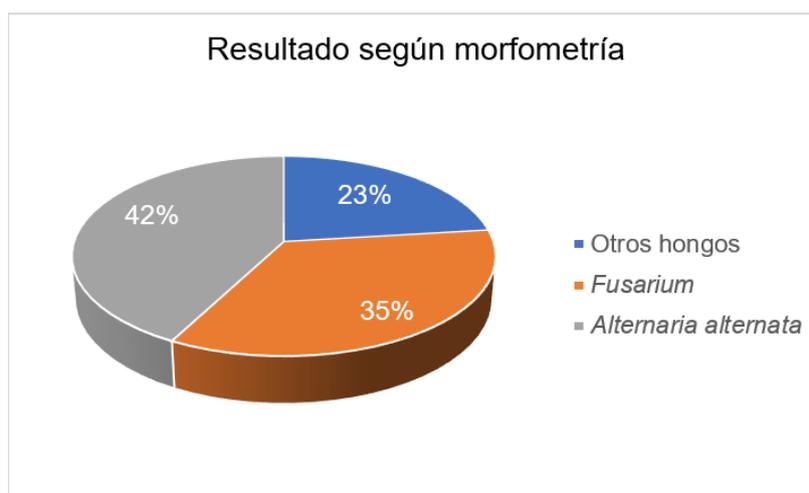


Figura 11. Porcentaje de hongos encontrados en muestras de plantas de uva.

### 5.2.1 *Alternaria alternata*

En el medio de cultivo PDA *A. alternata* presentó coloración verde oliva o verde grisáceo claro con bordes blancos durante los primeros 4 días de crecimiento en el anverso de la caja Petri (Figura 12 A1) y color marrón claro en el reverso (Figura 12 A2), para luego a los 7 días tornarse de color verde grisáceo o verde oliva oscuro (Figura 14 B1) y el reverso de color negro con bordes marrones (Figura 12 B2). En algunos casos, la coloración de los primeros días fue de marrón grisáceo (Figura 12 C1) con el anverso verde oscuro con bordes crema (Figura 12 C2) que con el tiempo varió a una colonia de tono verde oliva oscuro (Figura 12 D1) con el reverso negro con bordes crema (Figura 12 D2). Estos resultados se apoyan con los de Valencia, Páez, Guevara, & Vilaplana (2016), quienes describen la coloración verde oliva con borde blanco en medio PDA como aspecto característico del género *Alternaria*. De igual manera Bautista (2014), menciona que las colonias típicas de *A. alternata* pueden variar de color

verde lechuga a verde oliva y generalmente poseen un margen blanco de 2 a 5 mm en este mismo medio, lo cual también se pudo evidenciar en las colonias aisladas de *A. alternata* en este estudio.

El tamaño de las colonias alcanzó de 40 a 45 mm de diámetro a los 7 días de incubación a 25°C (Figura 12 B y D). Estas dimensiones se aproximaron a las obtenidas en el estudio de López et al., 2013 cuyo rango de crecimiento osciló entre 30 a 40 mm a la misma temperatura y período de incubación.

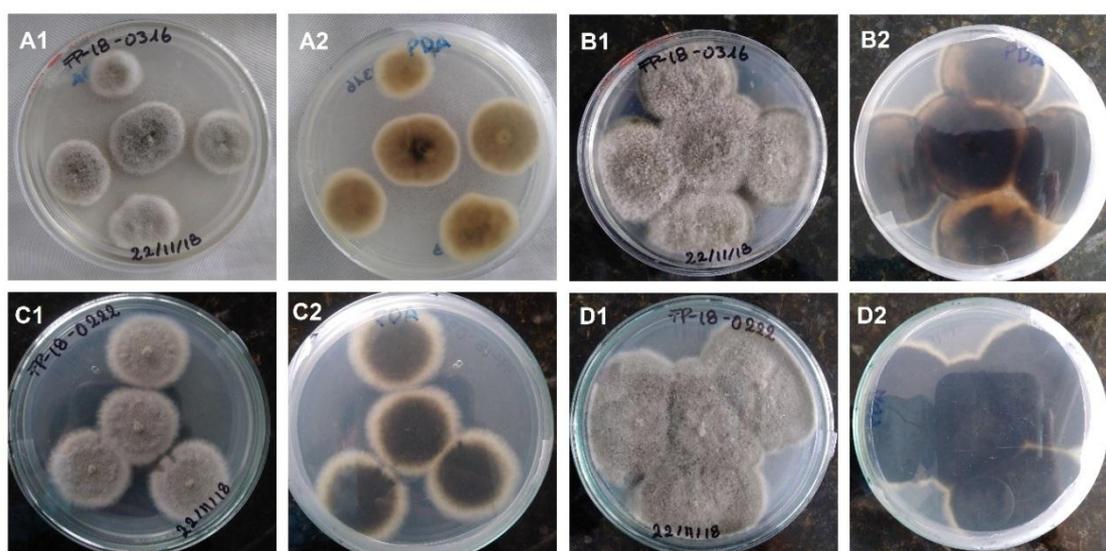


Figura 12. Crecimiento de *A. alternata* en medio PDA a 25°C.

**A, C:** 4 días de incubación

**B, D:** 7 días de incubación

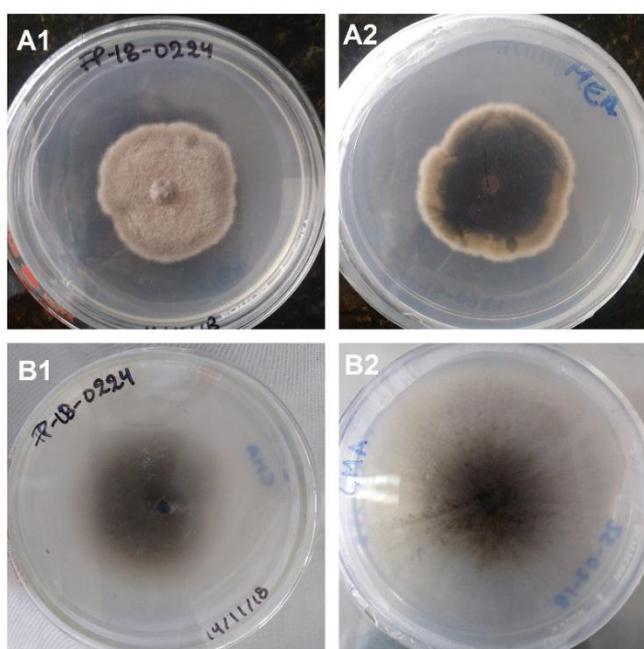
**1:** Anverso

**2:** Reverso

En medio MEA a 25°C y a 7 días de incubación, las colonias fueron de color marrón claro a grisáceo por el anverso y de color negro verdoso con bordes marrón claro por el reverso (Figura 13 A1 y A2, respectivamente) y alcanzaron un tamaño entre 45 y 50 mm. En el estudio realizado por Pitt & Hocking (2009), los diámetros de las colonias de *A. alternata* se encontraron en el rango entre 50 a 70 mm (7 a 10 días) con un micelio marrón blanquecino y con el reverso de coloración negruzca, lo que se relaciona con lo obtenido

en el presente estudio.

En medio CMA a las mismas condiciones, la coloración fue verde olivo oscuro tanto en el anverso como reverso (Figura 13 B1 y B2) y con un tamaño de 60 a 80 mm al inocular en un solo punto del medio, sin embargo, la cantidad de micelio superficial fue mínima en comparación a los otros medios. Dichas características se asemejan a las del estudio de Pitt & Hocking, 2009, quienes obtuvieron un crecimiento de colonias entre 60 a 70 mm con micelio gris a gris oscuro o negro.



**Figura 13.** Crecimiento de *A. alternata* en 7 días de incubación a 25°C en diferentes medios de cultivo.

**A:** MEA (*Malt Extract Agar*)

**B:** CMA (*Corn Meal Agar*)

**1:** Anverso

**2:** Reverso

A nivel microscópico en tinción con ácido láctico, los conidióforos de *A. alternata* fueron de color marrón claro y produjeron conidias fusiformes, septadas de color marrón con 4 a 7 septos transversales y en pocos casos septos longitudinales, como se puede observar en las imágenes de la Tabla

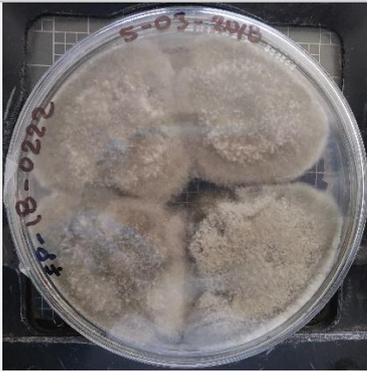
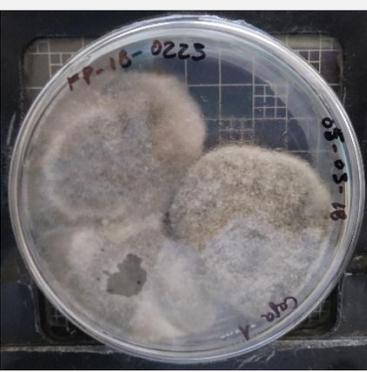
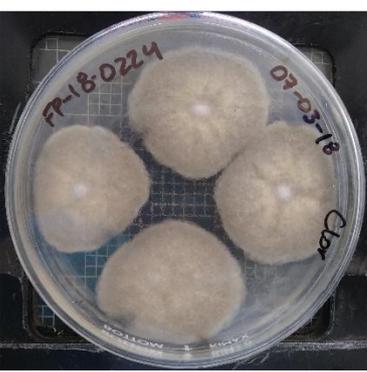
4. La forma y la cantidad de septos que se presentaron son similares a los descritos en el manual de Watanabe, 2010. De igual manera, la tinción con azul de metileno reflejó conidióforos y conidias con las mismas características, sin embargo, de color verde olivo. En ciertos aislados fúngicos, las conidias estaban dispuestas a manera de cadenas largas y ramificadas, como es el caso de los hongos con codificación FP-18-218, FP-18-224 y FP-18-318; mientras que, en otros aislados, estas estructuras se encontraban dispersas, tal como se observa en los hongos de codificación FP-18-222 y FP-18-320 dentro de la Tabla 4. En este aspecto, Pitt & Hocking (2009), mencionan que dichas estructuras pueden disponerse en cadenas ramificadas o dispersas, resultado que coincide con las observaciones obtenidas en el presente estudio.

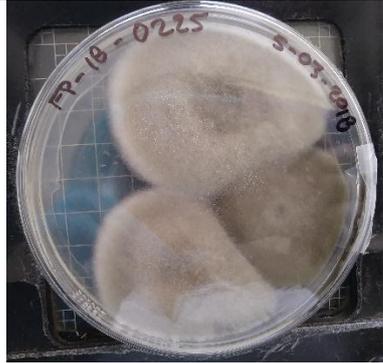
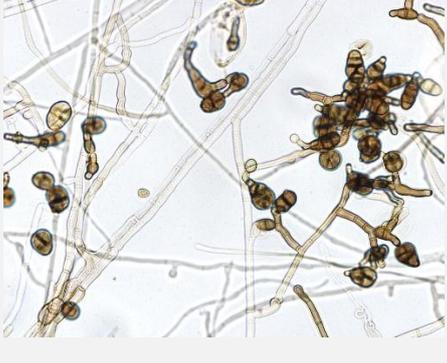
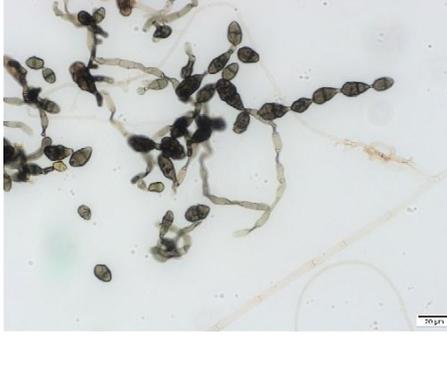
En las conidias se observó un tamaño promedio de 25.45  $\mu\text{m}$  de largo por 9.54  $\mu\text{m}$  de ancho, valores que se acercan considerablemente a los de Simmons, 2007, es decir 23.50  $\mu\text{m}$  por 8.50  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, respectivamente. Además, se encuentran dentro del rango del manual de Watanabe, 2010, es decir de 18 a 45  $\mu\text{m}$  por 6.5 a 15.5  $\mu\text{m}$ . De igual forma, los datos del estudio se comparan con los de Bautista, 2014 quien obtuvo un tamaño de 20 a 50  $\mu\text{m}$  de largo.

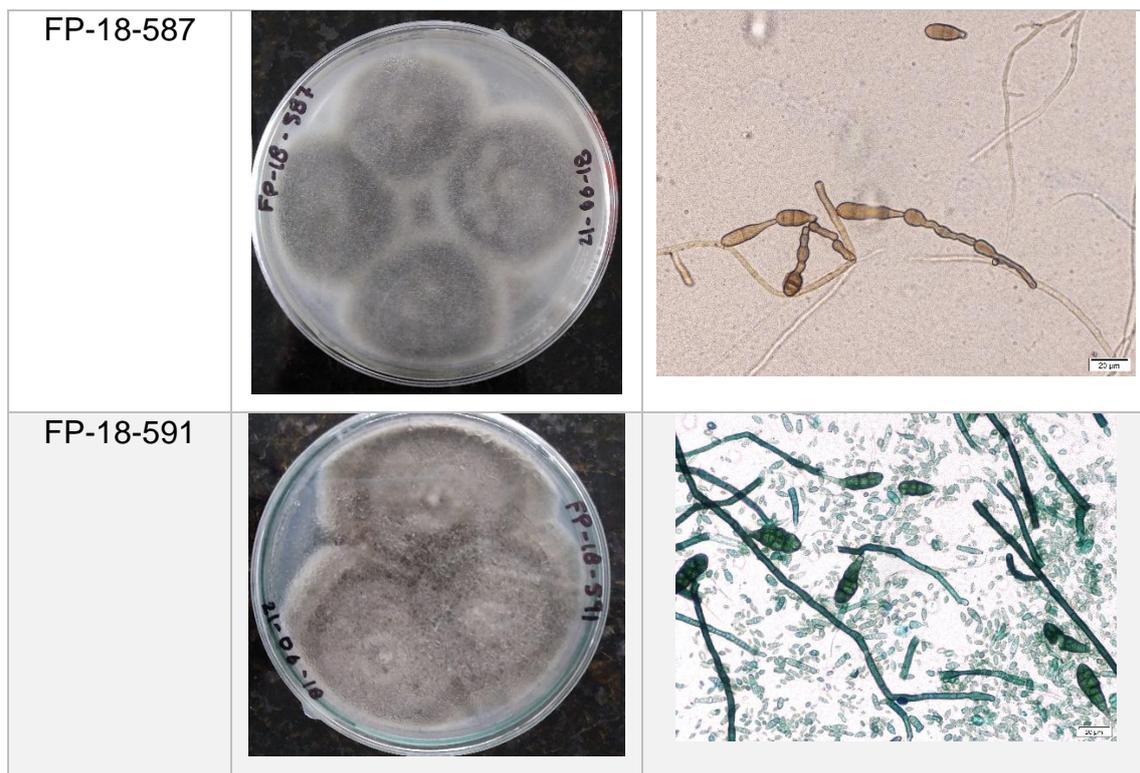
Tabla 4

*Fotografías macroscópicas y microscópicas de A. alternata aislada de muestras de uva*

<b>Código de Laboratorio</b>	<b>Fotografía macroscópica</b>	<b>Fotografía microscópica a 40X</b>
FP-18-108		

FP-18-218		
FP-18-222		
FP-18-223		
FP-18-224		

FP-18-225		
FP-18-316		
FP-18-318		
FP-18-320		



### 5.2.2 *Fusarium* spp.

A nivel macroscópico, en medio de cultivo PDA, los hongos del género *Fusarium* presentaron colonias de coloraciones blancas con el centro color salmón o morado, lo cual se pudo observar de mejor manera al lado reverso de la caja Petri. Al colocar cuatro inóculos en una caja Petri, el tamaño de las colonias alcanzó de 40 a 45 mm de diámetro a los 7 días de incubación a 25 °C.

En la observación microscópica se pudo identificar tres posibles especies de *Fusarium*: *F. equiseti*, *F. solani* y *F. oxysporum*, los cuales se describen en el siguiente apartado.

#### 5.2.2.1 *Fusarium equiseti*

En medio de cultivo PDA, las colonias de *F. equiseti* abarcaron 50 mm de diámetro en la placa Petri. Se pudo observar una gran cantidad de micelio

esponjoso de coloración blanca con el centro ligeramente rosáceo o salmón en el anverso, mientras que por el reverso el color fue salmón con mayor intensidad en el sitio donde fue inoculada (Figura 14 A y B, respectivamente). Con el paso del tiempo, las colonias envejecieron debido al consumo del medio por lo que se tornaron de color marrón claro, suceso que ocurre normalmente según el manual de *Fusarium* de Leslie et al., 2006. Las características macroscópicas antes mencionadas se corroboran con las de Leslie et al., 2006 y Domsch et al., 2007, quienes describen a *F. equiseti* con colonias con diámetro de 50 a 58 mm a 25°C y con micelio aéreo abundante y de color melocotón a marrón.

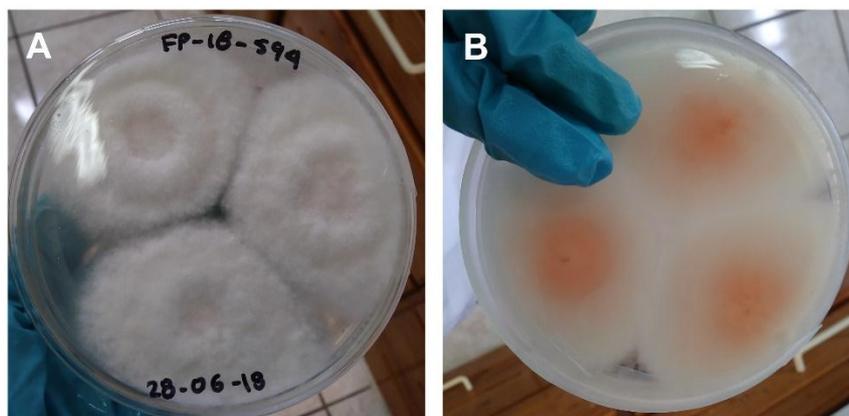


Figura 14. Crecimiento de *F. equiseti* en 7 días de incubación a 25°C en PDA

A: Anverso

B: Reverso

Los conidióforos presentaron una gran cantidad de ramificaciones (Figura 15), de las cuales surgieron macroconidas en forma de hoz o luna creciente con 4 a 6 septos, como se aprecia en las imágenes de la Tabla 5. Es importante mencionar que no se presentaron microconidias ya que *F. equiseti* no las posee. Estas características morfológicas son similares a las detalladas por Domsch et al., 2007, Leslie et al., 2006 y Watanabe, 2010.

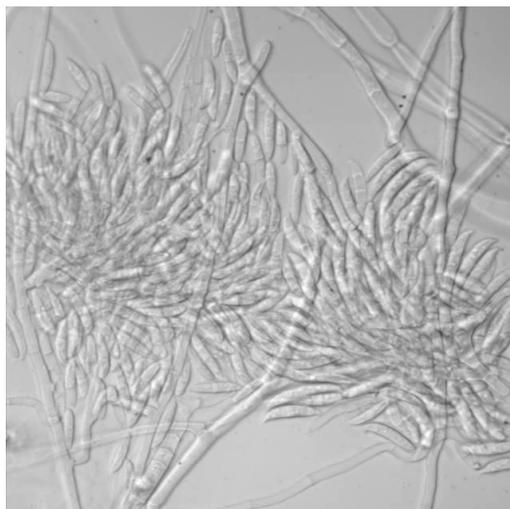
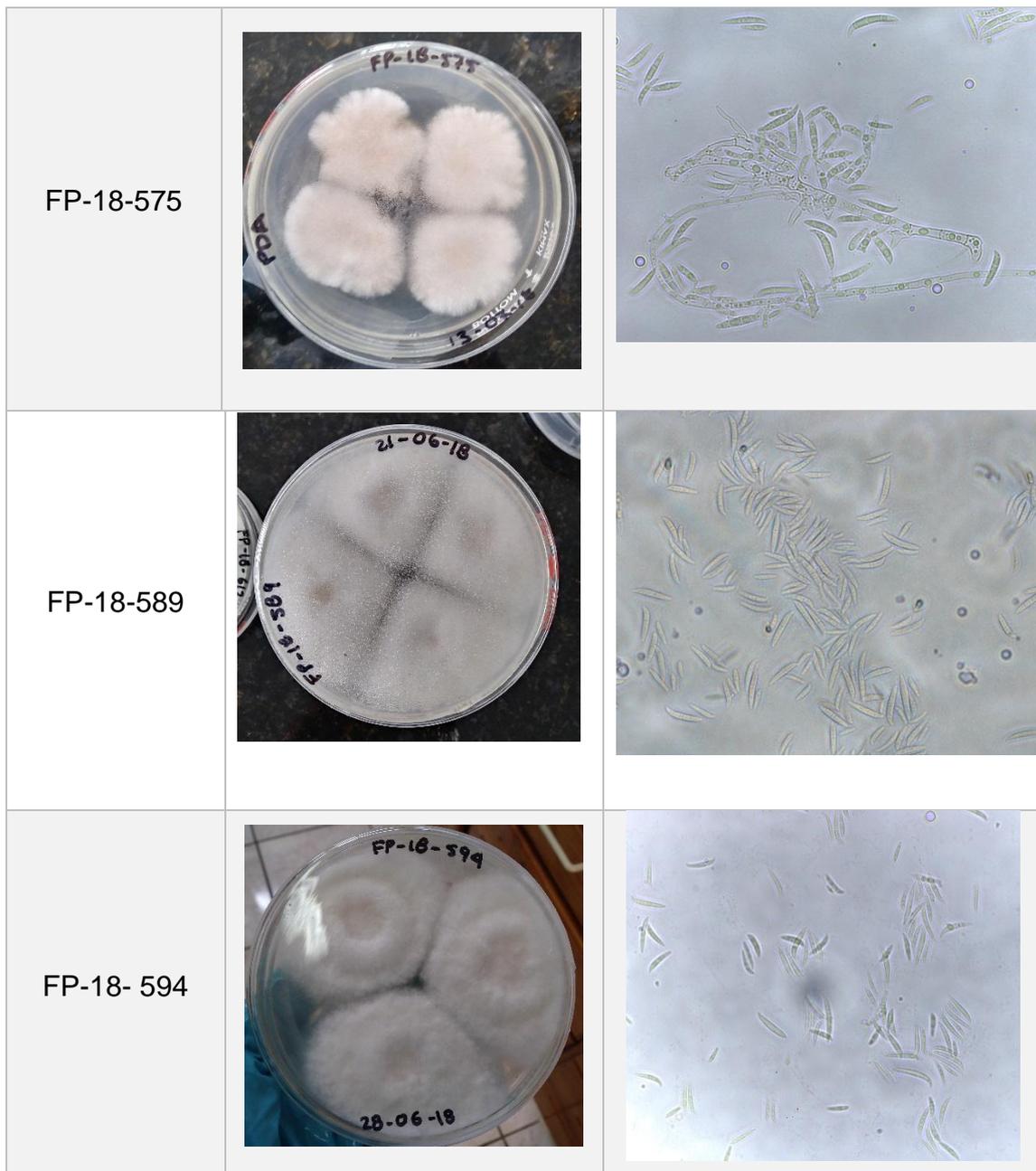


Figura 15. Conidióforos de *Fusarium equiseti*

Tabla 5

Fotografías macroscópicas y microscópicas de *F. equiseti* aislado de muestras de uva.

Código de Laboratorio	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica a 40X
FP-18-270		
FP-18-271		



El tamaño promedio de las macroconidias fue de 28  $\mu\text{m}$  por 4.2  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, respectivamente. Según Watanabe, 2010 el tamaño de estas estructuras se encuentra en un rango de 24.5 a 45  $\mu\text{m}$  por 4 a 5  $\mu\text{m}$ , valores que se relacionan a los obtenidos en la presente investigación.

### 5.2.2.2 *Fusarium oxysporum*

En medio de cultivo PDA, *F. oxysporum* desarrolló colonias de 45 a 50 mm de diámetro con micelio blanquecino con el centro lila por el anverso y morado grisáceo por el reverso, tal como se observa en la Figura 16 A y B. Según Leslie et al., 2006 y Pitt & Hocking, 2009, el micelio puede variar de color blanco con violeta pálido o magenta oscuro, o incluso mantenerse solamente blanco, características que coinciden con las observaciones del presente estudio.

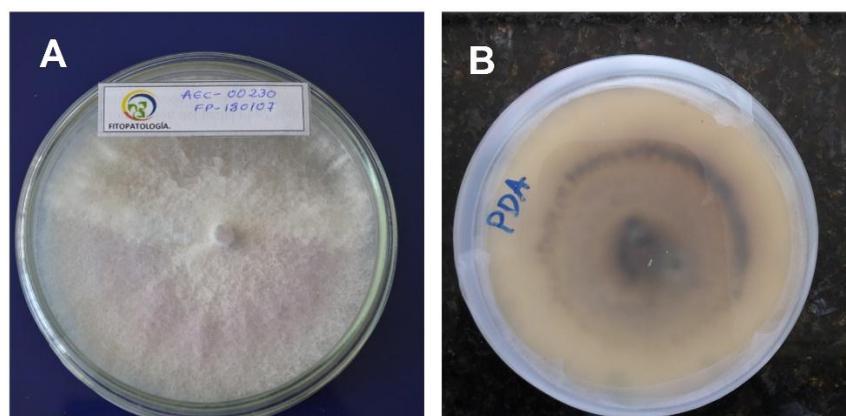


Figura 16. Crecimiento de *F. oxysporum* en 7 días de incubación a 25°C en PDA.

**A:** Anverso

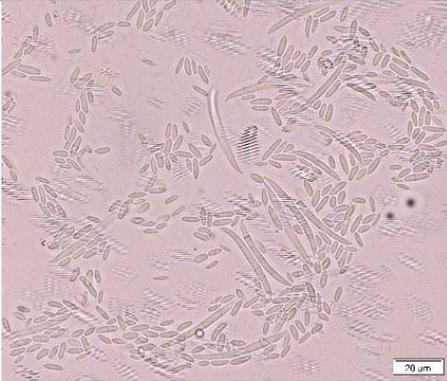
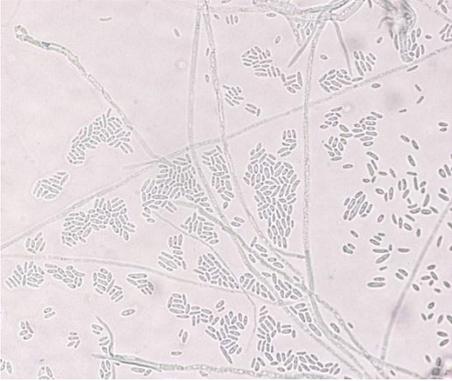
**B:** Reverso

A nivel microscópico se pudo observar macroconidias y microconidias como se aprecia en las imágenes de la Tabla 6. Las macroconidias fueron fusiformes, alargadas, ligeramente curvadas, con 4 a 5 septos y con un tamaño promedio de 38.7  $\mu\text{m}$  de largo por 3  $\mu\text{m}$  de ancho. Estos aspectos se corroboran con los descritos por Domsch et al., 2007, en donde el rango de longitud de macroconidias es de 27-46  $\mu\text{m}$ , y de ancho de 3 a 5  $\mu\text{m}$ , y con los valores reportados por Watanabe, 2010, de 29.1-45  $\mu\text{m}$  por 2.9-4.7  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, respectivamente. Por otra parte, las microconidias fueron abundantes, de forma elíptica, sin septos y con un valor promedio de 8.5  $\mu\text{m}$  de largo por 2.4  $\mu\text{m}$  de ancho. Según Domsch et al., 2007, las microconidias no poseen septos y tienen un tamaño de 5-12  $\mu\text{m}$  de largo por 2.3-3.5  $\mu\text{m}$  de ancho, rangos

dentro de los cuales se encuentran los resultados de la presente investigación.

Tabla 6

*Fotografías macroscópicas y microscópicas de F. oxysporum aislado de muestras de uva.*

Código de Laboratorio	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica a 40X
FP-18-107		
FP-18-585		

### 5.2.2.3 *Fusarium solani*

En PDA las colonias de *F. solani* crecieron en un rango de 45 a 50 mm de diámetro, fueron de color blanco a crema y con poco micelio en el anverso, mientras que por el reverso la coloración fue de crema a marrón pálido (Figura 17 A y B). A los 15 días de incubación a 25°C, se formaron esporodocios como pequeñas estructuras de color verde azulado dispuestas a manera de anillo concéntrico en la superficie del micelio (Figura 17 C). Al comparar estos resultados con el manual de *Fusarium* de Leslie et al., 2006 y con las descripciones de Pitt & Hocking, 2009, se afirma que la coloración blanco a

crema con esporodoquios turquesa, son aspectos característicos de *F. solani*.

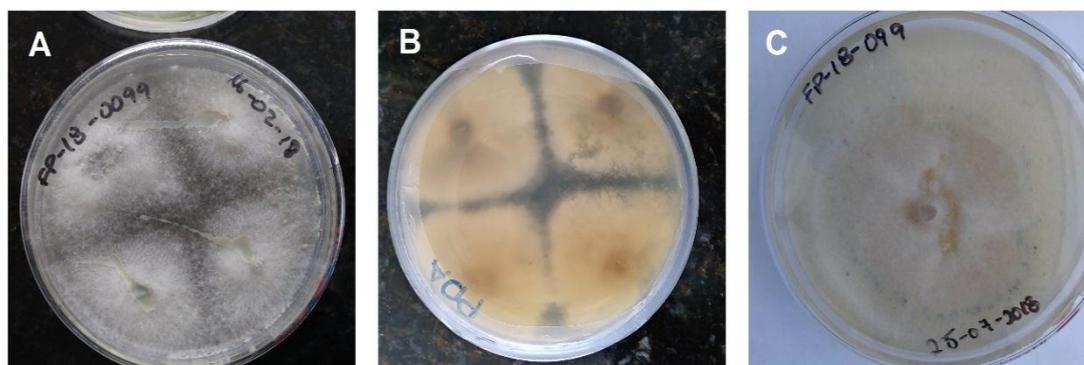


Figura 17. Crecimiento de *F. solani* en 7 días de incubación a 25°C en PDA.

A: Anverso

B: Reverso

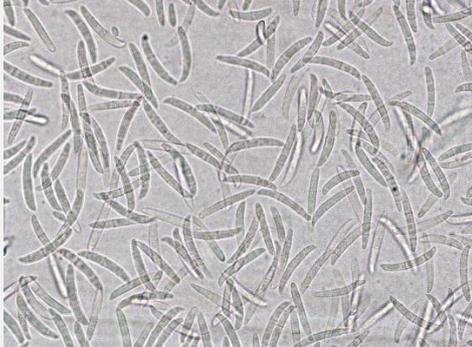
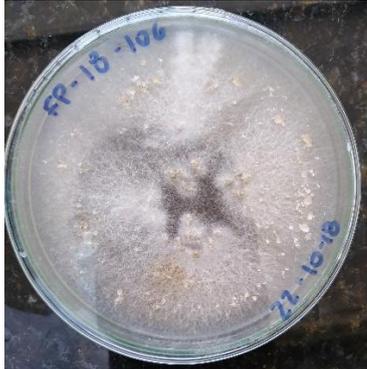
C: Presencia de esporodoquios

Las cepas presentaron macroconidias y microconidias como se observa en las imágenes de la Tabla 7. Las macroconidias tuvieron morfología alargada con vértices con terminación obtusa, con 3 o 4 septos y un tamaño promedio de 28.3  $\mu\text{m}$  de largo por 4.7  $\mu\text{m}$  de ancho. La cantidad de septos se asemeja a los obtenidos por Pitt & Hocking, 2009, es decir de 3 a 5 septos, mientras que los rangos de tamaño guardan relación con los logrados por Watanabe, 2010, los cuales fueron de 26.2-59.4  $\mu\text{m}$  de longitud por 4.6-6.8  $\mu\text{m}$  de ancho, y con los de Domsch et al., 2007, quienes obtuvieron dimensiones de 28-42  $\mu\text{m}$  por 4-6  $\mu\text{m}$  de largo y ancho, respectivamente.

Las microconidias fueron de forma oval alargada, con 0 a 2 septos y con una media de 10.2  $\mu\text{m}$  de largo por 3.1  $\mu\text{m}$  de ancho. En el estudio de Watanabe, 2010 se obtuvo un resultado de largo y ancho de 7.2 a 15  $\mu\text{m}$  y de 2.4 a 3.9  $\mu\text{m}$ , respectivamente y en el estudio de Domsch et al., 2007, valores de 8 a 16  $\mu\text{m}$  y de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , datos que son bastante cercanos a los obtenidos en el presente estudio, por lo que las estructuras identificadas muy probablemente pertenecen a *F. solani*.

Tabla 7

Fotografías macroscópicas y microscópicas de *F. solani* aislado de muestras de uva.

Código de Laboratorio	Fotografía macroscópica	Fotografía microscópica a 40X
FP-18-099		
FP-18-106		

### 5.3. Identificación bioquímica

En la Tabla 8 se aprecian los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los agentes fúngicos identificados previamente como *A. alternata*, *F. equiseti*, *F. solani* y *F. oxysporum*.

Tabla 8

Resultados obtenidos del sistema de identificación BIOLOG

Código de muestra	Identificación en BIOLOG	Probabilidad
FP-18-099	<i>Fusarium</i> sp.	*
FP-18-106	<i>Fusarium</i> sp.	*

FP-18-107	<i>Fusarium</i> sp.	*
FP-18-108	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-218	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-222	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-223	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-224	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-225	<i>Alternaria alternata</i>	0.991
FP-18-270	<i>Fusarium</i> sp.	*
FP-18-271	<i>Fusarium</i> sp.	*
FP-18-316	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-318	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-320	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-575	<i>Fusarium</i> sp.	*
FP-18-585	<i>Fusarium</i> sp.	*
FP-18-587	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-589	<i>Fusarium</i> sp.	*
FP-18-591	<i>Alternaria</i> sp.	*
FP-18-594	<i>Fusarium</i> sp.	*

Nota: \* Sin absorbancia

El sistema BIOLOG no logró identificar la especie de la mayoría de los microorganismos aislados. El único microorganismo identificado hasta especie fue el de codificación FP-18-225, que según la identificación morfológica pertenece a la especie *Alternaria alternata*, y en concordancia, el sistema BIOLOG lo identificó como tal con una probabilidad del 99%. La identificación de este hongo se obtuvo a las 72 horas de incubación a 25°C, momento en el cual se pudo observar el cambio de coloración y turbidez proporcional al consumo de los sustratos (Figura 18).

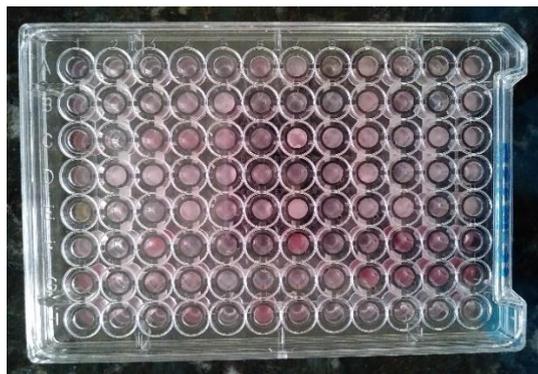


Figura 18. Microplaca BIOLOG FF con inóculo de FP-18-225 después de 72 horas de incubación a 25°C.

La base de datos del sistema BIOLOG cuenta con huellas metabólicas estandarizadas de una gran cantidad de microorganismos (BIOLOG, 2018). De esta manera, existe una huella metabólica para la identificación de *F. equiseti*, misma que pertenece a la cepa *Fusarium equiseti* (Corda) Saccardo (Saccardo, 1886); tres diferentes huellas para identificar *F. oxysporum*, las cuales corresponden a la cepa *Fusarium oxysporum* Schlechtendahl: Fries, descrita por Hoog (2000) y CABRI (2018); tres huellas para *F. solani* de la cepa *Fusarium solani* (Martius) Saccardo (CABRI, 2018) y tres huellas para *A. alternata*, específicamente de la cepa *Alternaria alternata* (Fries) Keissl descrita por Hoog (2000). Los hongos identificados morfológicamente en el presente estudio generaron huellas metabólicas que no fueron significativamente cercanas a las huellas de las cepas antes mencionadas, lo cual se refleja en la ausencia de absorbancia.

Según Pierce, Ward, & Dobbs, 2014, la inexactitud de esta técnica se debe a la presencia de ciertos inconvenientes con el método, especialmente relacionados con la densidad del inóculo y la dificultad de algunos hongos para reducir el colorante de tetrazolio. Por ende, dichos factores pudieron influir y dar origen a huellas dactilares metabólicas incompletas en la mayoría de las cepas analizadas en el presente estudio. Según Yao Su Cheng Chi, 2006, una elevada cantidad de micelio puede interrumpir la acción del lector de placas BIOLOG, generando lecturas con menor precisión, fenómeno que se habría

producido en el presente estudio.

Es importante mencionar que debido al límite de cepas presentes en la base de datos de BIOLOG, el sistema permite adicionar nuevas huellas metabólicas que hayan resultado de hongos identificados morfológicamente y que no se encuentren presentes en la base de datos o difieran de las huellas presentes.

## 5.4. Identificación molecular

### 5.4.1 Extracción de ADN

La lectura de los contenidos de material genético de los aislados fúngicos en el NanoDrop (Tabla 9), reportó que el 75% de las muestras de ADN presentaron altas concentraciones, mientras que el 25% restante mostraron concentraciones inferiores a  $40 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ . Se obtuvo una buena calidad de material genético, sin embargo, no totalmente puro, lo cual se refleja en las relaciones 260/280 y 260/230 de absorbancia. Los valores de Thermo Scientific (2016), (Tabla 10), indican que el rango de pureza óptima del material genético en la relación 260/280 es de 1.8 a 2, mientras que el rango de pureza óptima en cuanto a contaminación es de 2.0 a 2.2 en la relación 260/230. Se puede observar que, en este estudio en la relación de absorbancia de 260/280, el 55% de material genético extraído presentó una pureza óptima y aceptable, el 5% mostró la presencia de compuestos aromáticos y proteínas, mientras que el 40% evidenció contaminación por ARN. Además, los valores expuestos en la relación 260/230 indica que el 85% del material genético presenta contaminación por sales, fenoles, hidratos de carbono, entre otros.

Tabla 9

*Concentración y pureza del ADN de las muestras extraídas.*

<b>Código de Muestra</b>	<b>Concentración (ng/<math>\mu</math>l)</b>	<b>Relación (260/280)</b>	<b>Relación (260/230)</b>
FP-18-099	225.0	2.13	1.90

FP-18-106	1191	2.07	2.08
FP-18-107	2.671	2.06	-0.33
FP-18-108	1.680	0.48	0.56
FP-18-218	186.7	2.11	2.79
FP-18-222	295.8	2.14	1.54
FP-18-223	23.01	2.09	0.49
FP-18-224	27.04	3.09	0.98
FP-18-225	60.36	2.28	4.25
FP-18-270	294.8	2.05	1.25
FP-18-271	21.04	1.80	0.58
FP-18-316	1015	2.15	1.94
FP-18-318	100.2	2.01	1.92
FP-18-320	138.0	2.16	2.04
FP-18-575	381.4	1.97	1.30
FP-18-585	175.6	1.99	1.25
FP-18-587	177.7	2.13	1.71
FP-18-589	182.1	2.05	1.61
FP-18-591	332.5	2.09	2.04
FP-18-594	353.3	2.06	1.51

Tabla 10

Valores de apreciación de calidad y pureza de ADN. Tomado de NanoDrop 8000 Spectrophotometer V2.1 User Manual (Thermo Scientific, 2016)

Relación	Rango	Pureza
260/280	1.8-2	Pureza óptima
	1.6-1.8	Pureza aceptable
	<1.6	Presencia de compuestos aromáticos y

		proteínas
	>2.1	Contaminación con ARN
260/230	2.0-2.2	Rango óptimo
	<2.0	Contaminación con sales, fenoles, hidratos de carbono, etc.

La presencia de impurezas como ARN, proteínas, péptidos, hidratos de carbono, fenoles, compuestos aromáticos, etc., que se obtuvo en los resultados de este estudio (Tabla 9), afectó los valores de las relaciones de absorbancia. Estas impurezas se generaron y permanecieron desde los procesos de homogenización y lisis, así como, en la separación de proteínas y lípidos, durante la extracción, ya que ambos son pasos críticos que interfieren en la pureza y calidad del ADN. Además en estos pasos, se emplean solventes orgánicos y ciclos de centrifugación, y el uso inadecuado de uno de los dos aumenta la concentración de impurezas en el ADN (M. Kumar & Mugunthan, 2018). Uno de estos factores pudo intervenir durante la extracción ya que en los pasos 16 y 18 de la precipitación del ADN en el protocolo empleado (Anexo 1), solamente se sugiere un valor mínimo de velocidad de centrifugación, por lo que en este estudio se seleccionó un valor de 10 000 rpm.

Es importante mencionar que la concentración del ADN, así como la calidad y pureza del mismo, constituyen factores negativos que afectan el procedimiento de la PCR. No obstante, las concentraciones bajas no siempre son un obstáculo para obtener las amplificaciones deseadas (Gherbawy & Voigt, 2010). Además, pese a las impurezas presentes en el ADN de las muestras, se logró obtener secuencias de buena calidad para la identificación de las especies de *Fusarium* y *Alternaria*.

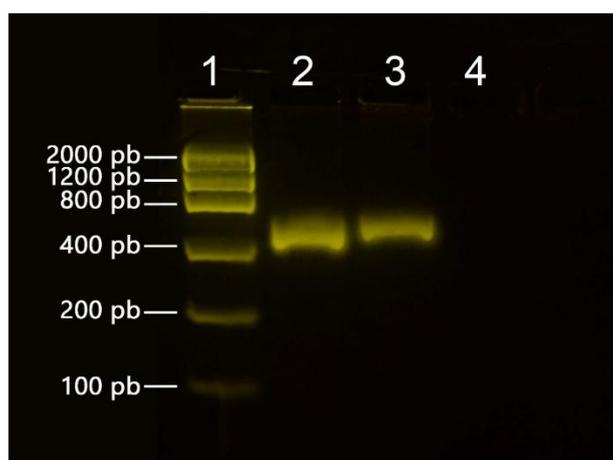
#### 5.4.2 PCR y Electroforesis

Las reacciones de PCR tanto para ITS como para EF-1 $\alpha$  concluyeron con la correcta amplificación de las regiones deseadas de la mayoría de los hongos,

pues no se obtuvo resultados positivos en su totalidad.

Se utilizó agua ultrapura (*DEPC Treated Water*) como control negativo en todas las amplificaciones en este estudio. El ADN de *Lasiodiplodia theobromae* fue empleado como control positivo en las reacciones de PCR correspondientes a la región ITS, mientras que para la región EF-1 $\alpha$  se usó ADN de *Fusarium solani* como control positivo.

En el caso de la región ITS, para identificar *Alternaria alternata* se realizaron cuatro amplificaciones con los diferentes hongos. La amplificación de la muestra FP-18-591 resultó ser positiva para la región ITS, ya que se obtuvo una banda de intensidad clara con un fragmento cercano a los 570 pb (Figura 19, carril 3), valor referente para *A. alternata* obtenido del estudio de Pavón et al., 2012.



*Figura 19.* Amplificación de la región ITS.

Carriles:

**C1:** Marcador de peso molecular

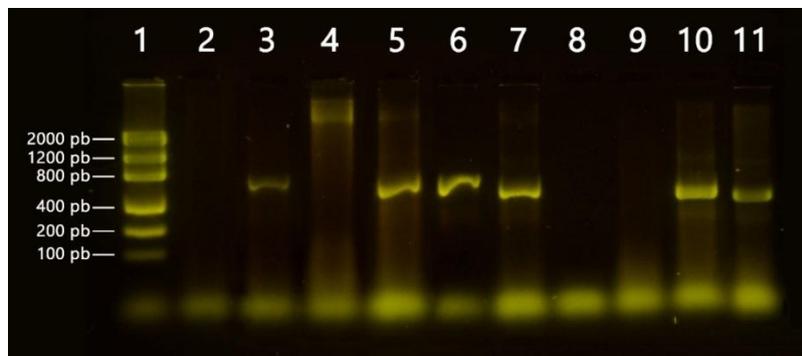
**C2:** Control positivo

**C3:** FP-18-591

**C4:** Control negativo.

En la Figura 20 se aprecia la amplificación de 8 aislados fúngicos, de los cuales 5 resultaron ser positivos, es decir los hongos de codificación FP-18-587 (C5), FP-18-107 (C6), FP-18-099 (C7), FP-18-585 (C10), y FP-18-589 (C11), los

cuales amplificaron para la región ITS ya que se observa en estos carriles fragmentos cercanos a los 570 pb con bandas de intensidad clara.



*Figura 20.* Amplificación de la región ITS.

Carriles:

**C1:** Marcador de peso molecular

**C2:** Control negativo

**C3:** Control positivo

**C4:** FP-18-106

**C5:** FP-18-587

**C6:** FP-18-107

**C7:** FP-18-099

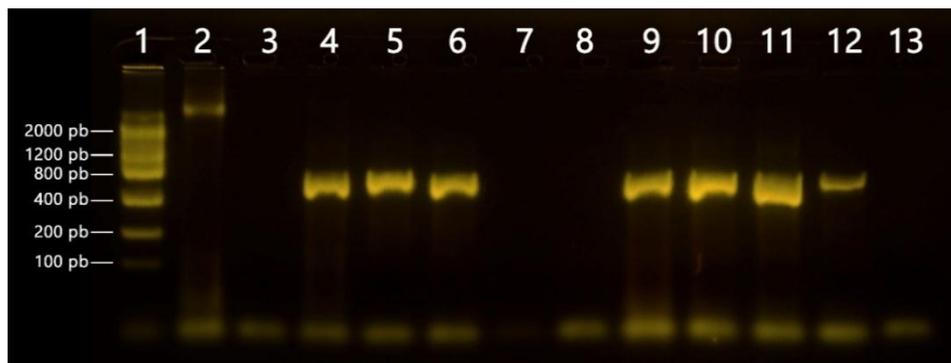
**C8:** FP-18-271

**C9:** FP-18-108

**C10:** FP-18-585

**C11:** FP-18-589.

En la Figura 21 se observa que de un total de 11 hongos, siete mostraron resultados positivos para ITS, es decir los hongos FP-18-222 (C4), FP-18-223 (C5), FP-18-224 (C6), FP-18-316 (C9), FP-18-318 (C10), y FP-18-218 (C11), pues dichos carriles muestran fragmentos con bandas de intensidad clara cercanos a los 570 pb.



*Figura 21.* Amplificación de la región ITS.

Carriles:

**C1:** Marcador de peso molecular

**C2:** FP-18-106

**C3:** FP-18-108

**C4:** FP-18-222

**C5:** FP-18-223

**C6:** FP-18-224

**C7:** FP-18-225

**C8:** FP-18-271

**C9:** FP-18-316

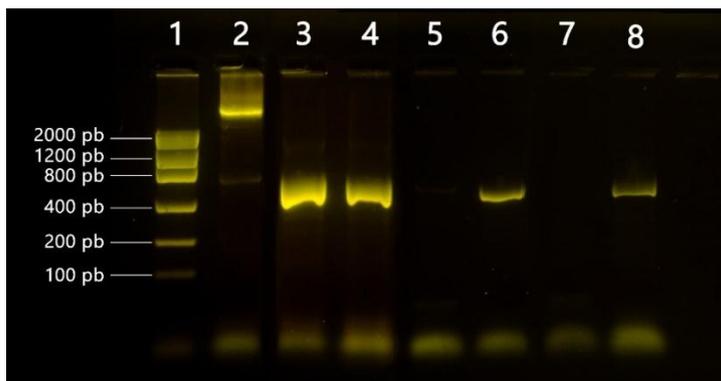
**C10:** FP-18-318

**C11:** FP-18-218

**C12:** Control positivo

**C13:** Control negativo.

En la amplificación de la Figura 22, de un total de cinco muestras, tres resultaron ser positivas, mismas que corresponden a los hongos con codificación FP-18-225 (C3), FP-18-316 (C4), y FP-18-320 (C6), ya que en dichos carriles se observan fragmentos cercanos a los 570 pb correspondientes a los fragmentos generados para la región ITS.



**Figura 22.** Amplificación de la región ITS.

Carriles:

**C1:** Marcador de peso molecular

**C2:** FP-18-106

**C3:** FP-18-225

**C4:** FP-18-316

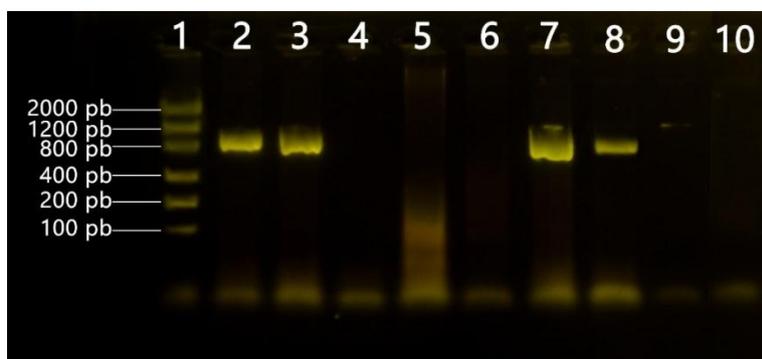
**C5:** FP-18-108

**C6:** FP-18-320

**C7:** Control negativo,

**C8:** Control positivo

Por otro lado, para la identificación de las especies de *Fusarium* se emplearon *primers* de la región EF-1 $\alpha$ . En la Figura 23, se observa la amplificación de 8 aislados fúngicos, cuyo gel reveló tres resultados positivos con los hongos FP-18-0270 (C2), FP-18-0575 (C3), y FP-18-0594 (C7), con bandas claras correspondientes a fragmentos cercanos a los 680 pb, lo que indica que se trata de especies de *Fusarium*, tal como lo reporta Karlsson et al., 2016.



**Figura 23.** Amplificación de la región EF-1 $\alpha$ .

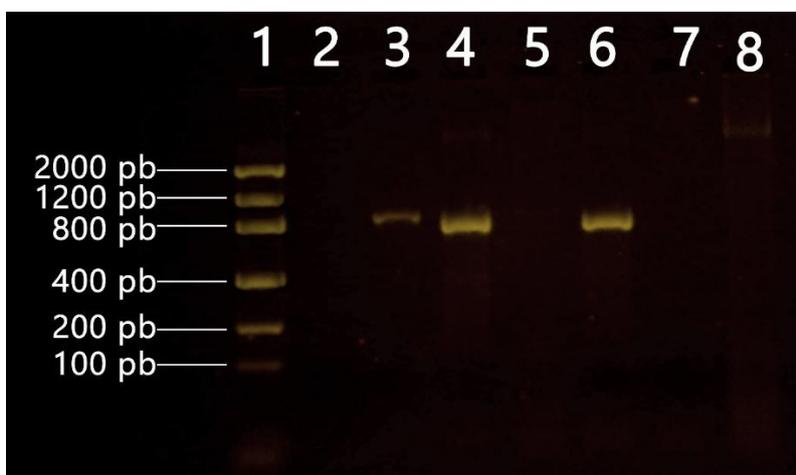
Carriles:

**C1:** Marcador de peso molecular

**C2:** FP-18-270

- C3:** FP-18-575
- C4:** FP-18-585
- C5:** FP-18-106
- C6:** FP-18-589
- C7:** FP-18-594
- C8:** Control positivo
- C9:** FP-18-099
- C10:** Control negativo.

La última amplificación para EF-1 $\alpha$  (Figura 24) resultó con tres muestras positivas, FP-18-099 (C3), FP-18-107 (C4) y FP-18-589 (C6), ya que se observa bandas claras correspondientes al fragmento de 680 pb.



*Figura 24.* Amplificación de la región EF-1 $\alpha$ .

Carriles:

- C1:** Marcador de peso molecular
- C2:** Control negativo
- C3:** FP-18-099
- C4:** FP-18-107
- C5:** FP-18-271
- C6:** FP-18-589
- C7:** FP-18-106
- C8:** FP-18-585

Los resultados indican que del 100% de aislados fúngicos, el 95% logró amplificar ya sea para ITS como para EF-1 $\alpha$ . Cabe mencionar que los hongos

FP-18-107, FP-18-0585, FP-18-0106, FP-18-0589, FP-18-099 y FP-18-0271, fueron analizados en ambas regiones por lo que existe repeticiones de estas.

En resumen, se obtuvieron seis hongos que amplificaron para la región EF-1 $\alpha$ , y trece que amplificaron para ITS. Las seis muestras que amplificaron para EF-1 $\alpha$  fueron identificadas como *Fusarium* spp., mismas que revelaron fragmentos claros cercanos al fragmento esperado, es decir 680 pb en el gel de electroforesis. Estos resultados se aproximan a los obtenidos por Karlsson et al. (2016), donde emplean los primers EF-1 y EF-2 para la región EF-1 $\alpha$ , cuyo producto de PCR tiene un tamaño de 680 pb, y logra la identificación correcta de especies de *Fusarium*.

Por otro lado, 11 de los 13 hongos que amplificaron para la región ITS fueron identificadas como *Alternaria alternata*, ya que revelaron fragmentos claros entre los 800 y 400 pb, siendo así fragmentos cercanos a los 570 pb. Dichos resultados son coherentes con los fragmentos obtenidos por Pavón et al. (2012), donde al emplear los primers ITS1 e ITS4 el producto de la PCR tuvo un tamaño de 570 pb, identificando correctamente las especies de *Alternaria*, y específicamente *Alternaria alternata*. El aislado fúngico FP-18-0271 que resultó negativo para ambas amplificaciones posiblemente se deba a la baja calidad de ADN, como explica Schrader, Schielke, Ellerbroek, & Johnne (2012). La mala calidad del ADN y la degradación del material genético durante la extracción afectan la reacción de PCR, impidiendo que los cebadores puedan reconocer las regiones complementarias con exactitud, lo que se traduce en la inexistencia de bandas en el gel de electroforesis. Por otro lado, en el C2 de la Figura 22 se observa una banda no muy clara en el fragmento deseado, sin embargo, en la parte superior de dicho carril se aprecia la presencia de un barrido con una intensidad clara. Esto también coincide con lo expuesto por Schrader et al. (2012) ya que la presencia de este barrido indica la contaminación por proteínas del ADN, lo cual se debe a que durante la extracción existieron procedimientos iniciales que no fueron manejados con cautela, lo que se tradujo en un material genético contaminado, lo que se

refleja en los valores de las relaciones de absorbancia de la Tabla 9. Así también, existen inhibidores y contaminantes como fenoles, sales, compuestos aromáticos, proteínas, etc. (Tabla 10), que influyen negativamente en la PCR (Schrader et al., 2012).

Los hongos de codificación FP-18-585 y FP-18-106 fueron identificados previamente como *Fusarium* spp. durante las pruebas morfológicas y morfométricas, sin embargo, al realizar la identificación molecular, estos amplificaron sólo para ITS, mientras que al hacer la amplificación para la región EF-1 $\alpha$ , no presentaron ninguna banda. Según Robles-Carrión et al., 2016, el hecho de que algunas especies de *Fusarium* amplifiquen para EF-1 $\alpha$  y otras para ITS, se debe a que a pesar de que la región EF-1 $\alpha$  es específica de *Fusarium*, la presencia de polimorfismos puede evitar la correcta amplificación de la misma y por ende impide la identificación molecular de algunas especies de *Fusarium*. Mientras que la región ITS tiene mayor alcance en la amplificación ya que está presente en todos los hongos, por lo tanto, suele emplearse para la identificación y tipificación de especies fúngicas.

#### **5.4.3 Identificación molecular de secuencias por homología**

Las secuencias obtenidas (tanto *Forward* como *Reverse*) fueron editados manualmente, tomando en cuenta tanto los valores de calidad como la definición de picos en el electroferograma correspondiente (ver Figura 25). Posterior a la edición la secuencia *Forward* y *Reverse* fueron ensambladas para conseguir un consenso. Las secuencias consenso fueron usadas como cadena de consulta para las bases de datos GenBank y *Fusarium* MLST. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 11 y 12, donde se observa que los porcentajes de identidad fueron de 99 a 100%.

De los ocho hongos identificados previamente como *Fusarium*, las bases de datos *GenBank* y *Fusarium* MLST, identificaron dos cepas como *Fusarium solani*; dos como *Fusarium incarnatum*/*Fusarium incarnatum-equiseti*,

respectivamente; dos como *Fusarium oxysporum* y dos como *Fusarium equiseti*/*Fusarium incarnatum-equiseti* (Tabla 11). Según Salemi & Vandamme (2003), *F. equiseti* y *F. incarnatum* son especies estrechamente relacionadas, incluso existe un complejo entre ambas llamado FIESC (*Fusarium incarnatum-equiseti* species complex), motivo por el cual la identificación de estas especies se vuelve complicada.

Tabla 11  
Aislados fúngicos con las especies de *Fusarium* identificadas mediante las bases de datos GenBank y *Fusarium* MLST.

Código de muestra	N° de Acs. GenBank	N° de Acs. <i>Fusarium</i> MLST	Especie identificada	Porcentaje de identidad
FP-18-099	KY486652.0	DQ24701	<i>Fusarium solani</i> <sup>a</sup> /	99% <sup>a</sup> /
		1	<i>Fusarium solani</i> <sup>b</sup>	100% <sup>b</sup>
FP-18-106	MK208490.1	KY61706	<i>Fusarium solani</i> <sup>a</sup> /	100% <sup>a</sup> /
		6.1	<i>Fusarium solani</i> <sup>b</sup>	100% <sup>b</sup>
FP-18-107	JF740777.1	EF05679	<i>Fusarium oxysporum</i> <sup>a</sup> /	100% <sup>a</sup> /
		0	<i>Fusarium oxysporum</i> <sup>b</sup>	100% <sup>b</sup>
FP-18-270	HM852056.1	GQ50562	<i>Fusarium cf.</i> <i>incarnatum</i> <sup>a</sup> / <i>Fusarium</i> <i>incarnatum equiseti</i> <sup>b</sup>	99% <sup>a</sup> / 100% <sup>b</sup>
		7		
FP-18-575	KY523101.1	GQ50564	<i>Fusarium equiseti</i> <sup>a</sup> / <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> <sup>b</sup>	99% <sup>a</sup> / 100% <sup>b</sup>
FP-18-585	MK192050.1	KY11414	<i>Fusarium oxysporum</i> <sup>a</sup> /	100% <sup>a</sup> /
		5	<i>Fusarium oxysporum</i> <sup>b</sup>	100% <sup>b</sup>
FP-18-589	HM852056.1	GQ50562	<i>Fusarium cf.</i> <i>Incarnatum</i> <sup>a</sup> / <i>Fusarium</i> <i>incarnatum-equiseti</i> <sup>b</sup>	99% <sup>a</sup> / 100% <sup>b</sup>

FP-18-594	KY523101.1	GQ50564 1	<i>Fusarium equiseti</i> <sup>a</sup> / <i>Fusarium incarnatum- equiseti</i> <sup>b</sup>	100% <sup>a</sup> / 100% <sup>b</sup>
-----------	------------	--------------	--	--

Nota: <sup>a</sup> Resultado de base de datos *GenBank*, <sup>b</sup> Resultado de base de datos *Fusarium MLST*

La comparación de las secuencias consenso de los microorganismos identificados previamente como *Alternaria alternata* con las bases de datos *GenBank*, y *Q-bank*, demostró que en efecto pertenecían a la especie *A. alternata* (Tabla 12). Cabe recalcar que, la secuencia del hongo FP-18-108 no se comparó con las bases de datos debido a que la calidad de uno de los electroferogramas fue demasiado baja (Figuras 25).

Tabla 12  
*Aislados fúngicos con las especies de Alternaria identificadas mediante las bases de datos GenBank y Q-bank.*

Código de muestra	N° de Acs. <i>GenBank</i>	N° de Acs. <i>Q-bank</i>	Especie identificada	Porcentaje de identidad
FP-18-108	-	-	-	-
FP-18-218	MH820121.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>
FP-18-222	MK311341.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>
FP-18-223	MK311341.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>
FP-18-224	MK311341.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>
FP-18-225	KM100451.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	99% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>
FP-18-316	MH820121.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	99% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>
FP-18-318	MH820121.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>
FP-18-320	MG012256.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 100% <sup>b</sup>

FP-18-587	MG182428.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 100% <sup>b</sup>
FP-18-591	MH118271.1	CBS 916.96	<i>Alternaria alternata</i> / <i>Alternaria alternata</i>	100% <sup>a</sup> / 99.8% <sup>b</sup>

Nota: <sup>a</sup> Resultado de base de datos *GenBank*, <sup>b</sup> Resultado de base de datos *Q-Bank*

La correcta identificación de las especies de *Fusarium* y *Alternaria* del presente estudio indica que la técnica de PCR fue empleada correctamente, pues casi la totalidad de las secuencias entregadas por *Macrogen*, correspondían a secuencias de buena calidad. Este factor es esencial para la identificación de especies ya que facilita el análisis bioinformático (Karlsson et al., 2016). Sin embargo, las secuencias del hongo FP-18-108, no fueron de buena calidad como se puede observar en los electroferogramas de las Figuras 25 y 26, por lo tanto, no se logró identificar la especie de este microorganismo en estudio. Esto se debe posiblemente a que el producto de PCR de la amplificación contenía material genético de más de un microorganismo ya que se evidenciaron picos superpuestos a manera de varios electroferogramas. Según (Raja, Miller, Pearce, & Oberlies, 2017), este tipo de contaminación se evidencia únicamente en la secuenciación, pues es ahí donde se observa ruido en el electroferograma lo que impide que se tenga una secuencia limpia y de buena calidad para identificar una especie. Este fenómeno se observó en uno de los electroferogramas de la muestra FP-18-0108, específicamente en el de la región ITS4 ya que se aprecian varios picos superpuestos (Figura 25).

File: FP18108\_ITS4.ab1 Run Ended: 2018/12/17 23:46:21 Signal G:200 A:192 C:246 T:203  
 Sample: FP18108\_ITS4 Lane: 79 Base spacing: 16.158533 518 bases in 16302 scans Page 1 of 2

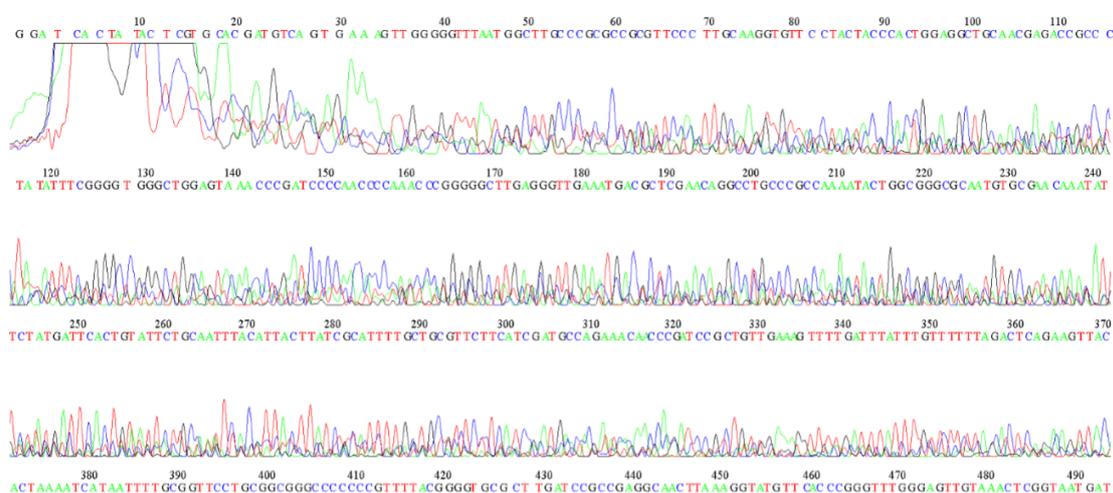


Figura 25. Electroferograma de la muestra FP-18-108 región ITS4.

## 5.4.4 Alineamiento de secuencias y reconstrucción filogenética

### 5.4.4.1 *Alternaria alternata*

El alineamiento de las secuencias consenso de *A. alternata* se realizó junto con una secuencia del gen ITS1 de *A. alternata* obtenida de la base de datos del *NCBI* con código de acceso KP124391.1. Como se puede observar en la Figura 26, el alineamiento demostró una alta similitud entre las cadenas de nucleótidos, ya que solamente se presentaron cuatro polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en las posiciones 14, 56, 501 y 561.

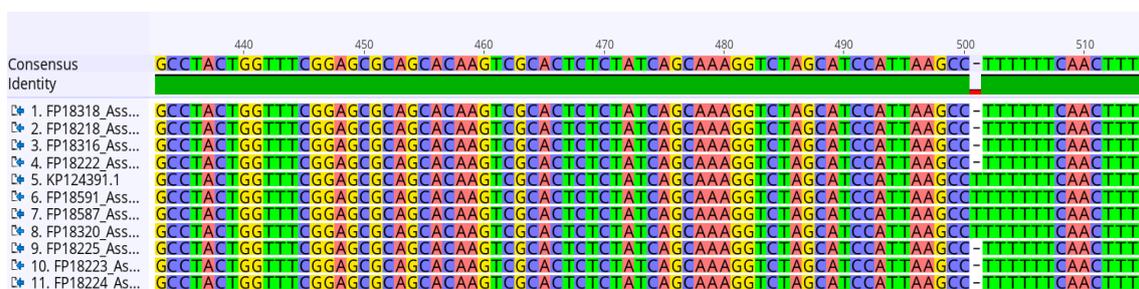


Figura 26. Alineamiento de secuencias consenso de *A. alternata*.

Al realizar el análisis de modelos de sustitución para el árbol filogenético, el modelo que mejor se ajustó al alineamiento fue el de *Jukes-Cantor* (JC) (Anexo 3 Figura 1), ya que el valor BIC (*Bayesian Information Criterion*) del mismo fue el menor, lo que significa que el modelo JC describe el mejor patrón de sustitución (Nei & Kumar, 2000 y Konishi & Kitagawa, 2008), criterio que se tomó en cuenta para la realización del árbol filogenético de *A. alternata*, el cual se observa en la Figura 27.

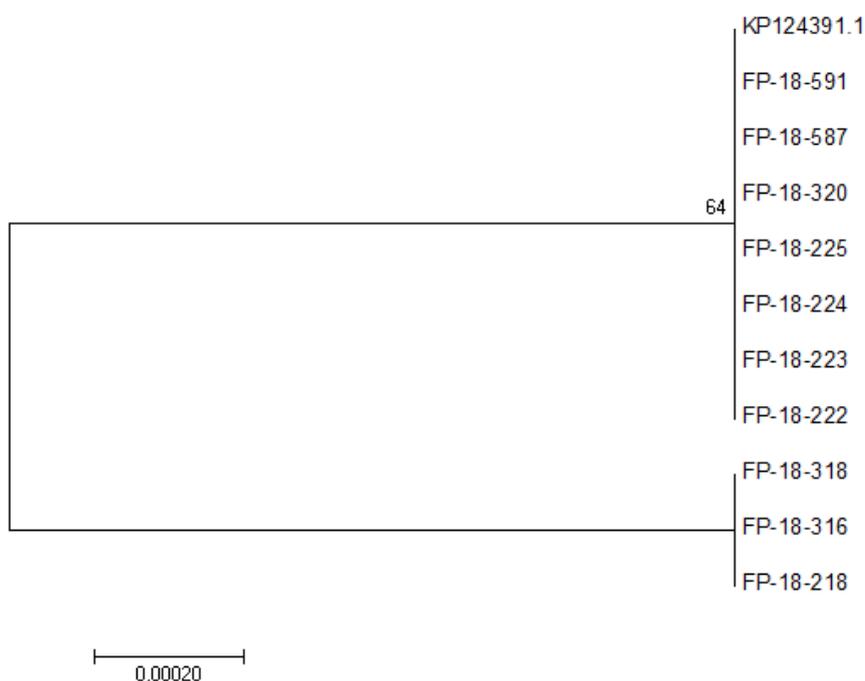


Figura 27. Árbol filogenético de *A. alternata* generado en el software *MEGA 7.0*

El árbol filogenético de la Figura 27 demuestra las relaciones evolutivas de las 11 muestras identificadas como *A. alternata* en base a la región ITS1. La suma de longitud de rama fue de 0.001948, valor que hace referencia a la suma de distancias evolutivas entre clados, mismas que son corregidas automáticamente por el método *Jukes-Cantor*. Se pudieron apreciar dos clados, cada uno con una distancia de 0.0010, el primero agrupó a 7 hongos de estudio junto con la secuencia de *A. alternata* del *NCBI*, y el otro a los tres hongos con codificación FP-18-318, FP-18-316 y FP-18-218. De esta manera, se puede afirmar que todos los hongos pertenecen a la misma especie.

#### 5.4.4.2 *Fusarium* spp.

Se realizaron dos alineamientos para las especies de *Fusarium*, uno para el gen EF-1 $\alpha$  (Figura 28) y otro para ITS (Figura 30). El alineamiento para el gen EF-1 $\alpha$  se realizó con todas las secuencias consenso de este gen (FP-18-099, FP-18,107, FP-18-270, FP-18-589, FP-18-575 y FP-18-594) junto con cinco secuencias del gen EF-1 $\alpha$  de la base de datos *GenBank* del *NCBI* de las siguientes especies: *F. equiseti* (KY688192.1), *F. incarnatum* (MG857469.1), complejo *F. incarnatum-equiseti* (KX2726131), *F. oxysporum* (FJ9854381.1) y *F. solani* (KM065871.1). El alineamiento demostró una amplia similitud entre las secuencias de *F. oxysporum* con un total de 7 SNP, al igual que entre las secuencias de *F. solani*, las cuales obtuvieron 3 SNP. En el caso de *F. incarnatum*, *F. equiseti* y *F. incarnatum-equiseti*, se presentaron 73 SNP, debido a que son diferentes especies, sin embargo, se las agrupó de esta manera ya que son especies estrechamente relacionadas y forman parte del complejo *FIESC*.

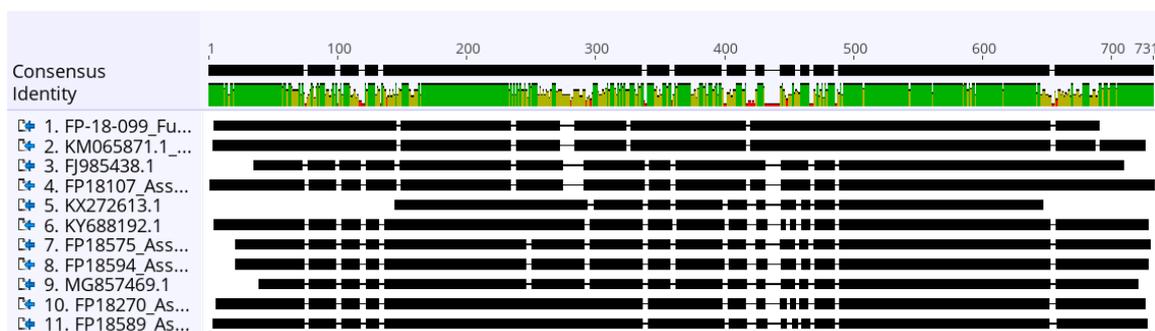


Figura 28. Alineamiento de secuencias del gen EF-1 $\alpha$  de *Fusarium* spp.

El resultado del análisis de modelos de sustitución para el árbol filogenético del gen EF-1 $\alpha$ , demostró que el modelo que más se ajustó fue el de *Kimura* de dos parámetros más distribución gamma (Figura 2 Anexo 3), cuyo valor BIC fue el menor. El modelo *Kimura* mitiga uno de los principales supuestos del modelo *Jukes-Cantor* permitiendo diferentes tasas de sustitución instantánea entre transiciones y transversiones (Salemi & Vandamme, 2003). El árbol filogenético obtenido con este modelo se observa en la Figura 29.

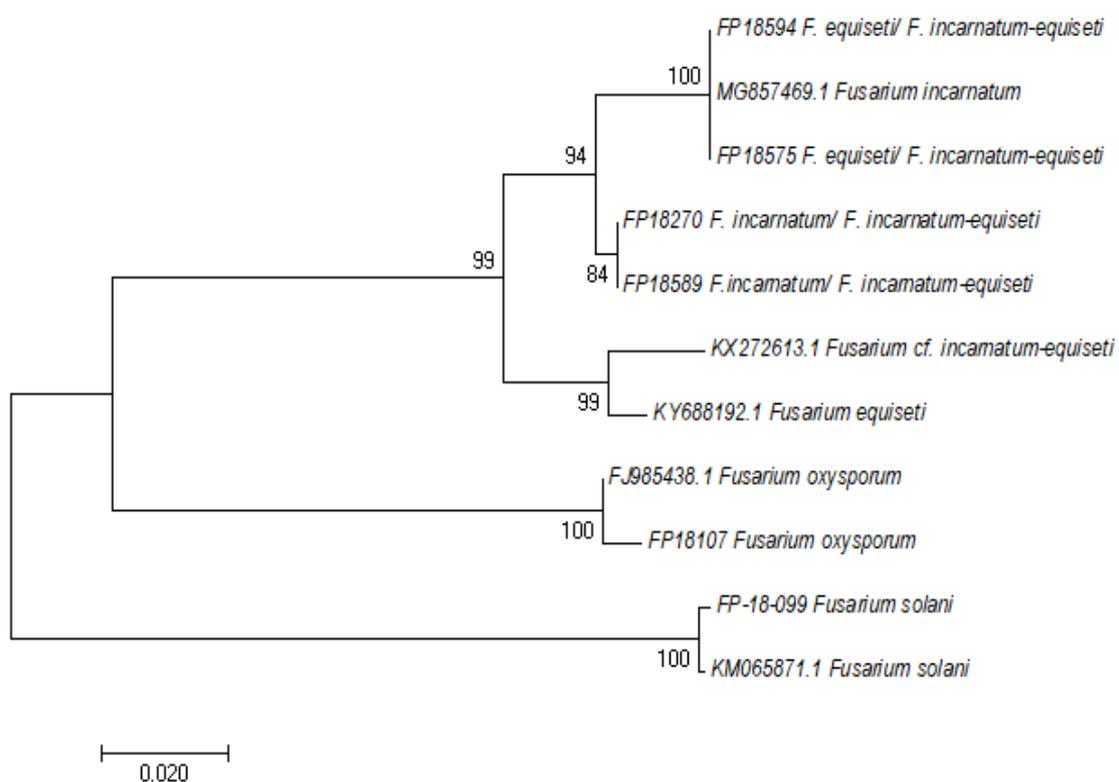


Figura 29. Árbol filogenético del gen EF-1 $\alpha$  de *Fusarium* spp. generado en el software MEGA 7.0

El árbol filogenético de la Figura 29 demuestra la precisión de la filogenia de los hongos identificadas previamente como *F. equiseti*, *F. incarnatum*, *F. incarnatum-equiseti*, *F. solani* y *F.oxysporum* en base al gen ITS1. Se presentaron tres clados que se agruparon conforme a las diferentes especies de *Fusarium*.

Dentro del primer clado existieron tres clados, uno que agrupó a FP-18-594, FP-18-575, ambas identificadas como *F. equiseti* según *GenBank* y como *F. incarnatum-equiseti* según la base *Fusarium MLST*, y la secuencia MG857469.1 perteneciente a *F. incarnatum*. El segundo clado agrupó a los hongos FP-18-270 y FP-18-589, ambas identificadas como *F. incarnatum*. Por último, el tercer clado agrupó a la secuencia del *NCBI* perteneciente a *F. incarnatum-equiseti* y a la secuencia referente de *F. equiseti*. En base a estos resultados se demuestra que las especies *F. equiseti* y *F. incarnatum* poseen la

región ITS1 altamente conservada, motivo por el cual las bases de datos arrojaron distintos resultados, lo cual se corrobora con lo descrito por (Salemi & Vandamme, 2003), quienes afirman que estas especies están estrechamente relacionadas, por lo que no existen diferencias considerables, sin embargo constan como diferentes especies. En consecuencia, las especies de los hongos FP-18-270, FP-18-589 FP-18-594 y FP-18-575 siguen siendo indefinidas, motivo por el cual en el presente estudio se las identifica como especies de *Fusarium* del complejo *FIESC*. Cabe recalcar que una manera de identificar cada una de estas especies es a través de la amplificación y secuenciación de los genes *CAL1*, *RPB2* y *TUB2*, o mediante el análisis de micotoxinas (Villani et al., 2016).

En el segundo y tercer clado de la Figura 29 se demuestra la precisión de la identificación de *F. oxysporum* y *F. solani* en base al gen ITS1 ya que ambas se agrupan junto con las secuencias referentes del NCBI.

Por otra parte, para el árbol filogenético de los hongos del género *Fusarium* cuyo gen ITS1 fue secuenciado, se alinearon las secuencias consenso FP-18-106 y FP-18-585 junto con dos secuencias de la base de datos *GenBank* del *NCBI*, una de *F. solani* (KX583245.1) y otra de *F. oxysporum* (JN942837.1), tal como se observa en la Figura 30.

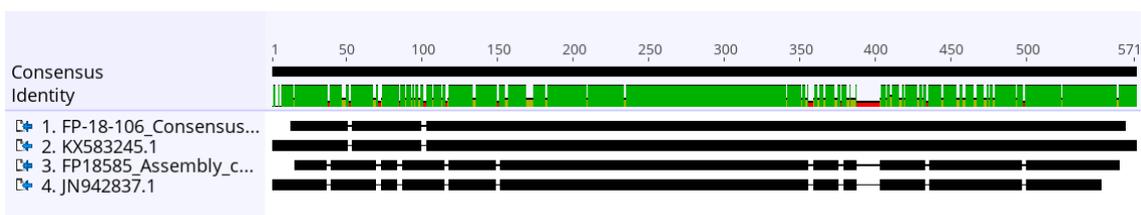


Figura 30. Alineamiento de secuencias del gen ITS1 de *Fusarium* spp.

Al realizar el análisis de modelos de sustitución para el árbol filogenético, el modelo que mejor se ajustó al alineamiento fue el de *Jukes-Cantor* (JC) (Figura 3 del Anexo 3), ya que obtuvo el menor valor BIC. El árbol filogenético desarrollado con este modelo posee dos clados. El primero corresponde a las

secuencias de *F. solani*, mientras que el segundo agrupa a *F. oxysporum* (Figura 31).

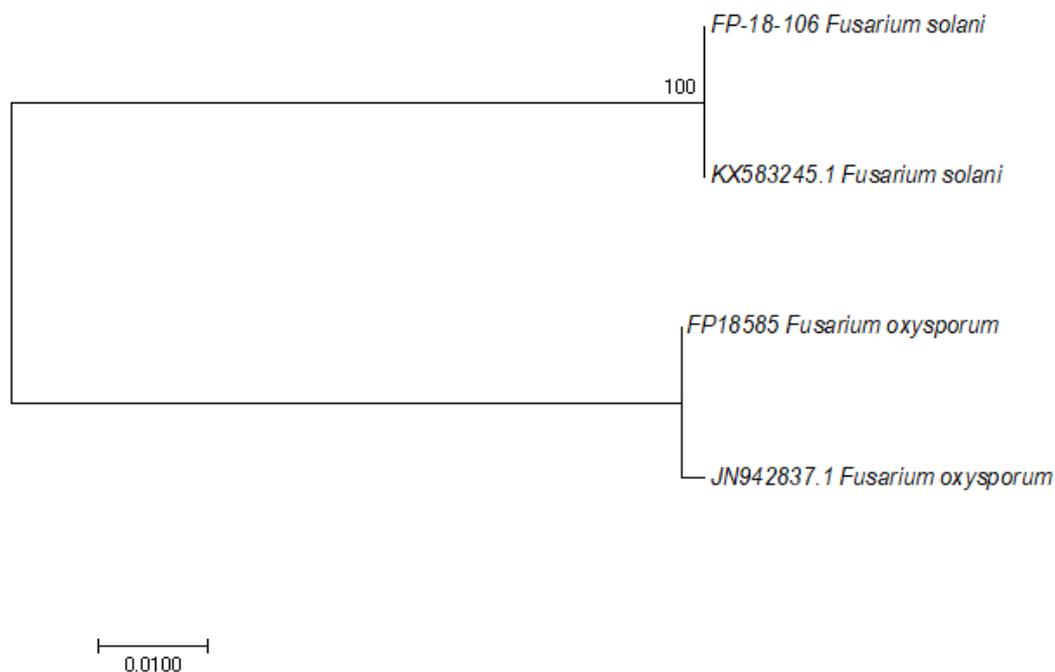


Figura 31. Árbol filogenético del gen ITS1 de *Fusarium* spp. generado en el software MEGA 7.0

Los árboles filogenéticos que se obtuvieron, tanto para el gen EF-1 $\alpha$  (Figura 29) y para ITS (Figura 31) demuestran las relaciones evolutivas de las diferentes especies de hongos identificados como *Fusarium* spp. respecto a dichos genes. En el caso del primer árbol filogenético, se observa que las especies *F. incarnatum*, *F. incarnatum-equiseti*, y *F. oxysporum* están mayormente relacionadas entre sí, y dichas especies están menos relacionadas con *F. solani*. Dicho resultado se repite en el caso del segundo árbol filogenético, donde se observa que, las especies *F. oxysporum* y *F. solani* se encuentran menos relacionadas entre sí. A pesar de que se emplearon diferentes cebadores para la identificación de *Fusarium*, en ambos casos se demuestra que las relaciones filogenéticas entre las especies identificadas se mantienen.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 6.1. Conclusiones

Se detectaron los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en cultivos de uva de zonas agrícolas del Ecuador. Las manchas negras en frutos y las manchas oscuras a manera de anillos concéntricos en tallos y hojas fueron síntomas de los cuales se pudo aislar el hongo *Alternaria alternata*, mientras que las especies de *Fusarium* se aislaron a partir de la pudrición de frutos y presencia de micelio blanquecino en raíces y hojas. A pesar de que la sintomatología fue un aspecto clave en la detección de los géneros *Alternaria* y *Fusarium*, existió la presencia de otros tipos de hongos, por lo que el aislamiento de estos microorganismos en base a sintomatología no es totalmente confiable.

Las técnicas morfológicas y morfométricas permitieron la identificación de la mayoría de las especies antes mencionadas en base a sus características visuales macroscópicas en medios de cultivo, y características microscópicas fundamentadas en la forma y tamaño de las conidias. En el caso de *Alternaria alternata* la identificación mediante este tipo de técnicas fue eficaz puesto que las especies del género *Alternaria* logran diferenciarse tanto morfológica y morfométricamente. Sin embargo, las especies del género *Fusarium* fueron muy similares a nivel morfológico, lo que supuso que el empleo de dichas técnicas no sea totalmente confiable en la detección de las especies de *Fusarium* del presente estudio.

Las pruebas bioquímicas del sistema de identificación BIOLOG, únicamente permitieron la identificación de ciertas cepas de *Alternaria alternata* y ninguna de *Fusarium* spp. La variabilidad de estos resultados demostró que este sistema no es adecuado para la identificación de los microorganismos fúngicos o al menos para las especies estudiadas en este trabajo.

Finalmente, las técnicas moleculares evidenciaron que la amplificación de los genes ITS mediante PCR y secuenciación, son técnicas fiables para la identificación de *Alternaria alternata* y ciertas especies de *Fusarium* como *F. solani* y *F. oxysporum*. Mientras que para *Fusarium*, la amplificación del gen EF-1 $\alpha$  no es específica ya que en algunos aislados del presente estudio, no se observaron bandas de amplificación. Además, la comparación con bases de datos de las secuencias consenso de EF-1 $\alpha$  de algunos de los hongos identificados morfológicamente como *Fusarium equiseti*, resultó en la identificación como especies del complejo *Fusarium incarnatum- equiseti*, debido a que se encuentran estrechamente relacionados.

## 6.2. Recomendaciones

La detección de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp. en este estudio indica que dichos fitopatógenos si afectan negativamente los cultivos de uva en el Ecuador. Sin embargo, para que exista mayor confiabilidad de que estos agentes fúngicos son patógenos de aquel cultivo, se recomienda aplicar los postulados de Koch, los cuales incluyen ensayos de patogenicidad que permitirán comprobar y analizar el proceso de infección de estos microorganismos sobre los cultivos de uva.

Durante el empleo de las técnicas moleculares para la identificación de *Alternaria alternata* y *Fusarium* spp., se evidenció la importancia de la obtención de ADN fúngico de buena calidad para por lo que se recomienda mayor cautela en la extracción de ADN. Es importante manejar con discreción las velocidades y los tiempos de centrifugación que se emplean al seguir los protocolos de extracción.

Finalmente, en cuanto a la identificación de las especies del complejo *Fusarium incarnatum- equiseti*, se recomienda la amplificación y secuenciación de más genes, por ejemplo *CAL1*, *RPB2* y *TUB2*.

## REFERENCIAS

- Acuña, I., y Tejeda, P. (2018). Enfermedades Causadas por Hongos. Recuperado el 20 de octubre de 2018, de <http://manualinia.papachile.cl/?page=manejo&ctn=214>
- AGROCALIDAD. (2018). Requisitos Fitosanitarios de Exportación. Recuperado el 25 de mayo de 2018, de <http://www.agrocalidad.gob.ec/direccion-de-certificacion-fitosanitaria/>
- Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., y Arce-johnson, P. (2016). *Grapevine Pathogenic Microorganisms: Understanding Infection Strategies and Host Response Scenarios*, 7(March), 1–18. Doi:10.3389/fpls.2016.00382
- Arora, D. K. (2004). *Fungal Biotechnology in Agricultural, Food, and Environmental Applications*. (J. Bennett y P. Lemke, Eds.). Nueva York, Estados Unidos: Marcel Dekker.
- Arroyo, R., Ruíz, L., Bolling, R., Ocete, R., López, A., Arnold, C., y Malpica, M. (2006). *Multiple origins of cultivated grapevine ( Vitis vinifera L . ssp . sativa ) based on chloroplast DNA polymorphisms*. *Molecular Ecology*, 15(2006), 3707–3714. Doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03049.x
- Bautista, S. (2014). *Postharvest Decay: Control Strategies*. San Diego, Estados Unidos: Elsevier.
- Berg, K. E., y Latin, R. W. (2008). *Essentials of Research Methods in Health, Physical Education, Exercise Science and Recreation*. Filadelfia, Estados Unidos: Wolters Kluwer/ Lippincott Williams y Wilkins. Recuperado el 10 de enero de 2018, de <https://books.google.com.ec/books?id=qepSWG0Rf-MC&pg=PA87&dq=central+tendency+and+variability&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi7h9TE25PgAhUSZawKHWLpDrAQ6AEIMzAB#v=onepage&q=central+tendency+and+variability&f=false>
- Biolog. (2018). BIOLOG. Recuperado el 26 de octubre de 2018, de <https://biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/>
- BIOLOG. (2018). BIOLOG. Recuperado el 31 de enero de 2019, de

- [http://208.106.130.253/pdf/milit/00A\\_005rC\\_Biolog\\_Database\\_Book.pdf](http://208.106.130.253/pdf/milit/00A_005rC_Biolog_Database_Book.pdf)
- CABI. (2018). Crop Protection Compendium (CABI). Recuperado el 15 de septiembre de 2018, de <https://www.cabi.org/cpc/datasheet/56504>
- CABRI. (2018a). CABRI. Recuperado el 31 de enero de 2019, de <http://www.cabri.org/HyperCat/fun/all396861.htm>
- CABRI. (2018b). CABRI. Recuperado el 31 de enero de 2019, de <http://www.cabri.org/HyperCat/fun/cbs396668.htm>
- Campbell, C. K., Johnson, E. M., y Warnock, D. W. (2013). *Indentification of Pathogenic Fungi*. Nueva York, Estados Unidos: Energy (Wiley-Blac).
- Cañedo, V., y Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa.
- Domsch, K., Gams, W., y Anderson, T. (2007). *Compendium of Soil Fungi*. Koenigstein, Alemania: IHV-Verlag Eching.
- Duan, G., Christian, N., Schwachtje, J., Walther, D., y Ebenhöh, O. (2013). *The metabolic interplay between plants and phytopathogens*. *Metabolites*, 3(1), 1–23. Doi:10.3390/metabo3010001
- FAO. (2006). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Recuperado el 12 de junio de 2018, de <http://www.fao.org/ag/esp/revista/0604sp1.htm>
- FAO. (2008). Manual de Inspección Fitosanitaria &quot;Manual de Inspección Fitosanitario&quot;. Recuperado el 12 de junio de 2018, de <http://www.fao.org/docrep/019/i0805s/i0805s.pdf>
- FAO. (2018). Normas Internacionales para Medidas Fitosanitarias (NIMF). Recuperado el 17 de junio de 2018, de <http://www.fao.org/sustainable-forest-management/toolbox/tools/tools-details/es/c/233067/>
- Farr, D. F., y Rossman, A. . (2018). Fungal Databases. Recuperado el 15 de septiembre de 2018, de [https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new\\_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Vitis\\_vinifera&organismtype=Host&deallCount=yes](https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/new_allView.cfm?whichone=FungusHost&thisName=Vitis_vinifera&organismtype=Host&deallCount=yes)
- Forero, C., Alvarado, A., Ceballos, A., González, Lady, Linares, M., Castañeda, R., ... Cortés, J. (2018). Evaluación de la capacidad patogénica de

- Fusarium spp . en modelos vegetal y murino. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(1), 90–96. Doi:10.1016/j.ram.2016.11.009
- Gambino, G., y Gribaudo, I. (2006). *Simultaneous Detection of Nine Grapevine Viruses by Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction with Coamplification of a Plant RNA as Internal Control*. *Phytopathology*, 96(11), 1223–1229. Doi:10.1094/PHYTO-96-1223
- Gerrath, J., Melville, L., y Posluszny, U. (2015). *Taming the Wild Grape Botany*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Gherbawy, Y., y Voigt, K. (2010). *Molecular identification of fungi*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Google Maps (2018). Recuperado el 18 de abril de 2018, de <https://www.google.com/maps/place/Ecuador/@-1.3442194,-88.3967263,6z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x902387dda89a4bd5:0x9d76af04119c3702!8m2!3d-1.831239!4d-78.183406>
- González, M. S., Diamont, D., y Gutiérrez, B. (2011). Técnica De Tinción De Estructuras Fúngicas Con Colorantes Vegetales Como Una Alternativa No Contaminante. *Bioagro*, 23(1), 65–68. Recuperado el 25 de septiembre de 2018, de [http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev23\(1\)/9.Técnica de tinción de estructuras fúngicas.pdf](http://www.ucla.edu.ve/bioagro/Rev23(1)/9.Técnica%20de%20tinción%20de%20estructuras%20fúngicas.pdf)
- Gutiérrez, Y., Bustamante, S., y Buitrago, G. (2009). Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp). *Rev. Colomb. Biotecnol*, XI(Diciembre), 8–18. Doi: 10.1002/pbc.24263
- Hafizi, R., Salleh, B., y Latiffah, Z. (2013). *Morphological and molecular characterization of Fusarium. solani and F. oxysporum associated with crown disease of oil palm*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 968, 959–968.
- Hoog, G. S. (2000). *Atlas of clinical fungi*. Barcelona, España: Springer.
- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., ... Namba, S. (2009). *A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified de a phytopathogenic bacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*

- of America*, 106(15), 6416–6421. Doi: 10.1073/pnas.0813038106
- House, H., Park, O. B., y Road, C. (2007). Nucleon ® Genomic DNA extraction kit, 1–6. Recuperado el 11 de octubre de 2018. de <http://www.takara.co.kr/file/manual/pdf/TL200.pdf>
- Jackson, R. (2014). *Wine Science*. California, Estados Unidos: Elsevier. Doi: 10.1016/B978-0-12-381468-5.00002-6
- Karlsson, I., Gautheron, N., Kolseth, A., Steinberg, C., Persson, P., y Friberg, H. (2016). *Genus-Specific Primers for Study of Fusarium Communities in Field*, 82(2), 491–501. Doi: 10.1128/AEM.02748-15. Editor
- Konig, H., Uden, G., y Frohlich, J. (2017). *Biology of Microorganisms on Grape, in Must and in Wine*. Gutenberg, Alemania: Springer.
- Konishi, S., y Kitagawa, G. (2008). *Information Criteria and Statistical Modeling*. New York, Estados Unidos: Springer.
- Kumar, M., y Mugunthan, M. (2018). Evaluation of three DNA extraction methods de fungal cultures. *Medical Journal Armed Forces India*, 74(4), 333–336. <https://doi.org/10.1016/J.MJAFI.2017.07.009>
- Kumar, P., Kamle, M., Kumar, V., y Ajay, K. (2016). *Current Trends in Plant Disease Diagnostics and Management Practices*. Berna, Suiza: Springer. Recuperado el 17 de julio de 2018, de <http://www.springer.com/series/11224>
- Leslie, J., Summerell, B., y Bullock, S. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Manhattan, Estados Unidos: Blackwell Publishing.
- López, L., Gutiérrez, P., Bautista, S., Jiménez, L., y Zavaleta, H. (2013). Evaluación de la actividad antifúngica del quitosano en *Alternaria alternata* y en la calidad del mango “Tommy atkins” durante el almacenamiento. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 19(3), 315–331. Doi: 10.5154/r.rchsh.2012.07.038
- M. de Agricultura Ganadería Acuicultura y Pesca. (2016). La Política Agropecuaria Ecuatoriana. La política agropecuaria ecuatoriana (MAGAP). Quito: MAGAP. Recuperado el 28 de abril de 2018, de [http://servicios.agricultura.gob.ec/politicas/La Políticas Agropecuarias al 2025 I parte.pdf](http://servicios.agricultura.gob.ec/politicas/La%20Políticas%20Agropecuarias%20al%202025%20I%20parte.pdf)

- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., y Stahl, D. (2015). *Brock Biology of Microorganisms*. Illinois, Estados Unidos: Pearson. Doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Magliano, T., y Chulze, S. (2013). *Fusarium Head Blight in Latin America*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Mamgain, A., Roychowdhury, R., y Tah, J. (2013). *Alternaria pathogenicity and its strategic controls*. *Research Journal of Biology*.
- Martínez de Toda, F. (2011). Claves de la viticultura de calidad: nuevas técnicas de estimulación y control de la calidad de la uva en el viñedo. Madrid. España: Ediciones Madrid.
- Myles, S., Boyko, A. R., Owens, C. L., Brown, P. J., Grassi, F., Aradhya, M. K., y Schaal, B. A. (2011). *Genetic structure and domestication history the grape*. *PNAS*, 108, 3530–3535. Doi: 10.1073/pnas.1009363108
- Narayanasamy, P. (2013). *Microbial Plant Pathogens-Detection and Disease Diagnosis*. *Journal of Chemical Information and Modeling* (Springer, Vol. 53). Doi: 10.1017/CBO9781107415324.004
- Nei, M., y Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Nueva York, Estados Unidos: Oxford University Press.
- Olympus. (2009). *Software cellSens*. Recuperado el 5 de septiembre de 2018, de [https://www.olympus-lifescience.com/es/software/cellsens/#!cms\[tab\]=%2Fsoftware%2Fcellsens%2Fspecifications](https://www.olympus-lifescience.com/es/software/cellsens/#!cms[tab]=%2Fsoftware%2Fcellsens%2Fspecifications)
- Omer, A., Granett, J., y Wakeman, R. (1999). *Pathogenicity of Fusarium oxysporum on Different Vitis Rootstocks*. *Phytopathology*, 147, 433–436.
- Panizo, M. M., Reviákina, V., Montes, W., y González, G. (2005). Mantenimiento y Preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. *Rev.Soc.Ven.Microbiol*, 25(1), 1–9. Recuperado el 7 de junio de 2018, de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1315-25562005000100007](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562005000100007)
- Parikh, L., Kodati, S., Eskelson, M. J., y Adesemoye, A. O. (2018). *Identification*

- and pathogenicity of Fusarium spp. in row crops in Nebraska. Crop Protection, 108*, 120–127. Doi: 10.1016/j.cropro.2018.02.019
- Pavón, M. Á., González, I., Martín, R., y Lacarra, T. G. (2012). *ITS-based detection and quantification of Alternaria spp. in raw and processed vegetables by real-time quantitative PCR*. Doi: 10.1016/j.fm.2012.05.006
- Pearson, R., y Goheen, A. (2001). *Plagas y enfermedades de la vid*. Madrid. España: Ediciones Madrid.
- Pierce, M., Ward, E., y Dobbs, F. (2014). *False positives in Biolog EcoPlates™ and MT2 MicroPlates™ caused by calcium*. *Journal of Microbiological Methods, 97*, 20–24. Doi: 10.1016/j.mimet.2013.12.002
- Pitt, J., y Hocking, A. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- PRO-ECUADOR (2016). *República de Oportunidades: Cumbre de Inversiones Ecuador*. Recuperado el 15 de marzo de 2018, de [https://issuu.com/pro-ecuador/docs/guia\\_republica\\_de\\_oportunidades\\_-\\_c](https://issuu.com/pro-ecuador/docs/guia_republica_de_oportunidades_-_c)
- Pugliese, M., Gullino, M. L., Garibaldi, A., y Marenco, M. (2014). *Control of soilborne pathogens on vegetables grown in greenhouse by microorganisms isolated de compost*. *Acta Horticulturae, (1044)*, 253–256. Doi: 10.17660/ActaHortic.2014.1044.30
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., y Oberlies, N. H. (2017). *Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community*. *Journal of Natural Products, 80(3)*, 756–770. Doi: 10.1021/acs.jnatprod.6b01085
- Raya, M., Raya, A., Dasha, S., Mishraa, A., Acharyb, G., Nayaka, S., y Shikha, S. (2017). *Fungal disease detection in plants: Traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors*. *Biosensors and Bioelectronic (87)*, 708–723. Doi: 10.1016/j.bios.2016.09.032
- Robles-Carrión, A. I., Leiva-Mora, M. I., Herrera-Isla III, L., Sánchez-Rodríguez, A. I., Torres-Gutiérrez, R. V, Falconí Espinosa, G., y Argelia, L. (2016). *Morphological and molecular identification of Fusarium species*

- associated with vascular wilt of babaco (Vasconcellea heilbornii var. pentagona Badillo). Rev. Protección Veg (Vol. 31).*
- Rombough, L. (2002). *The Grape Grower: A Guide to Organic Viticulture*. Vermont, Estados Unidos: Chealsea Green Publishing.
- Saccardo, P. A. (1886). Mycobank. Recuperado el 31 de enero de 2019, de [http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr\\_=199819](http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=199819)
- Salemi, M., y Vandamme, A. (2003). *The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny*. Cambridge, Inglaterra: Cambridge University Press.
- Satyanarayana, T., Deshmukh, S., y Johri, B. N. (2017a). *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology. Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. Singapore, Estados Unidos: Springer. Doi: 10.1007/978-981-10-4768-8\_10
- Satyanarayana, T., Deshmukh, S., y Johri, B. N. (2017b). *Fusarium oxysporum: Genomics, diversity and plant-host interaction. In Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*. Doi: 10.1007/978-981-10-4768-8\_10
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., y Johne, R. (2012). *PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. Journal of Applied Microbiology, 113(5), 1014–1026*. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x
- Simmonds, M., y Preedy, V. (2016). *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. London, Inglaterra: Elsevier.
- Simmons, E. (2007). *Alternaria: An Identification Manual*. Utrecht, Países Bajos: CBS Fungal Biodiversity Centre.
- Singh, B. P., y Gupta, V. K. (2017). *Molecular Markers in Mycology*. Nueva York, Estados Unidos: Springer.
- Singh, M. P. (2009). *Application of Biolog FF MicroPlate for substrate utilization and metabolite profile of closely related fungi. Journal of Microbiological Methods, 77(1), 102–108*. Doi: 10.1016/j.mimet.2009.01.014
- Stewart, P., y Globig, S. (2011). *Phytopathology in Plants*. New Jersey, Estados

Unidos: *Apple Academic Press*.

- Swart, A. E., Lennox, C. ., y Holz, G. (1995). *Infection of Table Grape Bunches by Alternaria alternata*. *South African Journal of Enology y Viticulture*, 16. Recuperado el 19 de julio de 2018, de <http://www.journals.ac.za/index.php/sajev>
- Terral, J., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., y Jung, C. (2010). *Evolution and history of grapevine ( Vitis vinifera ) under domestication : new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars*, 443–455. Doi: 10.1093/aob/mcp298
- The American Phytopathological Society. (2018). *The American Phytopathological Society*. Recuperado el 3 de julio de 2018, de <http://www.apsnet.org/Pages/default.aspx>
- Thermo Scientific. (2010). *NanoDrop 8000*. Recuperado el 25 de octubre de 2018, de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Guides/User-Manual-nd-8000-v2.2-users-manual-8.5-x-11.pdf>
- Thermo Scientific. (2016). *NanoDrop 8000 Spectrophotometer V2.1 User Manual*. Recuperado el 25 de octubre de 2018, de <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/manuals/3091-NanoDrop-One-User-Guide-v1.3-sw-SPANISH.pdf>
- This, P., Lacombe, T., y Thomas, M. R. (2006). *Historical origins and genetic diversity of wine grapes*. *Trends in Genetics*, 22(9). Doi: 10.1016/j.tig.2006.07.008
- Valencia, S., Páez, D., Guevara, J., y Vilaplana, R. (2016). Aislamiento, identificación, y evaluación de los hongos más agresivos aislados de pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus*) en el periodo poscosecha. *Vitae*, 23, 810–815.
- Villani, A., Moretti, A., De Saeger, S., Han, Z., Di Mavungu, J., Soares, C., y Susca, A. (2016). *A polyphasic approach for characterization of a collection of cereal isolates of the Fusarium incarnatum-equiseti species complex*. *International Journal of Food Microbiology*, 234, 24–35. Doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.023

- Watanabe, T. (2010). *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi Morphologies of Cultured Fungi*. Atlanta, Estados Unidos: CRC Press.
- Yao Su Cheng Chi, L. J. H. H. (2006). *Biolog Microbial Identification System- Study on the Operating Regulation of Filamentous Fungi Identification. Food and Fermentation Industries*.
- Zimbro, M., Power, D., Miller, S., Wilson, G., y Johnson, J. (2009). *Difco™ y BBL™ Manual*. Recuperado el 19 de junio de 2018 de <https://www.trios.cz/wp-content/uploads/sites/149/2016/08/DIFCO-A-BBL-MANUAL-2.pdf>.

## **ANEXOS**

## **Anexo 1**

### **PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN**

Protocolo (Producto No. SL8510)

Para 50 muestras de tejido de plantas de 0.1g cada una.

#### *Rompimiento de la pared celular:*

Lleve a cabo los pasos 1-3 lo más rápido posible.

1. Agregue nitrógeno líquido o 3 volúmenes de hielo seco a 0,1 g (peso fresco) de tejido vegetal que se haya congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Macere el tejido en hielo seco o nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
3. Transfiera el polvo, utilizando instrumentos refrigerados, a un tubo de centrifuga de polipropileno adecuado (consulte la nota técnica 1).

#### *Lisis celular:*

4. Agregue 600  $\mu\text{L}$  de Reactivo 1, asegurándose de que todos los ingredientes del reactivo estén completamente disueltos. Mezclar bien.  
Preferencia del operador: en esta etapa se pueden realizar incubaciones opcionales con mercaptoetanol y RNasa (ver nota técnica 1).
5. Agregue 200 $\mu\text{L}$  de Reactivo 2.
6. Invertir varias veces hasta obtener una mezcla homogénea.
7. Incubar la mezcla a  $65^{\circ}\text{C}$  en baño María con agitación durante 10 minutos. Alternativamente, la agitación manual regular, durante la incubación, será suficiente.
8. Coloque la muestra en hielo durante 20 minutos.

#### *Extracción de ADN:*

9. Retire la muestra del hielo y agregue 500  $\mu\text{L}$  de cloroformo almacenado a  $2-8^{\circ}\text{C}$ .
10. Agregue 100 $\mu\text{L}$  de resina *PhytoPure*, agitando vigorosamente antes de agregar (vea la nota técnica 2)
11. Agite a temperatura ambiente con la ayuda de un agitador inclinado durante 10 minutos. Alternativamente, la agitación manual regular durante un período similar será suficiente.
12. Centrifugar a 1300 x g durante 10 minutos.

13. Sosteniendo el tubo verticalmente, y sin alterar la capa de resina, transfiera (con una pipeta) solo el ADN, el cual se encuentra en la fase superior, sobre la capa de resina PhytoPure (color marrón), a un tubo nuevo de un volumen apropiado.

*Precipitación de ADN:*

14. Agregue un volumen igual al traspasado, aproximadamente 600-800 µL de isopropanol frío.

15. Invierta suavemente el tubo hasta que el ADN se precipite (vea la nota técnica 3).

16. Centrifugar a un mínimo de 4000 x g durante 5 minutos para sedimentar el ADN

17. Lave el sedimento de ADN con 1 ml de etanol al 70%.

18. Centrifugar a un mínimo de 4000 x g durante 5 minutos para sedimentar el ADN.

19. Deseche el sobrenadante.

20. Seque al aire el sedimento de ADN durante 10 minutos. No exceda este tiempo ya que esto puede hacer que el ADN sea difícil de disolver.

21. Retire con cuidado las gotas de etanol restantes del tubo y resuspenda el ADN en buffer TE o agua estéril según sea necesario (100-200 µl).

## **Anexo 2**

Tabla 1. *Datos generales de las 53 muestras colectadas.*

Provincia	Cantón o Parroquia	Variedad	Código de Laboratorio
Santa Elena	Chanduy	Jack salute	FP-18-093
Santa Elena	Chanduy	Sweet	FP-18-094
Santa Elena	Chanduy	Sweet	FP-18-095
Santa Elena	Chanduy	Crinson	FP-18-096
Santa Elena	Chanduy	Superior	FP-18-097
Santa Elena	Chanduy	Arra 15	FP-18-098
Santa Elena	Chanduy	Arra 16	FP-18-099
Santa Elena	Chanduy	Arra 17	FP-18-100

Santa Elena	Chanduy	Arra 18	FP-18-101
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-102
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-103
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-104
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-105
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-106
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-107
Santa Elena	Chanduy	Allison	FP-18-108
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Negra	FP-18-217
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-218
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-219
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-220
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-221
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-222
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-223
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-224
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-225
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-270
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-271
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Verbejo	FP-18-313
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Verbejo	FP-18-314
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Italian	FP-18-315
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Red glove	FP-18-316
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Red glove	FP-18-317
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Australian Moscatel	FP-18-318
Pichincha	Yaruquí y Puembo	blanca	FP-18-319
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Verde superior	FP-18-320
Guayaquil	Playas	Chardonnay	FP-18-575
Guayaquil	Playas	Malbec	FP-18-576
Guayaquil	Playas	Carbenet	FP-18-577
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-585

Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-586
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-587
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-588
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-589
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-590
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-591
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-592
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-593
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-594
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-595
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-597
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-598
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-596
El Oro	Santa Rosa	Red globe	FP-18-612

Tabla 2. *Datos generales de hongos que presentaron morfología macroscópica semejante a hongos del género Alternaria.*

Provincia	Cantón o Parroquia	Variedad	Código de Laboratorio
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-102
Santa Elena	Chanduy	Allison	FP-18-108
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Negra	FP-18-217
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-218
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-222
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-223
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-224
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-225
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Red glove	FP-18-316
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Australian	FP-18-318
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Verde superior	FP-18-320

Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-587
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-591

Tabla 3. *Datos generales de hongos que presentaron morfología macroscópica semejante a hongos del género Fusarium.*

Provincia	Cantón o Parroquia	Variedad	Código de Laboratorio
Santa Elena	Chanduy	Arra 16	FP-18-099
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-103
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-104
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-106
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-107
Pichincha	Yaruquí y Puembo	Blanca	FP-18-219
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-270
Santa Elena	Chanduy	Red glove	FP-18-271
Guayaquil	Playas	Chardonnay	FP-18-575
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-585
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-589
Carchi	Comuna Mascarilla	No indica	FP-18-594
El Oro	Santa Rosa	Red globe	FP-18-612

### Anexo 3

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)	
JC	19	1605.953	1479.925	-720.895	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2	20	1612.395	1479.742	-719.797	n/a	n/a	481764.06	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000
JC+I	20	1614.593	1481.939	-720.895	0.50	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
JC+G	20	1614.593	1481.939	-720.895	n/a	0.10	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92	21	1617.084	1477.805	-717.821	n/a	n/a	327829.58	0.272	0.272	0.228	0.228	0.000	0.000	0.228	0.000	0.228	0.000	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000
K2+G	21	1621.036	1481.757	-719.797	n/a	0.10	604955.67	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000
K2+I	21	1621.036	1481.757	-719.797	0.50	n/a	146800.56	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000
JC+G+I	21	1623.233	1483.954	-720.895	0.50	0.10	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
T92+G	22	1625.724	1479.821	-717.821	n/a	0.10	437643.90	0.272	0.272	0.228	0.228	0.000	0.000	0.228	0.000	0.228	0.000	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000
T92+I	22	1625.724	1479.821	-717.821	0.49	n/a	299808.46	0.272	0.272	0.228	0.228	0.000	0.000	0.228	0.000	0.228	0.000	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000
K2+G+I	22	1629.676	1483.773	-719.797	0.50	0.10	295459.57	0.250	0.250	0.250	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000	0.250	0.000
HKY	23	1631.358	1478.831	-716.318	n/a	n/a	390910.98	0.245	0.298	0.235	0.222	0.000	0.000	0.222	0.000	0.235	0.000	0.000	0.298	0.000	0.245	0.000	0.245	0.000
T92+G+I	23	1634.364	1481.837	-717.821	0.50	0.10	800679.08	0.272	0.272	0.228	0.228	0.000	0.000	0.228	0.000	0.228	0.000	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000	0.272	0.000
TN93	24	1638.847	1479.697	-715.742	n/a	n/a	699279.38	0.245	0.298	0.235	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.441	0.000	0.000	0.559	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
HKY+G	24	1639.998	1480.848	-716.318	n/a	200.00	516391.32	0.245	0.298	0.235	0.222	0.000	0.000	0.222	0.000	0.235	0.000	0.000	0.298	0.000	0.245	0.000	0.245	0.000
HKY+I	24	1639.998	1480.848	-716.318	0.00	n/a	400343.58	0.245	0.298	0.235	0.222	0.000	0.000	0.222	0.000	0.235	0.000	0.000	0.298	0.000	0.245	0.000	0.245	0.000
TN93+I	25	1647.487	1481.715	-715.742	0.49	n/a	392701.25	0.245	0.298	0.235	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.441	0.000	0.000	0.559	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
TN93+G	25	1647.487	1481.715	-715.742	n/a	0.10	285532.34	0.245	0.298	0.235	0.222	0.000	0.000	0.000	0.000	0.441	0.000	0.000	0.559	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Figura 1. Resultados para la búsqueda de modelos de sustitución para la reconstrucción de un árbol filogenético del gen ITS de *A. alternata*

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)	
K2+G	21	2619,682	2483,889	-1220,848	n/a	0,41	2,10	0,250	0,250	0,250	0,250	0,040	0,040	0,169	0,040	0,169	0,040	0,040	0,169	0,040	0,169	0,040	0,040	0,040
K2+I	21	2623,018	2487,225	-1222,516	0,38	n/a	1,88	0,250	0,250	0,250	0,250	0,043	0,043	0,163	0,043	0,163	0,043	0,043	0,163	0,043	0,163	0,043	0,163	0,043
K2+G+I	22	2627,190	2484,941	-1220,364	0,57	200,00	2,07	0,250	0,250	0,250	0,250	0,041	0,041	0,169	0,041	0,169	0,041	0,041	0,169	0,041	0,169	0,041	0,041	0,041
T92+G	22	2627,868	2485,618	-1220,703	n/a	0,41	2,11	0,237	0,237	0,263	0,263	0,038	0,042	0,179	0,038	0,179	0,042	0,038	0,161	0,042	0,161	0,038	0,042	
K2	20	2627,940	2498,605	-1229,215	n/a	n/a	1,76	0,250	0,250	0,250	0,250	0,045	0,045	0,159	0,045	0,159	0,045	0,045	0,159	0,045	0,159	0,045	0,045	
T92+I	22	2631,207	2488,957	-1222,372	0,38	n/a	1,89	0,237	0,237	0,263	0,263	0,041	0,046	0,172	0,041	0,172	0,046	0,041	0,155	0,046	0,155	0,041	0,046	
T92+G+I	23	2635,354	2486,648	-1220,208	0,57	200,00	2,08	0,237	0,237	0,263	0,263	0,038	0,043	0,178	0,038	0,178	0,043	0,038	0,160	0,043	0,160	0,038	0,043	
T92	21	2636,158	2500,365	-1229,086	n/a	n/a	1,77	0,237	0,237	0,263	0,263	0,043	0,048	0,168	0,043	0,168	0,048	0,043	0,151	0,048	0,151	0,043	0,048	
HKY+G	24	2637,083	2481,921	-1216,835	n/a	0,41	2,07	0,225	0,248	0,291	0,235	0,041	0,048	0,158	0,037	0,196	0,039	0,037	0,167	0,039	0,152	0,041	0,048	
TN93+G	25	2638,303	2476,687	-1213,207	n/a	0,45	2,13	0,225	0,248	0,291	0,235	0,040	0,048	0,095	0,037	0,264	0,038	0,037	0,224	0,038	0,091	0,040	0,048	
HKY+I	24	2640,320	2485,159	-1218,454	0,38	n/a	1,87	0,225	0,248	0,291	0,235	0,043	0,051	0,153	0,039	0,189	0,041	0,039	0,161	0,041	0,146	0,043	0,051	
TN93+I	25	2640,662	2479,046	-1214,387	0,38	n/a	1,92	0,225	0,248	0,291	0,235	0,043	0,051	0,094	0,039	0,252	0,041	0,039	0,214	0,041	0,090	0,043	0,051	
HKY+G+I	25	2644,699	2483,083	-1216,405	0,57	200,00	2,04	0,225	0,248	0,291	0,235	0,041	0,048	0,157	0,037	0,195	0,039	0,037	0,166	0,039	0,151	0,041	0,048	
TN93	24	2644,729	2489,568	-1220,658	n/a	n/a	1,79	0,225	0,248	0,291	0,235	0,045	0,053	0,094	0,041	0,243	0,043	0,041	0,207	0,043	0,090	0,045	0,053	
HKY	23	2645,099	2496,393	-1225,081	n/a	n/a	1,76	0,225	0,248	0,291	0,235	0,045	0,053	0,150	0,041	0,186	0,043	0,041	0,158	0,043	0,143	0,045	0,053	
TN93+G+I	26	2646,187	2478,117	-1212,911	0,54	200,00	2,08	0,225	0,248	0,291	0,235	0,041	0,048	0,095	0,037	0,260	0,039	0,037	0,221	0,039	0,091	0,041	0,048	
GTR+G	28	2647,140	2466,166	-1204,912	n/a	0,43	2,06	0,225	0,248	0,291	0,235	0,082	0,065	0,095	0,075	0,258	0,003	0,051	0,220	0,025	0,091	0,003	0,032	
GTR+I	28	2650,459	2469,484	-1206,572	0,38	n/a	1,88	0,225	0,248	0,291	0,235	0,084	0,067	0,094	0,077	0,248	0,007	0,052	0,211	0,028	0,090	0,008	0,035	

Figura 2. Resultados para la búsqueda de modelos de sustitución para la reconstrucción de un árbol filogenético del gen EF-1α de *Fusarium* spp.

Table. Maximum Likelihood fits of 24 different nucleotide substitution models																							
Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
JC	5	1936,338	1908,334	-949,152	n/a	n/a	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083
K2	6	1942,528	1908,929	-948,444	n/a	n/a	0,70	0,250	0,250	0,250	0,250	0,073	0,073	0,103	0,073	0,103	0,073	0,073	0,103	0,073	0,103	0,073	0,073
JC+I	6	1943,945	1910,346	-949,152	0,00	n/a	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083
JC+G	6	1943,946	1910,347	-949,152	n/a	200,00	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083
K2+I	7	1950,135	1910,943	-948,444	0,00	n/a	0,70	0,250	0,250	0,250	0,250	0,073	0,073	0,103	0,073	0,103	0,073	0,073	0,103	0,073	0,103	0,073	0,073
K2+G	7	1950,136	1910,944	-948,444	n/a	200,00	0,71	0,250	0,250	0,250	0,250	0,073	0,073	0,103	0,073	0,103	0,073	0,073	0,103	0,073	0,103	0,073	0,073
T92	7	1950,288	1911,095	-948,520	n/a	n/a	0,71	0,244	0,244	0,256	0,256	0,072	0,075	0,106	0,072	0,106	0,075	0,072	0,101	0,075	0,101	0,072	0,075
JC+G+I	7	1951,692	1912,500	-949,222	0,00	1,99	0,50	0,250	0,250	0,250	0,250	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083	0,083
T92+I	8	1957,895	1913,111	-948,520	0,00	n/a	0,71	0,244	0,244	0,256	0,256	0,072	0,075	0,106	0,072	0,106	0,075	0,072	0,101	0,075	0,101	0,072	0,075
T92+G	8	1957,896	1913,112	-948,520	n/a	200,00	0,71	0,244	0,244	0,256	0,256	0,072	0,075	0,106	0,072	0,106	0,075	0,072	0,101	0,075	0,101	0,072	0,075
K2+G+I	8	1958,444	1913,661	-948,795	0,40	0,54	0,81	0,250	0,250	0,250	0,250	0,069	0,069	0,112	0,069	0,112	0,069	0,069	0,112	0,069	0,112	0,069	0,069
HKY	9	1960,874	1910,502	-946,206	n/a	n/a	0,70	0,259	0,229	0,279	0,233	0,067	0,082	0,097	0,076	0,116	0,068	0,076	0,095	0,068	0,108	0,067	0,082
TN93	10	1966,048	1910,089	-944,990	n/a	n/a	0,71	0,259	0,229	0,279	0,233	0,067	0,082	0,064	0,076	0,153	0,068	0,076	0,126	0,068	0,071	0,067	0,082
T92+G+I	9	1966,218	1915,846	-948,878	0,40	0,50	0,81	0,244	0,244	0,256	0,256	0,067	0,070	0,115	0,067	0,115	0,070	0,067	0,110	0,070	0,110	0,067	0,070
HKY+I	10	1968,480	1912,522	-946,206	0,00	n/a	0,70	0,259	0,229	0,279	0,233	0,067	0,082	0,097	0,076	0,116	0,068	0,076	0,095	0,068	0,108	0,067	0,082
HKY+G	10	1968,481	1912,522	-946,206	n/a	200,00	0,71	0,259	0,229	0,279	0,233	0,067	0,082	0,097	0,076	0,116	0,068	0,076	0,095	0,068	0,108	0,067	0,082
TN93+I	11	1973,655	1912,111	-944,990	0,00	n/a	0,71	0,259	0,229	0,279	0,233	0,067	0,082	0,064	0,076	0,154	0,068	0,076	0,126	0,068	0,071	0,067	0,082
TN93+G	11	1973,656	1912,112	-944,990	n/a	200,00	0,71	0,259	0,229	0,279	0,233	0,067	0,082	0,064	0,076	0,154	0,068	0,076	0,126	0,068	0,071	0,067	0,082

Figura 3. Resultados para la búsqueda de modelos de sustitución para la reconstrucción de un árbol filogenético del gen ITS de *Fusarium* spp.

