

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Caracterización morfológica y molecular de *Alternaria alternata* hongo
fitopatógeno causante del secamiento descendente del cáliz, en frutos de
Physalis peruviana en la Sierra centro-norte del Ecuador**

Disertación previa a la obtención del título de Microbióloga

CAROLINA LIZETH BOSQUEZ GUERRA

Quito, 2018

CERTIFICACIÓN

Certifico que la disertación de Microbióloga de la candidata Carolina Lizeth Bosquez Guerra ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Jeniffer Yánez Altuna, Mtr.

Directora de la Disertación

Quito, febrero de 2018

DEDICATORIA

A Dios, sin Él todo esto no habría sido posible, a mis padres Cristina y Jorge por su amor, confianza y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre y padre que siempre fueron y serán el soporte de mi vida, sin ellos no habría logrado terminar este trabajo.

A mi directora de disertación Mgtr. Jeniffer Yáñez por todo su apoyo y tiempo brindado durante el desarrollo de la disertación.

A mis amigas Bibiana y Alejandra por su amistad, y por enseñarme que la verdadera amistad existe.

A esa persona especial que creyó en mí y me dio su apoyo.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la PUCE, por permitir el uso de equipos e instalaciones, para la realización de esta investigación. Agradezco principalmente a la Doctora Doris Vela, que no puso ningún reparo para prestarnos su laboratorio.

A mis compañeros de investigación David y Martin gracias a su compañía la realización de la disertación fue más llevadera.

Finalmente, a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador por el financiamiento a través del proyecto de investigación “Diagnóstico de las enfermedades y de plagas en cultivos comerciales de uvilla (*Physalis peruviana*) en el Ecuador”, bajo la convocatoria 2016-2017.

Pon en manos del señor todas tus obras y tus proyectos se realizarán

(Prov 16:3)

LISTA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Uvilla (<i>Physalis peruviana</i> L)	4
3.1.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	4
3.1.2 CONDICIONES DEL CULTIVO	4
3.1.3 SECAMIENTO DESCENDIENTE DEL CÁLIZ	5
3.2 <i>Alternaria alternata</i>	6
3.2.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA: características microscópicas y macroscópicas	6
3.2.2 IDENTIFICACIÓN MOLÉCULAR	7
3.3 OBJETIVOS	8
3.3.1 OBJETIVO GENERAL.....	8
3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS	9
4.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	9
4.1.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE <i>A. alternata</i>	9
4.2 IDENTIFICACIÓN	9
4.2.1 ANÁLISIS MORFOLÓGICO	9
4.2.2 ANÁLISIS MOLECULAR	10
4.3 POSTULADOS DE KOCH	11
4.3.1 PREPARACIÓN DEL INOCULO	12
4.3.2 INOCULACIÓN	12
4.3.3 RE AISLAMIENTO DEL HONGO E IDENTIFICACIÓN	12
5. RESULTADOS	14
5.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL PATÓGENO	14
5.2 IDENTIFICACIÓN DEL <i>A. alternata</i>	14
5.3 POSTULADOS DE KOCH	15
6. DISCUSIÓN	16
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
8. FIGURAS	26
9. TABLAS	28

10. ANEXOS 33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Cultivo de *Physalis peruviana* sano en la provincia Imbabura (Quiroga)26
- Figura 2.** Conidios de *Alternaria alternata* (40x) con tinción de azul de lactofenol.26
- Figura 3.** Observación de la colonia de *Alternaria alternata* en PDA a los 10 días de cultivo. (A) anverso y (B) reverso27
- Figura 4.** Resultados de los Postulados de Koch en frutos de *Physalis peruviana* a los 8 días de cultivo en cámara húmeda.27

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Lugares de muestreo, coordenadas geográficas, número e identificación de muestras.	28
Tabla 2.	Medidas de largo y ancho de 20 conidios de aislados de <i>Alternaria alternata</i> obtenidos de lecciones de frutos.	29
Tabla 3.	Concentración de ADN de <i>Alternaria alternata</i> por Nanodrop, de aislados primarios y aislados de los postulados de Koch	30
Tabla 4.	Volúmenes y reactivos utilizados para la reacción de la PCR	30
Tabla 5.	Condiciones de PCR	31
Tabla 6.	Identificación molecular de los aislados primarios y postulados .	31
Tabla 7.	Porcentajes de infección en frutos de uvilla a los 8 días de acuerdo a los métodos aplicados para obtener postulados de Koch	32

ANEXOS

Anexo 1.	Taxonomía de <i>Alternaria alternata</i> (Mycobank, 2016)	33
Anexo 2.	Secuencias de los aislados primarios y de los reaislados de los postulados en formato FASTA.....	34

1. RESUMEN

Los cultivos de uvilla son una fuente importante de ingresos para la economía del Ecuador, sin embargo, estos se ven afectados por enfermedades de origen fúngico entre las que destacan el secamiento descendente del cáliz y fruto ocasionado por complejo *Cladosporium* sp y *Alternaria* sp, derivando en la pérdida total del fruto. El objetivo de este estudio fue la identificación morfológica y molecular del patógeno *Alternaria* spp aislado a partir de lesiones de frutos y capuchones. Se recolectaron 345 muestras de 14 localidades ubicadas en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Cotopaxi. Todas las muestras fueron desinfectadas y sembradas en agar papa dextrosa (PDA) con gentamicina. Se incubó a temperatura ambiente por 7 días con observaciones diarias. Las colonias de hongos que presentaban la morfología macroscópica de *Alternaria* spp, fueron aisladas mediante subcultivos. Las características microscópicas de *Alternaria* spp fueron confirmadas mediante microscopía. A continuación, se realizó los Postulados de Koch en frutos de sanos de uvilla, que fueron incubados a temperatura ambiente de 7 a 10 días. La presencia de síntomas se registró a diario y una vez producida la lesión, los hongos se reaislaron. Para la identificación molecular de los aislados primarios y de los reaislados se realizó la extracción de ADN, PCR y secuenciación. Los amplicones obtenidos fueron enviados a Macrogen (Seúl-Corea del Sur), para su respectiva secuenciación. La herramienta BLAST del NCBI identificó al hongo fitopatógeno como *Alternaria alternata*. No se obtuvo aislados con características de ser *Cladosporium* sp. Los resultados obtenidos muestran que *A. alternata* es capaz de desarrollar la enfermedad sin la presencia de *Cladosporium* sp.

Palabras claves: *Alternaria alternata*, hongo, secamiento descendente, uvilla.

2. ABSTRACT

Uvilla (Golden Berry) crops are an important source of income for the economy of the country, however, these are affected by fungal original diseases among which stands out the descending drying of the calyx and fruit caused by *Cladosporium* spp and *Alternaria* spp complex , resulting in the total loss of the fruit. The objective of this study was the morphological and molecular identification of the pathogen *Alternaria* spp isolated from lesions of fruits and calyx. Three hundred and forty-five samples were collected from 14 localities located in the provinces of Imbabura, Pichincha, Tungurahua and Cotopaxi. All samples were disinfected and culture on potato dextrose agar (PDA) with gentamicin. It was incubated at room temperature for 7 days with daily observations. The fungal colonies that presented the macroscopic morphology of *Alternaria* spp, were isolated by subcultures.

The microscopic characteristics of *Alternaria* spp were confirmed by microscopy. Next, the Koch Postulates were made in healthy fruits of uvilla, which were incubated at room temperature for 7 to 10 days. The presence of symptoms was recorded on a daily and once the lesion was produced, the fungi were re-isolated. For the molecular identification, DNA extraction, and the PCR were carried out and the obtained product were sent to Macrogen in Seoul-South Korea, for their respective sequencing. The NCBI BLAST tool identified the phytopathogenic fungus as *Alternaria alternata*. No isolates with characteristics of *Cladosporium* spp were obtained. The results obtained show that *A. alternata* is able to develop the disease without the presence of *Cladosporium* spp.

Keywords: *Alternaria alternata*, fungus, descending drying, uvilla (gold berry)

3. INTRODUCCIÓN

Los cultivos de *Physalis peruviana* se han convertido en fuente de ingresos para los ecuatorianos, debido especialmente al incremento en el volumen de exportaciones en los últimos años. Se estima que, al año, Ecuador produce alrededor de 10 050 toneladas métricas de uvillas, de las cuales más de la mitad son destinadas a mercados internacionales. Desde el 2012 al 2014, las exportaciones se incrementaron en 1,291% aportando al país en divisas alrededor de 334 000 dólares (Instituto de Promoción de Exportaciones e Inversiones [PROECUADOR], 2013, 2014).

En el año 2016, existió un incremento de exportaciones en un 160,4% con respecto a años pasados, evidenciando que el cultivo de uvillas en el país se ha fortalecido, para cubrir la demanda de mercados internacionales. Los países que actualmente tienen abierto su mercado para uvillas ecuatorianas son: Reino Unido, Holanda, España, Francia, Alemania, Suiza y Canadá (PROECUADOR, 2017). Sin embargo, las ganancias que se generan por el cultivo de uvilla disminuyen debido a enfermedades de origen fúngico que atacan a la planta, específicamente aquellas enfermedades que dañan capuchones y frutos, como es el secamiento descendente del cáliz generadas por el complejo *Cladosporium* sp – *Alternaria* sp (Díaz, Smith, Zapata, y Mesa, 2012).

En el país, Chicaiza (2008) reporta al hongo fitopatógeno *Alternaria* sp como el causante de lesiones a nivel de hojas, pero no a nivel de frutos. Hasta el año 2017, no existen publicaciones sobre el estado fitosanitario de los frutos de uvilla en Ecuador (Vizcaíno y Betancourt, 2016). Desde el 2008, las condiciones ambientales para el cultivo y las reglamentaciones para exportación de uvilla han cambiado, por lo que se requiere una actualización de los registros fitosanitarios fúngicos (PROECUADOR, 2014). Es así que este estudio pretende identificar al patógeno fúngico *Alternaria* sp. como uno de los causantes de problemas en postcosecha. en frutos de uvilla.

3.1 Uvilla (*Physalis peruviana* L)

3.1.1 Descripción botánica

Dentro de la familia de las *Solanaceae*, se encuentra la especie *Physalis peruviana* que cuenta con 30 variedades (Duque, Giraldo, y Quintero, 2011). Las plantas de uvilla crecen en forma herbácea en su etapa inicial, a partir del segundo año forma un arbusto semileñoso y perenne, sus hojas tienen forma de corazón y son pubescentes su tamaño oscila entre 4 a 10 cm de ancho y 5 a 15 cm de largo. La altura promedio de la planta sin podar es de 1 a 1.5 m. Se ramifica en forma simpodial formado cuatro ramas principales de reproducción (Fischer, Almanza y Miranda, 2014). Su forma de crecimiento es indeterminada debido a que el desarrollo de nuevas flores, ramas y hojas se realiza de manera combina (Fischer et al., 2014).

El fruto de la uvilla crece y se desarrolla dentro del cáliz o capuchón hasta el tiempo de su cosecha (Balaguera et al., 2014). Presenta un color amarillo-anaranjado, su tamaño está entre 1,25 a 2,5 cm de diámetro, con un peso entre 4 a 10 g (Fischer et al., 2014). Contiene alrededor de 100 a 300 semillas y presenta piel brillante y delgada. Los carotenoides son los responsables del color del fruto. Se caracteriza por tener un sabor dulce y agrio (Duque et al., 2011).

3.1.2 Condiciones del cultivo

Los cultivos de uvilla requieren ciertos requerimientos edafoclimáticos para su óptimo desarrollo. Entre estos requerimientos tenemos: la altitud que oscila entre 1.000 a 3.200 m.s.n.m, siendo la óptima 2.000 a 2.400 m.s.n.m, con intensidades lumínicas de 1.500 a 2.000 horas luz por año. La temperatura adecuada fluctúa entre 13 y 18°C (Vizcaino y Betancourt, 2016). Las temperaturas altas y bajas perjudican a la floración y fructificación. La condición general de toda la planta se ve afectada por lluvias persistentes. El contenido nutricional, tamaño, sabor, color y tiempo de maduración del fruto se ve influenciada por la temperatura y la luz. La humedad relativa para evitar el resquebrajamiento de los frutos debe oscilar entre 80% y 90%. Se recomiendan

suelos con texturas areno-arcillosas con un pH entre 5,5 a 7, con cantidades altas de materia orgánica y buen drenaje (Calvo, 2009).

El lapso de producción de la uvilla es de nueve a once meses desde que se realiza la primera cosecha. La productividad y la calidad del fruto disminuyen después de este periodo. Durante el almacenamiento del fruto, este debe mantenerse dentro de su cáliz para evitar cambios en sus características organolépticas. La etapa poscosecha permite asegurar la calidad del producto hasta ser consumido (Solíz, Bueno, Sandoval, y Reza, 2016; Calvo, 2009).

Las prácticas de manejo del cultivo, permiten asegurar la calidad del producto e incluyen: la fertilización, la poda y el control fitosanitario. La fertilización puede ser realizada con materia orgánica de cualquier tipo, es importante aplicar fertilizantes cuando la planta se encuentra en producción con intervalos de dos meses. La poda mejora el tamaño del fruto y facilita la cosecha (Zapata, Saldarriaga, Londoño, y Díaz, 2002).

En cuanto al estado fitosanitario, los cultivos de uvilla son afectados por enfermedades ocasionadas por virus, bacterias y hongos. Entre las enfermedades de mayor importancia causadas por bacterias y virus tenemos: mancha grasienta (*Xanthomonas* sp), marchitez bacteriana (*Ralstonia solanacearum*) y mosaico de la uvilla (Zapata, Saldarriaga, Londoño, y Díaz, 2002). Sin embargo, la mayor cantidad de pérdidas en los cultivos es causada por enfermedades de origen fúngico, entre las que destacan: mal del semillero (principalmente *Phytophthora* sp), mancha gris (*Cercospora* sp), mancha negra de las hojas (*Alternaria* sp), marchitez vascular (*Fusarium oxysporum*), muerte descendente (*Phoma* sp), y secamiento descendente del cáliz (complejo *Alternaria* sp y *Cladosporium* sp). (Zapata, Saldarriaga, Londoño, y Díaz, 2002; Díaz, Smith, Zapata, y Mesa, 2012). Siendo el secamiento descendente del cáliz una enfermedad muy importante a nivel de poscosecha.

3.1.3 Secamiento descendente del cáliz

Esta enfermedad se puede presentar en frutos próximos a su maduración o que ya han sido cosechados. Los agentes causales de la

enfermedad son el complejo *Alteraría* sp y *Cladosporium* sp. Cuando los ápices se ven afectados estos se acartonan, cambian de turgencia y se vuelven secos y ásperos al tacto. El fruto cambia de color tornándose pálido, gradualmente se produce el secamiento del cáliz. *Alternaria* sp genera masas fungosas de color blanco que va cambiando a verde oliváceo en los frutos, *Cladosporium* sp ocasiona lesiones de color café oscuro (Blanco, 2000; Smith, 2012). *Alternaria* sp., es considerado un parásito débil que está asociado a otras enfermedades. Ataca a plantas con deficiencias nutricionales, en estado de envejecimiento y atacadas por virus (Blanco, 2000). En uvilla se encuentra en el envés de las hojas, causado la mancha negra de las hojas, se observa círculos concéntricos y halos cloróticos en las lesiones de las hojas. Cuando la enfermedad no se controla las hojas se secan por completo (Zapata, Saldarriaga, Londoño, y Díaz, 2002).

3.2 *Alternaria alternata*

Dentro del complejo *Alternaria* destaca *Alternaria alternata* que es una especie patógena para plantas, perteneciente a la división Ascomycota. Las estructuras reproductivas como los conidios son capaces de hibernar sobre restos de plantas enfermas o semillas. Las esporas que se mantiene en restos infectados son liberados con ayuda de lluvias o rocíos fuertes. Las esporas germinan y penetran el tejido sensible directamente o a través de heridas, y producen nuevos conidios que se propagan por el viento y salpicaduras de lluvia (Agrios, 2005). Su identificación puede realizarse a nivel morfológico y molecular

3.2.1 Identificación morfológica: características microscópicas y macroscópicas

Alternaria alternata es un hongo filamentoso que presenta conidióforos simples, tabicados, en el extremo forma cadenas largas a menudo ramificada de conidios multiformes de color café pardo, con septos transversales y verticales. El tamaño de los conidios es 20-93 por 9-18 um. Sus hifas son septadas con color. Los conidios se desprenden rápidamente, lo que permite que sean trasportadas por corrientes de aire. Sus colonias tienen el aspecto de

terciopelo o gamuza, son de color blanco grisáceo al inicio con el tiempo se vuelven de color negro con un borde blanco grisáceo, al reverso son de color negro (Ramjegathesh y Ebenezar, 2012; Agrios, 2005).

3.2.2 Identificación molecular

La identificación de hongos generalmente utiliza la secuenciación de los espaciadores transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés) del ADN nuclear ribosomal con los *primers* ITS 1 e ITS 4 (White et al. 1990; Ning et al, 2016; Zhang, Li, Gen, Guo, y Wu, 2017). Estas regiones permiten comparar hongos a nivel inter e intraespecíficos, muy útiles para análisis filogenéticos debido a que son áreas de alta conservación y variabilidad (Saltos, 2012).

Varios autores han usado la amplificación de la región ITS para la identificación a nivel especie de *Alternaria alternata*. Yao y Yu (2015), usando los *primers* ITS1/ITS4, identificaron a *Alternaria alternata*, en hojas enfermas de *Ficus microcarpa*. De igual manera, Ravi y Nagalakshmi (2012) usando la región ITS identificaron *Alternaria alternata* en plantas de *Rumex vesicarius*. Kwon y Kang en el 2016, usaron los *primers* ITS1/ITS4 y EF1-728F/EF1-986R para identificar *A. alternata*. Ellos obtuvieron el 100% de coincidencia con la amplificación de la región ITS, y el 98% de similitud con los *primers* EF1-728F/EF1-986R.

Debido a registros previos reportados en el país (Chicaiza, 2008) y a la importancia de *Alternaria alternata* como un hongo fitopatógeno que afecta a la familia de las *Solanaceae* (Nabahat et al, 2016), se ve la necesidad de identificar este patógeno como posible agente causal de enfermedades en frutos de uvilla en el país.

3.3 OBJETIVOS

3.3.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterización morfológica y molecular de *Alternaria alternata* obtenida de lesiones de capuchones y frutos de *Physalis peruviana*.

3.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Aislar el hongo *Alternaria alternata* a partir de capuchones y frutos de uvillas en diversas localidades de la Sierra centro - norte del Ecuador
- Realizar la caracterización morfológica, macro y microscópica de aislados de *Alternaria alternata* obtenidos de capuchones y frutos de uvilla.
- Identificar molecularmente a nivel de especie, los aislados de *Alternaria* sp obtenidos de uvilla, mediante amplificación de la región ITS.
- Verificar que el secamiento descendiente en *Physalis peruviana* es producido por *Alternaria alternata* mediante postulados de Koch usando tres métodos de inoculación.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Recolección de muestras

Un total de 345 capuchones y 345 frutos de uvilla que presentaban sintomatología de secamiento descendente fueron recolectados de diferentes cultivos de *Physalis peruviana*. El muestreo se realizó desde octubre del 2016 hasta marzo del 2017, en diferentes zonas de las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua y Cotopaxi. Las muestras fueron debidamente identificadas, georeferenciadas y codificadas según la localidad e iniciales del propietario (Tabla 1).

Los frutos de uvilla y capuchones fueron tomados directamente de la planta con ayuda de tijeras podadoras desinfectadas. Las muestras se colocaron dentro de fundas tipo ziploc debidamente etiquetadas con nombre, lugar y fecha de recolección. Se mantuvo las muestras a temperatura ambiente 22-25°C para su inmediato procesamiento en el laboratorio.

4.1.1 Aislamiento y purificación de *Alternaria alternata*

Las muestras fueron procesadas según el protocolo descrito por Agrios (2005), para la desinfección de muestras con ligeras modificaciones. Se cambió la concentración del hipoclorito de sodio al 2% y se incluyó 3 lavados con agua destilada estéril.

Con ayuda de una pinza estéril se colocó los segmentos de fruto en papel absorbente autoclavado para secarlos y ubicarlos en cajas Petri con medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA por sus siglas en inglés) con gentamicina (1 ml.l⁻¹). Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (25°C) con monitoreos diarios, y se realizaron subcultivos de las colonias de interés a nuevas cajas con PDA para su purificación (López y Castaño, 2013).

4.2 Identificación

4.2.1 Análisis morfológico

La identificación macroscópica se realizó mediante la observación de las características morfológicas de las colonias en medio de cultivo PDA: forma, textura, color y producción de pigmentos. Se observó el anverso y reverso de las colonias (Figura 3) (Góngora y Rojas, 2006).

Se utilizaron dos técnicas de observación microscópica. La primera fue una impronta de la colonia del hongo con ayuda de cinta adhesiva, colocada sobre un vidrio porta objetos con una gota de azul de lactofenol (Figura 2). En la segunda técnica, se colocó un segmento de agar con crecimiento del hongo en la placa porta objetos, se añadió una gota de azul de lactofenol y se cubrió con el cubre objetos (Crous, Verkley, Groenewald, y Samson, 2009). Además, se midieron 20 conidios (esporas) al largo y ancho de cada uno usando el software Piximètre (Tabla 2).

4.2.1.1 Cultivos monospóricos

Para obtener los cultivos monospóricos se realizó la técnica mencionada por Crous, Verkley, Groenewald, y Samson en 2009 con ligeras modificaciones, donde se reemplazó el agua estéril por Tween al 10% para realizar la suspensión de los conidios. Se colocó en una caja Petri 10 ml de la suspensión y se procedió a observar en el estereomicroscopio. Con ayuda de una pinza estéril se tomó los conidios y se los ubicó en agar PDA con gentamicina (1 ml.l⁻¹). Se incubó a temperatura ambiente con observaciones diarias. Las colonias obtenidas fueron sub cultivadas en nuevas cajas Petri con PDA

4.2.2 Análisis molecular

La extracción del ADN genómico total se realizó usando el kit comercial *Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega, 2017), siguiendo el protocolo de extracción de ADN de plantas recomendado por el fabricante con ligeras modificaciones. Se eliminó el uso de nitrógeno líquido para macerar las muestras y se reemplazó el isopropanol por etanol absoluto. Se empleó 40mg de micelio superficial raspado de los hongos cultivados en agar PDA. El ADN

obtenido se cuantificó mediante espectrofotometría usando el equipo Nanodrop (Tabla 3). La calidad se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa. El ADN se almacenó a -20°C hasta realizar la amplificación

Se amplificó mediante PCR la región ITS del ADN ribosomal utilizando los *primers* ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCT TATTGATATGC 3') descritos por White et al. (1990). El volumen final de reacción de PCR fue de 25 µl (Tabla 4), con las condiciones de PCR expuestas en la Tabla 5, (Díaz, 2016). Los productos obtenidos de la PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con *SYBR® Safe*. Estos amplicones fueron purificados con el kit *Wizard® SV Gel y PCR Clean-Up System*, (Promega, 2010), y enviados a la empresa Macrogen (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias recibidas (*forward* y *reverse*) fueron alineadas con *Clustal W* que forma parte del programa MEGA 7 para obtener la secuencia consenso. La identificación de los hongos a nivel de género y especie se realizó mediante el uso de la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés), (Gómez, Martínez, y Carreón, 2012; Tamura, Stecher, Peterson, Filipinski, y Kumar, 2013).

4.3 Postulados de Koch

Los postulados de Koch son procedimientos experimentales normalizados que permiten revelar la relación causa-efecto entre la enfermedad y el microorganismo estudiado (Fuentes, 2007). En el área de la fitopatología se usa los postulados cuando no se tiene la certeza o información bibliográfica que respalde suposiciones, que cierto patógeno es causante de la enfermedad (Volcy, 2008).

Los pasos a seguir son:

- El patógeno debe estar asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examine.

- El patógeno debe aislarse y desarrollarse de plantas enferma en cultivo puro, se deben describir sus características morfológicas.
- El patógeno de un cultivo puro debe ser inoculado en plantas de la misma variedad o especie y desarrollar la misma enfermedad.
- El patógeno debe aislarse nuevamente en cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas previamente.

Cuando se cumplen los postulados, se tiene la certeza de que el patógeno aislado es el causante de la enfermedad (Fuentes, 2007; Volcy, 2008).

4.3.1 Preparación del inóculo

Para la producción de conidios se sembró el hongo en agar PDA, a temperatura ambiente con fotoperiodos de 12 horas por 10 días. Con ayuda de un bisturí estéril se raspó el micelio, el cual fue colocado en agua estéril y se mantuvo en agitación por 10 minutos (Erper, Celik, Turkkan, y Cebi, 2015). La concentración de los conidios se ajustó a 1×10^5 conidios/ml. La concentración deseada se logró mediante conteo en cámara de Neubauer (López y Castaño, 2013).

4.3.2 Inoculación

Cuarenta y cinco frutos sanos y maduros, fueron desinfectados en hipoclorito de sodio al 1 % por un minuto, seguido de tres enjuagues con agua destilada estéril por un minuto cada lavado (Erper, Celik, Turkkan, y Cebi, 2015).

Se probaron tres métodos de inoculación: A: inyección, donde el inóculo fue inyectado en el pedúnculo de 5 frutos de uvilla con ayuda de una jeringuilla estéril; B: inmersión, 5 frutos fueron sumergidos en el inóculo por un minuto; C: inmersión más laceración, 5 frutos fueron sumergidos en el inóculo y luego lacerados con la ayuda de un bisturí estéril (López y Castaño, 2013).

Cada método de inoculación fue replicado tres veces. Los frutos infectados se colocaron en cámaras húmedas a temperatura ambiente y fueron

vigilados diariamente por 7 a 10 días (Góngora y Rojas, 2006; Erper, Celik, Turkkan, y Cebi, 2015).

4.3.3 Reaislamiento del hongo e identificación

A partir de los frutos que presentaron síntomas de enfermedad (Figura 4), se re aisló el patógeno en agar PDA con gentamicina (1 ml.l^{-1}). La identificación de estructuras se realizó mediante la observación de estructuras propias del hongo en el microscopio (Góngora y Rojas, 2006; Cardona, Montoya, y Diez, 2012). Con la confirmación morfológica se procedió a la identificación molecular arriba descrita.

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento e identificación del patógeno

Se obtuvo en total cinco aislados sospechosos para *A. alternata*, provenientes de las provincias de Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura. Los aislados fueron confirmados como *Alternaria alternata* por sus características morfológicas y moleculares. En la provincia de Pichincha no se obtuvo aislados sospechosos de *Alternaria alternata*.

5.2 Identificación del *Alternaria alternata*

Las colonias en plato Petri se presentaron aterciopeladas planas, de color blanco al inicio y luego se tornaron grisáceas. El tiempo de crecimiento fue de 5 a 7 días. Las colonias de los aislados primarios tanto como las de los aislados recuperados de los postulados de Koch presentaron las mismas características.

Microscópicamente, las hifas observadas fueron septadas y de color café pardo, al igual que los conidios multiformes, con septos transversales y verticales (Figura 2).

El largo promedio de los conidios varió desde 47,69 a 51,38 μm , siendo los conidios del aislado PB PS (A1) los más largos, seguidos por los del aislado VM QI (A2). El ancho promedio de los conidios fue de 19,60 a 19,82 μm . El aislado FO T (A1) presentó los conidios más anchos seguido de FG T (B2) (Tabla 2).

La extracción de ADN fue exitosa y se obtuvieron concentraciones altas que oscilaban de 206,5 a 573,6 ng/ μl . El mejor rango de calidad del ADN se obtuvo de los aislados recuperados de los postulados de Koch. La mayor parte del ADN obtenido no cumplió con los rangos de pureza de 1,8 - 2,00 según la relación 260/280. De igual manera no cumple con el rango 2,0 – 2,2 según la relación 260/230 (Tabla 3).

La región ITS se amplificó con éxito para todos los aislados y el tamaño de los amplicones bordeó los 550 pb aproximadamente.

La identificación de las secuencias mediante la herramienta BLAST de *GenBank*, reportó que todos los aislados corresponden a *Alternaria alternata* con el 100% de identidad (Tabla 6).

5.3 Postulados de Koch

En los tres métodos de inoculación aplicados, se observó el crecimiento micelial en los frutos, los controles se mantuvieron negativos, sin desarrollo de síntomas. Los signos de la enfermedad aparecieron a partir del quinto día de incubación, cuando se observó el desarrollo de micelio blanco sobre los frutos, con el paso del tiempo el micelio cambio de color a grisáceo verdoso (Figura 4).

El porcentaje de frutos enfermos varió según el método de inoculación. El método de inmersión fue el mejor, con un porcentaje de infección del 86,67% al 100%, (Tabla 7). El aislado FO T (A1), proveniente a la provincia de Tungurahua fue el más virulento, ya que de 45 frutos inoculados se infectaron 40.

6. DISCUSIÓN

De las 345 muestras de frutos y capuchones de *Physalis peruviana* recolectadas de 14 localidades en las provincias de Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura, se obtuvieron 5 aislados de *Alternaria alternata*. En Pichincha no se encontró aislados positivos de *Alternaria alternata*, debido a que la producción de uvilla en esta provincia aun no es sobre explotada como lo es en Tungurahua, Cotopaxi e Imbabura (PROECUADOR, 2014).

El secamiento descendente es una enfermedad causada por el complejo *Alternaria* sp y *Cladosporium* sp según lo reportado por Smith, (2012). Sin embargo, durante este estudio se evidenció que únicamente *Alternaria alternata* puede ser el causante de la enfermedad en frutos de *Physalis peruviana*. Mediante el uso de los postulados de Koch se confirmó la relación causa efecto, entre el secamiento descendente y *A. alternata*.

Se ha reportado a *Cladosporium* sp como saprófito en algunas plantas (Delgado, Castaño y Villegas, 2013). Sin embargo, en el caso del secamiento descendente, se puede pensar, que el patógeno que primero ataca a los frutos es *Alternaria alternata* (Smith, 2012), ya que es un patógeno que tiene la capacidad por si solo de causar enfermedades en varias plantas de la familia *Solanaceae* (Nabahat et al, 2016). Los frutos de uvilla atacados por *A. alternata* se debilitan, convirtiéndose en un blanco fácil para el ingreso del saprófito *Cladosporium* sp, y así se forma el complejo *Cladosporium* sp/ *Alternaria* sp, que se evidencia en condiciones de campo. Sharma y Khan (1978) confirman lo propuesto con anterioridad, sus resultados revelan que *Alternaria* sp es el primer patógeno en causar los daños en frutos de uvilla, y posteriormente *Cladosporium* sp coloniza el fruto enfermo.

Todos los métodos aplicados para inoculación en los postulados de Koch fueron exitosos y evidenciaron el desarrollo de síntomas del secamiento descendente en frutos de uvilla. Los síntomas que se observaron en los frutos durante los postulados de Koch concuerdan los reportados en la literatura (Smith, 2012).

Por los resultados obtenidos, con el método de inmersión, se confirma que el patógeno ingresa a través del capuchón, este puede viajar desde las hojas hasta los frutos con ayuda del viento o puede ser llevado por el agua en caso de lluvias (Fischer, Almanza, y Miranda, 2014). Las esporas germinadoras de *A. alternata* que se encuentra en material contaminado, son capaces de ingresar en tejidos sensibles o, a través de heridas y producir nuevos conidios que van crecer sobre los frutos (Agrios, 2005;).

Las condiciones de humedad y temperatura, que brinda la cámara húmeda ayudaron al desarrollo de la enfermedad en los frutos. Estas condiciones ambientales son necesarias para el progreso de enfermedades de origen fúngico en plantas. Cumpliendo así con el triángulo de enfermedad mencionado por Agrios (2005), hospedero susceptible, patógeno virulento y condiciones ambientales favorables.

Las colonias de los aislados obtenidos y purificados en agar PDA presentaron características similares a los reportados por Ramjegathesh y Ebenezar (2012). Estos autores reportan que el tamaño promedio de los conidios fue de 30,99-42,47 μm x 11,9-17,37 μm para *A. alternata*, los resultados obtenidos en este estudio fueron 47,69-50,97 μm x 18,82-19,6 μm , son cercanos a los obtenidos por Ramjegathesh y Ebenezar (2012). Misaghi, Grogan Duniway y Kimble (1977), reportan que el tamaño de los conidios puede variar por la composición del medio de cultivo, la temperatura de incubación, la humedad y las horas de luz y de oscuridad a las que han sido expuestos los cultivos

El protocolo utilizado para la extracción de ADN, (Promega, 2017) permitió obtener concentraciones altas de ADN, sin embargo, la calidad del mismo no cumplía con los rangos establecidos por relación 260/280 y 260/230. En el caso del 260/280, pudieron existir contaminantes como proteínas o fenoles (Thermofisher, 2015). Para mejorar estos problemas se recomienda usar mayor cantidad de RNAsas y aumentar el tiempo de secado cuando se elimina el alcohol absoluto. Sin embargo, la calidad del ADN obtenida en el presente estudio fue suficiente para obtener amplificación por medio de PCR.

La amplificación de la región ITS usando los *primers* ITS 1 e ITS 4, permitió la identificación exitosa de los aislados a nivel de especie (Tabla 7). El tamaño de los amplicones fue de 550 pb aproximadamente, (Brasileiro, Moura, de Morais y De Oliveira 2004). Yao y Yu (2015), Ravi y Nagalakshmi (2012) y Kwon y Kang (2016) lograron identificar *Alternaria alternata* a nivel de especie amplificando solamente la región ITS, y utilizando específicamente los *primers* ITS1/ITS4, al igual que en este estudio.

Para esta investigación no se realizaron estudios de filogenia, debido a que se buscaba confirmar que el patógeno aislado de lesiones en frutos de *Physalis peruviana*, sea el causante del secamiento descendente. Lo cual se confirma mediante el uso de los postulados de Koch, que es una herramienta usada en fitopatología cuando no se tiene la certeza o información bibliográfica de que cierto patógeno es causante de la enfermedad (Volcy, 2008).

Mediante este procedimiento se confirmó que *A. alternata* obtenida de lesiones de frutos es el agente causal del secamiento descendente que causa daños a nivel de frutos de *Physalis peruviana*.

Los resultados encontrados en la presente investigación contribuyen al conocimiento sobre patógenos que afectan a los cultivos de *Physalis peruviana* en el país, actualizando parte del estado fitosanitario ecuatoriano que abrirá nuevas puertas de investigación para el control eficiente de *A. alternata*.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (5ta Ed.). Estados Unidos: Elsevier Academic Press.
- Balaguera, H., Martínez, C., & Herrera, A. (2014). Papel del cáliz en el comportamiento poscosecha de frutos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) ecotipo Colombia. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 8(2), 181-191. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rcch/v8n2/v8n2a02.pdf>
- Blanco, O. (2000). Manejo de enfermedades. *Producción, Poscosecha y Exportación de la Uchuva (Physalis peruviana L.)*. ISBN: 958-8051-74-6
- Brasileiro, B., Moura, M., De Morais, M., & De Oliveira, N. (2004). Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR-Fingerprinting based on PCR markers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 205-210. Recuperado de <http://www.scielo.br/pdf/bjm/v35n3/a06v35n3.pdf>
- Calvo, I. (2009). El cultivo de la Uchuva. *Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG] de Costa Rica*, 10, 1-8. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00170.pdf>
- Crous, P., Verkley, G., Groenewald, J., & Samson, R. (2009). Fungal Biodiversity. *CBS-KNAW*. ISBN 978-90-70351-77-9
- Chicaiza, G. P. (2008). *Inventario de enfermedades fungosas de la uvilla Physalis peruviana en las parroquias de Yaruquí y Amaguaña del cantón Quito, provincia de Pichincha*. (Tesis de grado). Recuperado de <http://dspace.ueb.edu.ec/bitstream/123456789/73/3/02.pdf>
- Delgado, C., Castaño, J., & Villegas, B. (2013). Caracterización del agente causante de la roña del maracuyá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*

degener) en Colombia. *Rev. acad. colomb. Cienc*, 37 (143), 215-227.

Recuperado

<http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v37n143/v37n143a05.pdf>

Díaz, J. L. (2016). *Caracterización molecular y análisis filogenético de hongos microscópicos asociados a manchas foliares en hojas de uvilla (Physalis peruviana L.) en varias localidades del cantón Quito, Pichincha*. (Tesis de

de grado). Recuperado de

<http://repositorio.puce.edu.ec/handle/22000/12516>

Duque, A., Giraldo, G., & Quintero, V. (2011). Caracterización de la fruta, pulpa y concentrado de uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Temas agrarios*, 16(1),

75-83. Recuperado de

<http://revistas.unicordoba.edu.co/rta/actualizacion2011/revista%20temas%20agrarios/caracterizacion%20de%20la%20fruta.pdf>

Erper, I., Celik, H., Turkkan, M., & Cebi, M. (2015). First report of *Botrytis cinérea* on Golden Berry. *Australasian Plan Dis. Notes*, 10 (25), 1-2. DOI

10.1007/s13314-015-0175-0

Fischer, G., Almanza, p., & Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Rev. Bras. Fructic., Jaboticabal*, 36 (1),

1-15. <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>

Fischer, G., Herrera, A., Almanza, P. *Cape gooseberry (Physalis peruviana L.)* In: YAHIA, E.M.

(Ed.). *Postharvest biology and technology of tropical and subtropical*

fruits. Acai to citrus. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011. v. 2,

p.374-396.

Fuentes, C. (2007). *Los postulados de Koch: revisión histórica y perspectiva actual*. Recuperado de

<http://revistas.ucm.es/index.php/RCCV/article/view/RCCV0707230262A>

Gómez, N., Martínez, M., & Correón, Y. (2012). Utilización del ADN ribosomal 18S para la identificación de Hongos Micorrízicos Arbusculares que colonizan plantas de aguacate (*Persea americana Mill.*). *Biológicas* 14 (2), 42-47. Recuperado de

[https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj03Pu3-](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj03Pu3-4vNAhXFKB4KHeH9DHUQFghZMAk&url=http%3A%2F%2Fwww.biologicas.umich.mx%2Findex.php%2Fbiologicas%2Farticle%2Fdownload%2F136%2F135&usg=AFQjCNHtRP7HDv4JBuzf2gJzT_wyP9P7KQ&sig2=is0jJhCgEJNfz8HTplpkyg&bvm=bv.123664746,d.dmo)

[4vNAhXFKB4KHeH9DHUQFghZMAk&url=http%3A%2F%2Fwww.biologicas.umich.mx%2Findex.php%2Fbiologicas%2Farticle%2Fdownload%2F136%2F135&usg=AFQjCNHtRP7HDv4JBuzf2gJzT_wyP9P7KQ&sig2=is0jJhCgEJNfz8HTplpkyg&bvm=bv.123664746,d.dmo](https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=10&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj03Pu3-4vNAhXFKB4KHeH9DHUQFghZMAk&url=http%3A%2F%2Fwww.biologicas.umich.mx%2Findex.php%2Fbiologicas%2Farticle%2Fdownload%2F136%2F135&usg=AFQjCNHtRP7HDv4JBuzf2gJzT_wyP9P7KQ&sig2=is0jJhCgEJNfz8HTplpkyg&bvm=bv.123664746,d.dmo)

Góngora, A. C., & Rojas, P. (2006). *Incidencia de las enfermedades en uchuva *Physalis peruviana L.* por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca* (Tesis de Grado). Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis244.pdf>

Instituto de promociones de Exportaciones e Inversiones [PROECUADOR]. (2013). *Boletín de Comercio Exterior*. Recuperado de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROECUADOR_IC_03-31.pdf

Instituto de promociones de Exportaciones e Inversiones [PROECUADOR]. (2014). *Análisis sectorial Frutas exóticas*. Recuperado de

- http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2015/01/PROEC_AS2014_FRUTASEXOTICAS11.pdf
- Instituto de promociones de Exportaciones e Inversiones [PROEcuador]. (2017). *Boletín de análisis Mercados internacionales*. Recuperado de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2017/02/PROEC_AM2017_ENERO_FEBRERO.pdf
- Kwon, J., & Kang, D. (2016). First Report of Brown Leaf Spot Caused by *Alternaria alternata* on *Aronia melanocarpain* Korea. *The American Phytopathological Society*, 100 (5), 1011. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-15-0852-PDN>
- López, N., & Castaño, J. (2013). Etiología de la muerte descendente del tomate de árbol [*Solanum betaceum* (CAV.) SENDT.]. *Agronomía*, 21 (1), 7-18. Recuperado de [http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia21\(1\)_2.pdf](http://vip.ucaldas.edu.co/agronomia/downloads/Agronomia21(1)_2.pdf)
- Misadhi, I., Grogan, R., Duniway, J., & Kimble, K. (1977). Influence of Environment and Culture Media on Spore Morphology of *Alternaria alternata*. *The American Phytopathological Society*, 68, 29-34. Recuperado de https://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1978Articles/Phyto68n01_29.PDF
- Mycobank. (2016). *Alternaria*. Recuperado de http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&MycoBankNr_=7106
- Nabahat et al. (2016). *Alternaria* species associated with early blight epidemics

- on tomato and other *Solanaceae* crops in northwestern Algeria. *Eur J Plant Pathol*, 1, 1-17. DOI 10.1007/s10658-016-1081-9
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Nelsen, M. (2017). Primer Maps. Recuperado de <https://sites.google.com/site/mpnelsen/primermaps>
- Promega. (2010). Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~//media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/101/wizard%20sv%20gel%20and%20pcr%20cleanup%20system%20protocol.pdf>
- Promega. (2017). Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~//media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf>
- Ramjegathesh, R., & Ebenezar, E. (2012). Morphological and Physiological Characters of *Alternaria alternata* causing Leaf blight of onion. *International Journal Pathology*, 3(2), 34-44. DOI: 10.3923/ijpp.2012.34.44
- Ravi, N. & Nagalakshmi D. (2012). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Rumex vesicarius* in India. *Australasian Plant Dis. Notes*, 7, 17-18. DOI 10.1007/s13314-011-0036-4
- Saltos, R. N. (2012). Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*.

(Disertación de licenciatura). Recuperado de la Universidad de Guayaquil de la página:
<http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20gen%C3%B3mico%20y%20amplificaci%C3%B3n%20de%20la%20regi%C3%B3n%20ITS%20por%20PCR%20en%20el%20ascomicete%20marino%20Lulwo.Saltos,%20Nancy.pdf>

Sharma, N., & Khan, A. (1978). Fruit rots of cape gooseberry [India]. *Indian Journal of Poultry Science*, 31, 513-514. ISSN : 0019-5529

Smith, A. (2012). Avance en el manejo y control de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*). *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, Corpoica*. ISBN: 978-958-740-091-5

Solíz, M., Bueno, E., Sandoval, M., & Reza, I. (2016). Fertilización química y poda en uchuva (*Physalis peruviana* L.), en el valle de Cocula, Guerrero. *COCYTIEG*, 2 (3), 48-52. Recuperado de <http://www.fesgro.mx/journal/articulos/136%20MARTIN%20SOLIS-MARTINEZ-ARTICULO.pdf>

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30 (12), 2725–2729. Recuperado de <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2013/10/16/molbev.mst197.full.pdf+html>

Thermofisher. (2015). *TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers*. Recuperado de http://hpc.ilri.cgiar.org/beca/training/IMBB_2015/lectures/NanoDrop.pdf

Vizcaino, D., & Betancourt, R. (2016). Guía de buenas prácticas agrícolas para el cultivo de uvilla. *AGROCALIDAD*. Recuperado de

<http://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2016/07/guia-uvilla.pdf>

Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión. *Agronomía colombiana*, 26(1), 107-115. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/agc/v26n1/v26n1a13.pdf>

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, y White, T. (Eds.), *PCR protocols, a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Recuperado de <http://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>

Yao, J. & Yi, D. (2015). First Report of *Alternaria alternata* Causing Black Leaf Spot on *Ficus microcarpa* in China. *The American Phytopathological Society*, 99 (11), 1652. <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-14-1301-PDN>

Zapata, J., Saldarriaga, A., Londoño, M., & Díaz, C. (2002). Manejo de cultivo de la Uchuva en Colombia. *Boletín Técnico*. Recuperado de <http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/Manejo%20del%20cultivo%20de%20la%20uchuva.pdf>

Zhang, M., Li, P., Gen, Y., Guo, Y., & Wu, H. (2017). First report of *Alternaria macrospora* causing leaf spot of *Solanum lycopersicum* in China. *The American Phytopathological Society*, 101 (8), 1545-1546. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0388-PDN>

8. FIGURAS



Figura 1. Cultivo de uvilla (*Physalis peruviana*) en Quiroga, provincia de Imbabura.

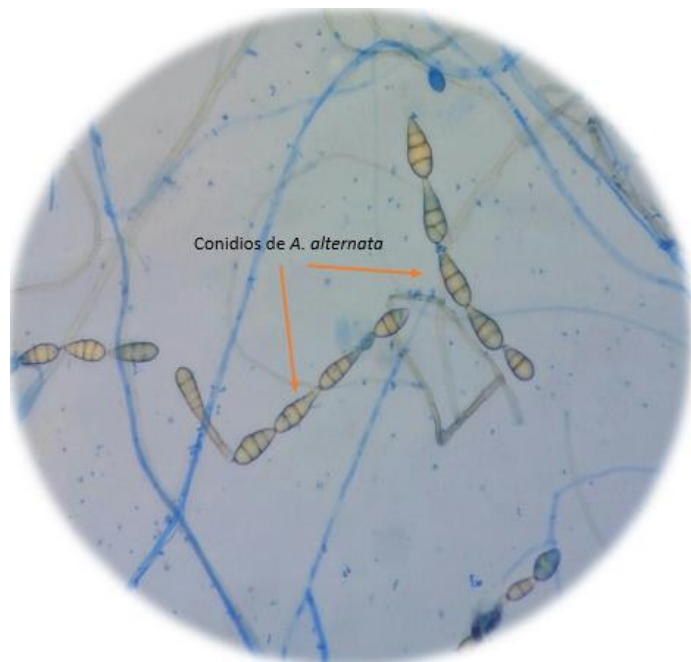


Figura 2. Conidios septados de *Alternaria alternata* (40x) con tinción de azul de lactofenol.

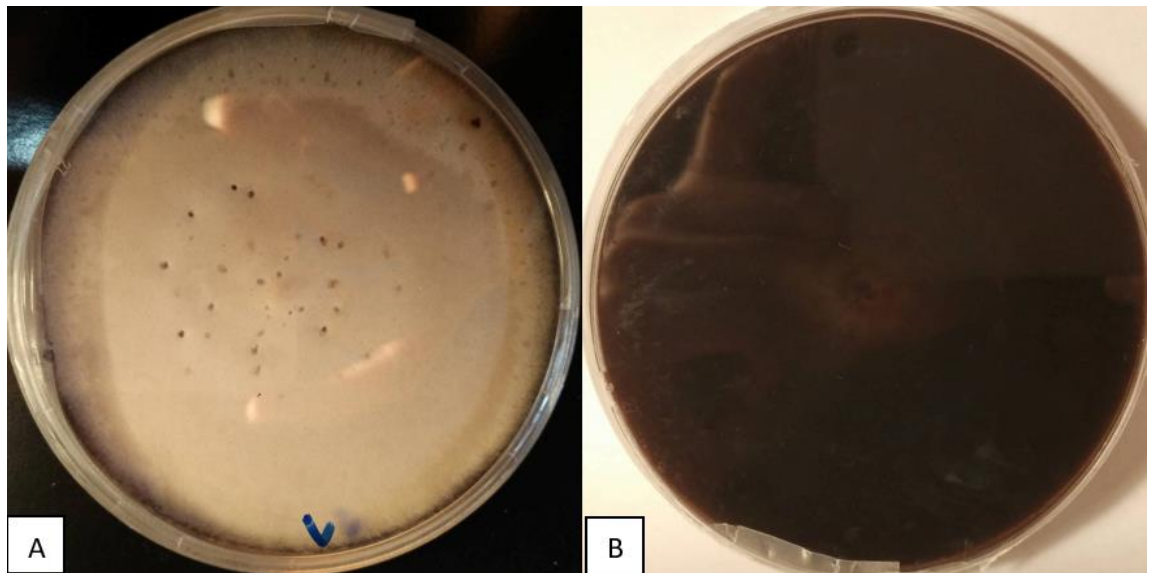


Figura 3. Colonia de *Alternaria alternata* en plato Petri con PDA a los 10 días de cultivo. (A) anverso y (B) reverso



Figura 4. Resultados de los postulados de Koch en frutos de *Physalis peruviana* a los 8 días de la inoculación en cámara húmeda.

9. TABLAS

Tabla 1. Sitios de muestreo, coordenadas geográficas, número e identificación de muestras.

Fecha de muestreo	Lugar	Coordenadas	# de muestras	Identificación
20-10-2016	Quero, Tungurahua	S 1°23'18.784" O 78°36'15.879"	35	FO T (A1) FO T (A2) FO T (A3)
20-10-2016	Quero, Tungurahua	S 1°23'34.736" O 78°36'37.979"	21	FG T (B1) FG T (B2)
20/10/2016	San Isidro de Pintag	S 0°21'43.066" O 78°36'37.979"	20	PP P (A1)
22/11/2016	La Esperanza Tungurahua	S 04°42'73.75" O 79°26'3.05"	22	SL E (A1)
22/11/2016	Ascázubi, Pichincha	S 0.4°42'1.37" O 79°26'335"	20	MT A (A1)
18/2/2017	Belén, Parque industrial, Ambato Tungurahua	S 0.1°12'7.13" O 78°37'6.33"	20	DA (T) SQ
			21	DA (T) F
25/02/2017	Mocha, Ambato	S 0.1°25'18.3216" O 78°38'39.0582"	21	JS Q (A1)
11/03/2017	Pataín, Cotopaxi	S 0.1°04'93.500" O 78°35'07.700"	30	LA PS (A1)
11/03/2017	Pataín, Cotopaxi	S 0.1°04'93.700" O 78°35'07.900"	24	LA PS (A2)
11/03/2017	Pataín, Cotopaxi	S 0.1°04'700" O 78°34'.628"	25	PB PS (A1)
18/03/2017	Barrio San Marcos, Salcedo Cotopaxi	S 1°03'7.27" O 78°34'6.80"	30	OJ A (A2)
18/03/2017	Barrio San Marcos, Salcedo Cotopaxi	S 1°03'7.30" O 78°34'6.10"	30	MF A (A1)
29/03/2017	Quiroga, Imbabura	N 0.0°16'4.84" O 78°34'6.80"	27	YC QI (A1)
29/03/2017	Quiroga, Imbabura	N 0.0°16'19.908" O 78°17'59.555"	27	VM QI (A2)

Tabla 2. Medidas de 20 conidios de aislados de *Alternaria alternata* obtenidos de lesiones de frutos.

Conidios	FO T (A1)		FG T (B2)		DA (T) SN		PB PS (A1)		VM QI (A2)	
	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)	Largo (µm)	Ancho (µm)
1	51,38	19,83	51,28	20,36	52,05	22,22	50,53	20,84	50,79	22,22
2	42,14	20,44	41,98	20,84	50,22	21,68	52,38	21,68	50,28	21,68
3	49,2	19,12	48,22	19,12	51,85	19,12	53,02	19,01	50,62	19,12
4	55,34	22,26	55,02	18,15	50,36	19,82	52,05	18,4	50,52	18,49
5	54,02	17,75	53,43	18,22	50,36	18,71	51,6	20,32	50,31	18,51
6	53,12	19,46	52,62	19,68	50,39	19,68	51,6	20,35	52,18	18,76
7	47,78	23,44	50,22	23,44	51,94	20,09	51,94	20,05	51,69	20,09
8	44,39	24,48	48,05	20,22	51,6	20,06	51,56	20,06	51,94	18,35
9	41,11	18,03	51,94	18,03	51,64	20,01	51,2	19,65	51,82	19,6
10	51,38	20,55	52,26	22,73	51,61	20,03	51,74	19,82	51,96	20,41
11	46,76	21,37	46,54	21,06	51,65	20,04	52,64	19,91	52,09	20,04
12	44,03	20,59	49,6	20,59	50,14	20,33	52,63	19,64	51,91	20,33
13	49,5	15,77	54,49	18,08	50,75	18,68	53,16	18,68	51,94	19,17
14	48	23,26	50,14	23,26	50,14	18,85	50,26	18,36	50,53	18,85
15	46,75	18,25	50,3	18,52	50,3	18,76	50,3	18,53	51,38	18,05
16	39,37	18,82	51,62	19,51	51,18	19,92	51,91	19,48	51,18	19,8
17	52,49	18,82	48,14	18,82	51,85	18,84	52	19,51	51,68	19,91
18	42,2	18,25	50,24	18,79	50,24	19,18	52	19,6	51,78	19,91
19	48,41	17,69	52	18,39	49,95	18,09	51,99	19,57	51,69	18,92
20	46,39	18,34	50,25	18,25	51,16	18,25	51,5	20,03	51,36	19,86
Promedio	47,69	19,82	50,42	19,8	50,97	19,62	51,8	19,67	51,38	19,6

Tabla 3. Concentración y calidad de ADN de *Alternaria alternata*, obtenido de aislados primarios y aislados recuperados de los postulados de Koch

Identificación de las muestras	Concentración de ADN	260/280	260/230
FO T (A1)	206,5 ng/μl	2,05	2,51
FG T (B2)	367,2 ng/μl	2,11	2,28
DA (T) SQ	354,8 ng/μl	2,08	2,18
PB PS (A1)	294,4 ng/μl	2,05	1,96
VM QI (A2)	332,5 ng/μl	2,06	2,01
P FO T (A1) (postulado)	323,1 ng/μl	1,93	1,36
P FG T (B2) (postulado)	465,4 ng/μl	2,04	1,81
P DA (T) SN(postulado)	573,6 ng/μl	2,03	1,8
P PB PS (A1) (postulado)	444,5 ng/μl	1,96	1,58
P VM QI (A2) (postulado)	432,2 ng/μl	1,99	1,66

Tabla 4. Volúmenes y reactivos utilizados para la reacción de la PCR

Reactivos	Volumen por reacción (μl)
Agua ultrapura	8,5
<i>GoTaq Mix</i>	12,5
10 μm - Primer F ITS1	1
10 μm - Primer R ITS4	1
ADN <50 ng/ul	2
Volumen Total	25

Tabla 5. Condiciones de PCR

	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Denaturación inicial	94°C	5 minutos	1 ciclo
Denaturación	94° C	30 segundos	
Hibridación	55°C	30 segundos	30 ciclos
Elongación	72°C	30 segundos	
Elongación final	72°C	10 minutos	1 ciclo

Tabla 6. Identificación molecular de los aislados primarios y de los postulados (BLAST, NCBI)

Identificación	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada
FO T (A1)	99	100	<i>Alternaria alternata</i>
FG T (B2)	99	100	<i>Alternaria alternata</i>
DA (T) SN	98	100	<i>Alternaria alternata</i>
PB PS (A1)	98	100	<i>Alternaria alternata</i>
VM QI (A2)	100	100	<i>Alternaria alternata</i>
P FO T (A1) (postulado)	98	100	<i>Alternaria alternata</i>
P FG T (B2) (postulado)	98	100	<i>Alternaria alternata</i>
P DA (T) SN (postulado)	98	100	<i>Alternaria alternata</i>
P PB PS (A1) (postulado)	99	100	<i>Alternaria alternata</i>
P VM QI (A2) (postulado)	98	100	<i>Alternaria alternata</i>

Tabla 7. Porcentajes de infección en frutos de uvilla a los 8 días de acuerdo a los métodos aplicados para obtener postulados de Koch

Aislados	Métodos^b	Frutos con síntomas de secamiento descendente	Eficiencia por método de inoculación	Total, de frutos enfermos^a
FO T (A1)	A	11	73,33%	40
	B	15	100,00%	
	C	14	93,33%	
FG T (B2)	A	8	53,33%	32
	B	13	86,67%	
	C	11	73,33%	
DA (T) SN	A	7	46,67%	33
	B	15	100,00%	
	C	11	73,33%	
PB PS (A1)	A	7	46,67%	34
	B	14	93,33%	
	C	13	86,67%	
VM QI (A2)	A	7	46,67%	35
	B	15	100,00%	
	C	13	86,67%	

^aEl número total de frutos inoculadas fue de 45.

^bMétodos de inoculación: A: inyección, B; Inmersión y C; Inmersión más laceración.

10. ANEXOS

Anexo 1. Taxonomía de *Alternaria alternata* (Mycobank, 2016)

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Subdivisión: Pezizomycotina

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Especie: *alternata*

Anexo 2. Secuencias de los aislados primarios y de los reaislados de los postulados en formato FASTA.

FO T (A1)

ITS1

ATATGA-GGCGGGCTGGA-
CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTC
AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG

ITS4

ATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATT
CACCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCAC
TAGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTA
TAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAAC
GCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTG
GAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCT
AGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTT
CGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCAT
TAAGCCTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAGGTAGG-ATCCCAGTCC

FG T (B2)

ITS1

GGTATGATG-CGGGCTGGA-
CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG

ITS4

AATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTAT
TCACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCA
CTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTA
ATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTC
TAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTT
TCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCA
TTAAGCCTTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAGGTAG—ATCCCAAGTT

DA (T) SN

ITS1

-----GGGGCATCGGTATGACG-CGGGCTGGA-
 CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
 TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
 TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
 AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
 GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
 AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
 CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
 GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
 GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCG

ITS4

CCCCCCCACAACCCCTTGGGTTTTTTGCCGGAGAGGTTTTATTACACAAA
 TATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTC
 ACCCTTGTCTTTTGC G TACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCACT
 AGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAAT
 AATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACG
 CAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAA
 TCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCG
 AGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTA
 GCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTT
 CGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCAT
 TAAGCCTTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAGTAGATCCCATTCA

PB PS (A1)

ITS1

TGGGCTCGTATGA-GGCCGGGCTGGA-
CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
AAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG

ITS4

TACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTG
AATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTTCGCC
CACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTGCAATCAGCGTCAGTAAC
AAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATG
AAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAAT
CATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGC
CTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGTCTT
GTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTA
CTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAG
CATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAGGTAGG-
ATCCCAGCCC

VM QI (A2)

ITS1

GGCGGGCTGGA-

CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
GACCTCGGATCAGGTAGG

ITS4

GGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTT
GTCTTTTGC G TACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCGCCCACCACTAGGACA
AACATAAACCTTTTGT AATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTAC
AACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGA
AATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTG
AACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGT
CATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTT
GCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAG
CGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCC
TTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGA

P F O T (A1) (postulado)

ITS1

GGGGCTAGGTATGA-GGCGGGCTGGA-
 CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
 TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
 TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
 AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
 GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
 AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
 CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
 GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
 GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCT

ITS4

TTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCT
 GAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTCCG
 CCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAA
 CAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
 GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
 ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCAT
 GCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTC
 TTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCT
 ACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTA
 GCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAGT---
 AGATCCAAGTC

P F G T (B2) (postulado)

ITS1

GGGGGCATCATATGAT-----GCGGGCTGGA-
 CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
 TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
 TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
 AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
 GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
 AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
 CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
 GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
 GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACT

ITS4

GGGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAG
 CCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTG
 GGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTGCAATCAGCG
 TCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGG
 CATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATT
 CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAA
 GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTG
 GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGC
 CGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAA
 GGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAG-----
 TAGTTCCCAGGCT

P DA (T) SN (postulado)

ITS1

GGGGCTT----CCAATATGA-GGCGGGCTGGA-
CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGCGAGCGTCATTTGTACCCTC
AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG

ITS4

GGATCATTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGC
CTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGG
GTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGT AATTGCAATCAGCGT
CAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGC
ATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTC
AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAG
GGCATGCCTGTTGCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGG
GCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCC
GGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAG
GTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAGGTA--
GATCCCCATCC

P PB PS (A1) (postulado)

ITS1

AATATGA-GGCGGGCTGGA-
CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTTCAACTTTT
GACCTCGGATCAG

ITS4

AATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTAT
TCACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCA
CTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTA
ATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAA
CGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTT
CGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTC
TAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTT
TCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCA
TTAAGCCTTTTTTTCAACTTT-GACCTCGGATCAG

P VM QI (A2) (postulado)

ITS1

GGGGCTACATATGA-GGCGGGCTGGA-
 CCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCTGAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTAC
 TTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCGCCACCACTAGGACAAACATAAACCTTT
 TGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAAC
 GGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT
 AGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGC
 GCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTC
 AAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGC
 CTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTC
 GCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTTCAACTTTT
 GACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTG

ITS4

TTACACAAATATGAAGGCGGGCTGGAACCTCTCGGGGTTACAGCCTTGCT
 GAATTATTCACCCTTGTCTTTTGC GTACTTCTTGTTTCCTTGGTGGGTTGCG
 CCACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAA
 CAAATTAATAATTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGAT
 GAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGA
 ATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCAT
 GCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGGCGTC
 TTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCGGCCT
 ACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTA
 GCATCCATTAAGCCTTTTT-CAACTTT-GACCTCGGATCAGT---
 AGATGCCAGCCC