

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGO

**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.**

JOSÉ LUIS DÍAZ GRANDA

DIRECTORA: Mtr. JENIFFER YÁNEZ ALTUNA

QUITO, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACION

Yo, JOSÉ LUIS DÍAZ GRANDA, C.I. 171717299-1, autor del trabajo de graduación intitulado: 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, previo a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGO en la Escuela de Bioanálisis:

1. Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la ley orgánica de Educación Superior, de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública, respetando los derechos de autor.

2. Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad.

Quito, 21 de julio del 2016

José Luis Díaz Granda

CI 1717172991

DEDICATORIA

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a toda mi familia, por el amor y apoyo brindado. Especialmente a mis padres Pablo y Jenny, mis hermanos Sebastián, Nicolás y Francisco, mis 3 hermosos sobrinos Martín, Juan José y Mía, y mis tías. Mencionar que pese a tantas adversidades que hemos atravesado en estos últimos años, hemos salido hacia adelante juntos.

A mi directora de disertación, Ing. Jeniffer Yáñez, por su confianza y apoyo durante toda mi carrera universitaria. Me complace saber que encontré en ella una amiga que desea lo mejor para mi vida.

A la Escuela de Bioanálisis de la PUCE, por permitirme usar las instalaciones y equipos necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación. También a todos los profesores de la carrera de Microbiología, quienes supieron guiarme durante todos los años de estudio, especialmente a la Mtr. Rosa Bayas por su ayuda en el trabajo de laboratorio del presente estudio.

Al Dr. Rommel Montufar por permitir la realización de los análisis moleculares de esta disertación, en el Laboratorio de Ecología y Genética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

Por último, a mis amigos y amigas de mi vida colegial David J., Sebas, David C., Juan Fra, Dany y Tefa; mis amigos universitarios Javier, Fer, Nicky, Sofi y especialmente a Dani por su ayuda en este trabajo y gran amistad; y a la persona que en este último tiempo ha sido un apoyo importante en mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Objetivos.....	7
1.1.1 Objetivo General.....	7
1.1.2 Objetivos específicos.....	7
CAPÍTULO II.....	8
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Antecedentes.....	8
2.2 La Uvilla (<i>Physalis peruviana</i> L.).....	10
2.2.1 Cultivo de uvilla	10
2.2.2 Taxonomía.....	11
2.2.3 Características.....	12
2.3 Enfermedades en los cultivos de uvillas.....	13
2.4 Hongos microscópicos.....	14
2.4.1 Hongos fitopatógenos	14
2.4.2 Hongos endófitos.....	16
2.5 Identificación de los hongos microscópicos	16
2.6 Análisis filogenéticos	18
2.6.1 <i>Neighbor joining</i>	18
2.6.2 Máxima verosimilitud	19
2.6.3 Filogenética Bayesiana.....	20
CAPÍTULO III.....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
3.1 Tipo de estudio y recolección de la muestra.....	22
3.2 Procesamiento de las muestras	23
3.2.1 Aislamiento y purificación de los hongos microscópicos	23
3.3 Análisis molecular	24
3.3.1 Extracción de ADN	24

3.3.2	Amplificación de los espaciadores transcritos internos.....	25
3.4	Identificación de especies	25
3.4.1	Secuenciación, edición y alineamiento de las secuencias	25
3.5	Análisis de Datos	26
3.5.1	Determinación de hongos microscópicos potencialmente patógenos y no patógenos.....	26
3.5.2	Análisis filogenético	27
CAPÍTULO IV.....		29
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
4.1	Aislamiento de hongos microscópicos de hojas de <i>Physalis peruviana</i> L.....	29
4.2	Concentración de ADN y amplificación del producto de la PCR.....	31
4.2.1	Medidas de las concentraciones de ADN de las muestras de hongos	31
4.2.2	Amplificación de la región ITS	31
4.3	Identificación molecular de hongos microscópicos en <i>Physalis peruviana</i> L.....	33
4.4	Análisis filogenéticos	40
4.4.1	Análisis de <i>Neighbor joining</i>	44
4.4.2	Análisis de la Inferencia Bayesiana.....	49
4.5	Determinación de hongos microscópicos potencialmente potenciales fitopatógenos o saprófitos.....	58
5.	CONCLUSIONES.....	63
6.	RECOMENDACIONES	65
REFERENCIAS		67
ANEXOS		90

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.* Número y porcentaje de hongos microscópicos aislados en cinco diferentes localidades del Cantón Quito, provincia de Pichincha. 30
- Figura 2.* Visualización de los amplicones de la región ITS en gel de agarosa. 32
- Figura 3.* Topología de árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Los tres diferentes colores diferencian a las clases de los hongos microscópicos aislados de hojas de *Physalis peruviana* L. Dothideomycetes (D) color púrpura, Sordariomycetes (S) color verde y Eurotiomycetes (E) color rojo. 41
- Figura 4.* Topología de árbol filogenético bayesiano. Los tres diferentes colores diferencian a las clases de los hongos microscópicos aislados de hojas de *Physalis peruviana* L.: Dothideomycetes (D) color púrpura, Sordariomycetes (S) color verde y Eurotiomycetes (E) color rojo. 42
- Figura 3A.* Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestran las agrupaciones 1-8 y a *Rhizoctonia solani* como el segundo grupo externo. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con los barras de colores, Dothideomycetes (púrpura), Sordariomycetes (verde) y Eurotiomycetes (rojo). 45
- Figura 3B.* Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestran las agrupaciones 9-15. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con los barras de colores: Dothideomycetes (púrpura) y Sordariomycetes (verde). 46
- Figura 3C.* Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestra la agrupación 16. La clase a la cual pertenece se muestra con barra de color púrpura: Dothideomycetes. 47
- Figura 3D.* Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestran las agrupaciones 17 y 18. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con

los barras de colores: Dothideomycetes (purpura) y Sordariomycetes (verde). La barra indica una distancia de 0.05 (por cada 100 nucleótidos cambian 5 bases)..... 48

Figura 4A. Árbol filogenético bayesiano. Se muestran las agrupaciones 1-4 y a *Rhizoctonia solani* como el grupo externo secundario. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con los barras de colores: Dothideomycetes (purpura), Sordariomycetes (verde) y Eurotiomycetes (rojo). 53

Figura 4B. Árbol filogenético bayesiano. Se muestran las agrupaciones 5 y 6. La clase a la cual pertenecen ambas agrupaciones se muestra con la barra de color púrpura que representa a los Dothideomycetes. 54

Figura 4C. Árbol filogenético bayesiano. Se muestra la primera parte de la agrupación 7. La clase a la cual pertenece se muestra con barra de color púrpura: Dothideomycetes. 55

Figura 4D. Árbol filogenético bayesiano. Se muestra la segunda parte de la agrupación 7. La clase a la cual pertenece se muestra con barra de color púrpura: Dothideomycetes. 56

Figura 4E. Árbol filogenético bayesiano. Se muestran las agrupaciones 8 y 9. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con las barras de colores: Dothideomycetes (purpura) y Sordariomycetes (verde). La barra indica una distancia de 0.2 (por cada 100 nucleótidos cambian 20 bases). 57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la uvilla.....	11
Tabla 2. Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de <i>Physalis peruviana</i> L. pertenecientes a la localidad 1, La Merced.....	34
Tabla 3. Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de <i>Physalis peruviana</i> L. pertenecientes a la localidad 2, Virgen de Lourdes.	37
Tabla 4. Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de <i>Physalis peruviana</i> L. pertenecientes a la localidad 3, Alangasí.....	37
Tabla 5. Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de <i>Physalis peruviana</i> L. pertenecientes a la localidad 4, Tumbaco.	38
Tabla 6. Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de <i>Physalis peruviana</i> L. pertenecientes a la localidad 5, Yaruquí.....	39
Tabla 7. Especies y números de acceso del GenBank utilizados en el estudio.	43

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Planta de uvilla (<i>Physalis peruviana</i> L.) de la Localidad 1.	90
Anexo 2. Toma de muestras en diferentes en las diferentes localidades.....	91
Anexo 3. Hongos microscópicos aislados y purificados en cajas con agar PDA en el laboratorio.....	92
Anexo 4. Concentraciones de ADN de las especies de hongos identificados medidos por el equipo <i>Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation</i>	93

RESUMEN

Los cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) son susceptibles a diversos factores físicos, químicos y biológicos que afectan a varias estructuras de la planta, principalmente a las hojas. En Ecuador se han identificado morfológicamente a los hongos responsables de patologías en el tejido foliar sin llegar a nivel de especie. En este trabajo se caracterizó molecularmente hongos microscópicos aislados de manchas foliares en hojas de uvilla en el cantón Quito. Además, se realizó un análisis filogenético mediante la aplicación de los métodos de *Neighbor joining* (NJ), Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana para dar un mayor soporte a la identificación. La identificación molecular de 130 aislados de microhongos se realizó mediante la amplificación de la región ITS (Espaciadores Internos Transcritos) del ADN ribosomal. Las secuencias de ADNr obtenidas fueron comparadas con aquellas disponibles en el GenBank del NCBI mediante el uso de la herramienta BLAST, obteniendo porcentajes de identidad de 97 a 100%. Como resultado, se identificaron 41 especies distintas de microhongos pertenecientes al *phylum* Ascomycota. Los hongos *Alternaria* sp., *A. tenuissima*, *Epicoccum nigrum*, *Diaporthe* sp., *Xylaria multiplex* y *Colletotrichum brevisporum* fueron aislados en cantidades mayores que las demás. El género *Alternaria* cuenta con el mayor número de especies, las cuales están asociadas a patologías en la hoja de uvilla. El análisis filogenético utilizó como matriz las secuencias de los aislados y secuencias de GenBank para la generación de dos árboles filogenéticos. El árbol Bayesiano resultante fue el mejor en cuanto a topología y valores de soporte ($\geq 0,95$).

ABSTRACT

Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) crops are susceptible to various physical, chemical and biological factors affecting several structures of the plant, especially the leaves. In Ecuador, the fungi responsible for pathologies in leaf tissue have been identified morphologically without reaching its species. In this study, executed in Quito, microscopic fungi isolated from foliar spots were molecularly characterized. Even more, a phylogenetic analysis was performed using *Neighbor joining* (NJ) methods, Maximum likelihood and Bayesian Inference to better support the identification. The molecular identification of 130 micro-fungi isolates was performed by amplification of the ITS (Internal Transcribed Spacers) region from ribosomal DNA. The obtained rDNA sequences were compared with those available in the GenBank from NCBI through BLAST tool, obtaining identity percentages from 97 to 100%. As a result, 41 different micro-fungi species belonging to Ascomycota *phylum* were identified. *Alternaria* sp., *A. tenuissima*, *Epicoccum nigrum*, *Diaporthe* sp., *Xylaria multiplex* and *Colletotrichum brevisporum* were isolated in greater amounts than the others. Genus *Alternaria* accounted for the largest number of species associated with pathologies in cape gooseberry's leaves. The matrix for the phylogenetic analysis was made with the sequences from isolates and the GenBank sequences to generate two phylogenetic trees. As a result, the Bayesian tree was the best in terms of topology and supporting values ($\geq 0,95$).

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

La producción de uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una de las actividades agrícolas más importantes en el Ecuador. En los últimos años, la exportación de esta fruta hacia diversos países de Europa y Asia se ha incrementado debido a su alta demanda. En el año 2012, Ecuador exportó US\$ 407 640 con un precio de US\$ 3,57.kg⁻¹ (Banco Central del Ecuador, 2012 citado por Fischer et al., 2014) a países como Holanda (principal consumidor), Reino Unido, Alemania, Canadá, Suecia, entre otros (Altamirano, 2010). Se estima que en el país existen entre 300 a 350 hectáreas de plantaciones de uvilla, cuyo rendimiento es de 6 a 20 toneladas por hectárea en función del manejo agrícola de la zona de cultivo. La provincia de Pichincha representa el 27% de los cultivos en el país (PROECUADOR, 2013).

Los cultivos de uvilla son susceptibles a plagas y enfermedades que afectan a varias estructuras de la planta, principalmente a las hojas. Las enfermedades pueden ser causadas especialmente por hongos como *Phoma* sp., *Cercospora* spp., *Fusarium oxysporum*, entre otros (Forero de La-Rotta, 2014). Las plantas también pueden permitir el ingreso de hongos saprófitos oportunistas cuando son lesionadas por microorganismos patógenos y otros agentes contaminantes; además, existe el grupo de hongos endófitos, los cuales colonizan y viven asintómicamente dentro de los tejidos de la planta, sin provocar daño a su hospedero (Abello & Kelemu, 2006; Corredor, Cepero, & Restrepo, 2007; Higginbotham et al., 2013). No obstante, varios estudios demuestran que este grupo de hongos pueden actuar

negativamente como fitopatógenos cuando su hospedero se encuentra afectado por desórdenes nutricionales o estrés hídrico (Schulz, Römmert, Dammann, Aust, & Strack, 1999).

En el país existen pocos estudios sobre hongos asociados a patologías en plantas de interés comercial. En el estudio de Chicaiza (2008), se analizó a todos los tipos de hongos relacionados con patologías en diferentes partes de la planta de uvilla, resultando *Alternaria* el género más común asociado a las patologías de las hojas. Por otro lado, Cornejo (2014) estudió específicamente a los hongos endófitos asociado a las lesiones necróticas de las hojas y vainas de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.), reportando que las especies *Boeremia telephii*, *Epicoccum nigrum*, *Alternaria tenuissima* y *Fusarium* sp. fueron las más abundantes

El aumento en la exportación de uvilla obliga a los agricultores a producir una fruta de alta calidad. Las enfermedades provocadas por hongos causan el deterioro de los cultivos, lo que afecta la producción de la fruta y genera pérdidas económicas considerables (Rodríguez, Velandia, & Viteri, 2010). Debido a esto, el diagnóstico y control este tipo de enfermedades es fundamental.

La identificación de los hongos microscópicos asociados a patologías en las hojas es uno de los primeros pasos para realizar un diagnóstico; tradicionalmente son determinados mediante la descripción de características morfológicas macro y microscópicas (Pinzón, Bustamante, & Buitrago, 2013). El estudio de Mora (2012) en Colombia, identificó macroscópicamente hongos endófitos de *Espeletia grandiflora* (frailejón) mediante características de las colonias como la textura y el color del anverso y reverso; así como las

características microscópicas de los aislados. De igual manera, Chicaiza (2008) en Ecuador, determinó morfológicamente algunos hongos responsables de las enfermedades en uvilla.

Sin embargo, la identificación de estos microorganismos en ambos estudios solo llegó a nivel de género. Esto se debe a que, la determinación por morfología puede tener ciertas limitantes como por ejemplo, las condiciones en las cuales se aisló a los hongos, lo cual podría generar la presencia o ausencia de estructuras características como las esporas, y/o variaciones en la coloración del micelio, dificultando así la identificación a nivel de especie (Agrios, 2005; Rodríguez-Tudela et al., 2008). En consecuencia, los resultados obtenidos no pueden determinar las comunidades de hongos que realmente se encuentran en los cultivos, generando un diagnóstico poco confiable y escasamente certero (Pinzón et al., 2013; Tarbell, 2008). Para contrarrestar esto, se puede incorporar a este tipo de estudios la identificación mediante métodos moleculares.

A diferencia de los métodos tradicionales, la identificación molecular de hongos microscópicos utiliza las características genómicas, permitiendo la determinación a nivel de especie y la diferenciación de los organismos de una manera más certera, específica, sensible y rápida (Alves, Ramos, García, Eslava & Díaz, 2002; Pinzón et al., 2013; Yoo & Eom, 2012). Adicionalmente, el uso de estas técnicas brinda mayores ventajas para la determinación de la diversidad de dichos hongos en un hospedero específico (Higgins et al., 2011; Huang et al., 2009).

Principalmente, la identificación molecular se basa en la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) ribosomal de los hongos microscópicos. A continuación, se

procesa la muestra y posteriormente se realiza una secuenciación de la región que comprende al espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés), propio del ADN de dichos microorganismos (Higginbotham et al., 2013; Higgins, Coley, Kursar, & Arnold, 2011; Huang et al., 2009; Yoo & Eom, 2012). Las secuencias son comparadas con bases de datos internacionales para conocer con qué especie están relacionadas. La caracterización molecular se complementa con un análisis filogenético, mediante el uso de árboles o dendrogramas (Abang, 2002; Yoo & Eom, 2012).

Los estudios filogenéticos son necesarios, ya que permiten conocer las relaciones ancestrales de las diferentes especies de hongos, de tal manera que se puede determinar qué parte del genoma se ha modificado para diferenciar morfotipos similares, qué porciones se han moldeado por selección natural y la generación de mutaciones (Yang & Bielawski, 2000). La relación evolutiva que tengan los hongos se podrá observar mediante la conformación de un árbol filogenético (Holder & Lewis, 2003). El resultado de este análisis brinda información taxonómica que fortalece la caracterización e identificación molecular de los hongos microscópicos.

A partir de lo expuesto se plantea la siguiente pregunta de investigación ¿cuáles son las especies de hongos microscópicos asociados a machas foliares en hojas de uvilla en el cantón Quito, Pichincha? Los resultados del presente estudio darán a conocer las especies de hongos microscópicos potencialmente patógenos y no patógenos asociados a manchas foliares de las hojas de uvilla, lo cual brindará datos que puedan ser utilizados para el mejoramiento en el control y producción de este cultivo de interés económico.

La hipótesis del presente estudio fue conocer si los hongos microscópicos caracterizados molecularmente están asociados con la producción de manchas foliares en las hojas de uvilla de distintos cultivos localizados en el cantón Quito.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo General

- Caracterizar molecularmente hongos microscópicos asociados a manchas foliares en hojas de uvilla en diversas localidades del cantón Quito.

1.1.2 Objetivos específicos

- Aislar y purificar a los hongos microscópicos presentes en las hojas de uvilla para la extracción de ADN.
- Identificar molecularmente a los hongos asociados a patologías en hojas de uvilla mediante secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal.
- Analizar filogenéticamente los resultados obtenidos mediante el contraste de los métodos *Neighbor joining* (NJ) y Máxima Verosimilitud (ML, por sus siglas en inglés).
- Comparar bibliográficamente las especies de hongos identificados para clasificarlos como potenciales fitopatógenos o saprófitos.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Los cultivos comerciales son susceptibles a enfermedades causadas por diferentes factores perjudiciales. Los hongos y las bacterias son los principales microorganismos patógenos que pueden causar daños y pérdidas de frutas y hortalizas; sin embargo, en la mayoría de los casos son los hongos fitopatógenos los causantes del mayor deterioro de tallos, hojas, flores y frutos (Juárez-Becerra, Sosa-Morales, & López-Malo, 2010).

Los hongos son organismos eucarióticos, productores de esporas, generalmente microscópicos, ramificados y filamentosos. Además, carecen de clorofila y su pared celular contiene celulosa, quitina o ambas. La mayoría de hongos son considerados como saprófitos, se desarrollan en el suelo o en la materia orgánica muerta, la cual pueden descomponer (Agrios, 2005).

Existen diferentes tipos de hongos de acuerdo a sus características biológicas y ecológicas. Por ejemplo, aquellos que pueden crecer y multiplicarse solamente permaneciendo durante toda su vida en asociación con sus plantas huésped, llevan el nombre de parásitos obligados o biotrofos. Adicionalmente, aquellos que solo necesitan a la planta durante una parte de su ciclo de vida, desarrollándose posteriormente en materia orgánica en descomposición o creciendo en la superficie del tejido de plantas, son

conocidos como parásitos no obligados (Agrios, 2005). Así, también existe un grupo de organismos característicos de las plantas, los cuales pueden ser beneficiosos para las mismas. Estos son los hongos endófitos.

Los hongos endófitos han sido estudiados debido a sus diferentes características, pero principalmente por los efectos positivos que tienen en la planta hospedera. La mayoría de especies vegetales con importancia económica pueden interactuar con estos hongos. Esto se debe a que dichos microorganismos tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios que benefician al hospedero, protegiéndole de varios fitopatógenos (Abello & Kemulo, 2006). Sin embargo, los hongos endófitos también pueden estar asociados a patologías o ser fitopatógenos de cultivos (Schulz et al., 1999). La identificación de estos microorganismos ya sea morfológica y/o molecular, permite conocer el rol que cumplen en la planta hospedera.

Se conocen una amplia variedad de especies de hongos, los cuales se han caracterizado mediante distintas técnicas de identificación y pueden ser responsables de deterioro de distintos cultivos (Juárez-Becerra et al., 2010). Las especies más importantes pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus*, entre otros (FHIA, 2007).

En el estudio realizado por Huang, Cai, Hyde, Corke y Sun (2008), identificaron hongos endófitos de 29 diferentes plantas medicinales en China. La determinación fue en base a la descripción de caracteres morfológicos como la forma colonial, las hifas y las estructuras reproductivas. Actualmente, para apoyar a la identificación morfológica se

utilizan técnicas moleculares como la secuenciación de las regiones ITS. Por ejemplo, el uso de éstas regiones en el trabajo de Huang et al. (2009) permitió identificar hasta el nivel de especie a los hongos endófitos presentes en tres especies de plantas del género *Artemisia*; así como también para el estudio de las propiedades bioactivas de los endófitos aislados, como por ejemplo de angiospermas y helechos (Higginbotham et al., 2013).

En el país se han realizado pocos estudios acerca de hongos asociados a patologías en cultivos de interés económico (Chicaiza, 2008; Cornejo, 2014). En los cultivos de uvilla, los cuales son parte fundamental del presente estudio, solo se identificó a nivel de género a los hongos relacionados con enfermedades; sin embargo, no se ha realizado una determinación en particular de hongos saprófitos o endófitos asociados a patologías en dichos cultivos. El estudio de Cornejo (2014) se asocia de manera más fuerte al presente estudio, ya que identificó molecularmente a los hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en la planta de fréjol (*Phaseolus vulgaris* L.).

2.2 La Uvilla (*Physalis peruviana* L.)

2.2.1 Cultivo de uvilla

La uvilla o uchuva es una fruta propia de la zona andina correspondiente a Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile (Fischer, Almanza-Merchán, & Miranda, 2014; Prohens & Sepúlveda, 2014). En el Ecuador, los cultivos de uvilla son realizados por pequeños y medianos productores especialmente en la región Sierra.

Las plantaciones se encuentran cultivadas a 2 000 o 3 000 metros sobre el nivel del mar (Fischer et al., 2014). De las aproximadamente 350 hectáreas de uvilla, la provincia de Imbabura tiene el 40% de los sembríos de la fruta, seguidos de Pichincha (27%), Carchi (10%) y las provincias de la Sierra Central (23%); además, se estima que la producción anual es de 4 080 toneladas, las cuales el 70% es captado por las empresas exportadoras y agroindustrias (PROECUADOR, 2013).

2.2.2 Taxonomía

La planta de uvilla pertenece al grupo de las angiospermas y se encuentra dentro de los taxones descritos en la Tabla 1.

Tabla 1.

Clasificación taxonómica de la uvilla.

Jerarquía	Descripción
Reino	Plantae
División	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Tribu	Physaleae
Género	<i>Physalis</i>
Especie	<i>Physalis peruviana</i> L.

(Prohens & Sepúlveda, 2014; USDA, 2016; Whitson & Manos, 2005)

2.2.3 Características

Pertenece a la familia *Solanaceae*, donde el género *Physalis* cuenta con alrededor de 100 especies (Fischer, Ebert, & Lüdders, 2007). La planta crece de forma herbácea, después tendrá un desarrollo en forma de arbusto con hojas simples, acorazonadas y de disposición alterna (Fischer et al., 2014). Normalmente crece hasta aproximadamente un metro de altura, su raíz es fibrosa, muy ramificada y puede alcanzar profundidades de hasta 50 centímetros. El tallo vegetativo puede llegar a tener entre nueve y 12 nudos. En cada uno de ellos van a desarrollarse una yema vegetativa y una hoja. Al llegar al último nudo se dará origen a las ramas productivas (Fischer & Almanza, 1993). De estas ramas se van a generar dos yemas, una floral y otra vegetativa.

Las flores son hermafroditas y constan de cinco sépalos, además de tener una forma tubular y acampanada (Calvo, 2009). La polinización puede ser llevada a cabo por diferentes agentes como el viento o insectos; sin embargo, también se puede dar un proceso de autopolinización (Fischer & Almanza, 1993). Una de las características más importantes sobre este género es el cáliz acrecente que posee, el cual crece a la par con el fruto y tiene la función de protegerlo contra insectos, aves y cualquier tipo de patógeno. Este cáliz o capuchón está formado por cinco sépalos y tiene una forma muy parecida a una vejiga de aproximadamente cinco centímetros (Fischer et al., 2014; Prohens & Sepúlveda, 2014).

Por último, el fruto posee ciertas características beneficiosas que pueden depender mucho del manejo que se da al cultivo y las condicionales en las cuales se desarrolla. La

uvilla es una baya carnosa, tiene forma de globo, puede llegar a pesar de cuatro a 10 gramos y cuenta con un diámetro entre 1,25 y 2,5 centímetros (Calvo, 2009); adicionalmente, necesita de 60 a 80 días para madurar. Las propiedades medicinales y nutricionales con las que cuenta, además del agradable sabor y aroma, aumentan la demanda por este producto, lo cual favorece al incremento del comercio y a un mejor posicionamiento en nuevos mercados (Galvis, Fischer, & Gordillo, 2005).

2.3 Enfermedades en los cultivos de uvilla

Las enfermedades que afectan a los cultivos de uvilla pueden estar asociadas a varios agentes patógenos. La de mayor patogenicidad se cree que es el marchitamiento vascular ocasionado por agentes fúngicos o bacterianos; sin embargo, existen enfermedades de origen viral como las ocasionadas por el virus X de la papa o virus del mosaico rugoso (PVX, por sus siglas en inglés) y por nematodos como *Meloidogyne hapla*, conocido por causar la enfermedad que lleva como nombre nudos de la raíz (Forero de La-Rotta, 2014).

Principalmente, los hongos son los mayores responsables de provocar patologías en las plantas, ocasionando pérdidas en la producción. Las sintomatologías de las diferentes enfermedades se presentan en el tallo, ramas, peciolo, frutos y hojas, pero en la mayoría de los casos es el tejido foliar el más afectado (Zapata, Saldarriaga, Londoño, & Díaz, 2005).

Las principales enfermedades causadas por hongos que afectan a las hojas son la mancha gris ocasionada por *Cercospora physalidis* Ell (Forero de La-Rotta, 2014; Zapata et al., 2005); El marchitamiento vascular, causado por *Fusarium oxysporum* Schlecht, el

carbón blanco de la hoja, producido por *Entyloma australe* Speg y las manchas, provocadas por *Phoma* sp. (Forero de La-Rotta, 2014).

2.4 Hongos microscópicos

Los microhongos u hongos microscópicos son aquellos que poseen estructuras microscópicas productoras de esporas. Estos comprenden un grupo artificial de hongos y organismos similares a los hongos como mohos de pan, patógenos de plantas, oídios, royas y mohos de agua (MiCC, 2016; Mueller, Bills, & Foster, 2004).

La clasificación taxonómica de estos microorganismos no está bien definida; sin embargo, se conocen varios grupos de hongos que cumplen los requisitos necesarios para pertenecer a este grupo. Mueller et al. (2004) incluyen en los hongos microscópicos al *phylum* Ascomycota, el cual cuenta con alrededor de 3 250 géneros que contienen a 32 500 especies reconocidas. Adicionalmente, destaca la presencia de microhongos del *phylum* Basidiomycota, hongos anamórficos (deuteromicetes, hongos asexuales, hongos conidiales) y aquellos pertenecientes al antiguo *phylum* Zygomycota.

2.4.1 Hongos fitopatógenos

Son el grupo de hongos más importantes a nivel económico, debido a la frecuencia de aparición y a las pérdidas que ocasionan al provocar daño en todo tipo de cultivos (Juárez-Becerra et al., 2010). Se conocen más de 10 000 especies que pueden causar enfermedades a las plantas, los cuales pueden agruparse de acuerdo a su desarrollo en

biotrofos o parásitos obligados y parásitos no obligados. Estos últimos, a su vez, pueden ser saprófitos facultativos o parásitos facultativos. Estos hongos poseen un soma vegetativo, el cual tiene filamentos microscópicos continuos alargados y ramificados con paredes celulares. Esta estructura lleva el nombre de micelio o cuerpo vegetativo y los filamentos de los cuales está formado son conocidos como hifas. Su reproducción generalmente se da por esporas que constan de una o más células. Estas estructuras pueden formarse asexualmente o ser el resultado de un proceso sexual (Agrios, 2005).

Las esporas asexuales generalmente se forman en un saco conocido como esporangio y se diseminan al romperse dicha estructura. Además, existen esporas que pueden moverse por medio de flagelos, denominadas zoosporas (Agrios, 2005). La clase Ascomycetes presenta una sinapomorfía entre sus especies: una estructura en forma de saco especializada donde se producen las esporas sexuales llamadas ascosporas (Schoch et al., 2009), pero también tiene una reproducción asexual. En el caso de la clase Basidiomycetes, las esporas sexuales tienen el nombre de basidiosporas (Morrow & Fraser, 2009).

Estos organismos pueden causar daño a los tejidos vegetales que parasiten. Las plantas pueden producir una respuesta local y después una generalizada; sin embargo, los hongos tienen la capacidad de sobreponerse a las defensas del hospedero provocando necrosis de los tejidos, atrofiando algunas partes de la planta o afectándola en su totalidad (Juárez-Becerra et al., 2010).

2.4.2 Hongos endófitos

Los hongos endófitos son microorganismos que viven dentro de los tejidos de las plantas, la mayor parte o por todo su ciclo de vida, sin causar sintomatología o aparente daño al hospedero (Abello & Kelemu, 2006; Corredor et al., 2007; Higginbotham et al., 2013; Sánchez-Fernández et al., 2013). Este grupo de hongos es muy diverso y puede habitar en diferentes partes de la planta.

La mayoría de estos microorganismos pertenecen al *phylum* Ascomycota, sin embargo se los relaciona con otros *phyla* como el antiguo Zygomycota, Basidiomycota y Oomycota (Rosa et al., 2011; Sánchez-Fernández et al., 2013). Además, los hongos endófitos han sido clasificados en Clavicipitáceos y no Clavicipitáceos. Los Clavicipitáceos colonizan pastos y pertenecen los géneros *Epichloë* y *Balansia*, mientras que, los no Clavicipitáceos son muy diversos habitando plantas no vasculares, helechos, coníferas y angiospermas (Rodríguez, White, Arnold & Redman, 2009; Rosa et al., 2011; Schulz & Boyle, 2005).

2.5 Identificación de los hongos microscópicos

En los últimos años, se han desarrollado técnicas de identificación de hongos, tanto morfológicas como moleculares, las cuales permiten determinar microorganismos a niveles fenotípicos y genotípicos. La identificación morfológica se basa en las características macroscópicas de las colonias como la textura, el color del anverso y reverso del plato Petri; así como en las características microscópicas como las hifas, las estructuras

reproductivas microscópicas y las esporas (Huang et al., 2008; Juárez-Becerra et al., 2010). Las técnicas moleculares permiten obtener resultados más confiables para la identificación de los distintos tipos de hongos. Esto se debe a que se analizan sus características genotípicas, utilizando el ADN de dichos microorganismos (Pinzón et al., 2013; Yoo & Eom, 2012).

El método más utilizado para estos análisis es la secuenciación de los espaciadores transcritos internos (ITS) del ADN nuclear ribosomal de los hongos (Nilsson, Ryberg, Abarenkov, Sjökvist, & Kristiansson, 2009; White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Los ITS son reconocidos como “un código de barras” que poseen los hongos en su material genético. Estos se encuentran entre los genes 18S de la subunidad ribosomal pequeña (SSU, por sus siglas en inglés) y 28S de la subunidad ribosomal grande (LSU, por sus siglas en inglés) (Bellemain et al., 2010). Las regiones ITS están formadas por las subregiones ITS1 e ITS2, separadas por el gen 5.8S (Bellemain et al., 2010; Nilsson et al., 2009). Gracias a la técnica de secuenciación, más de 100 000 secuencias ITS han sido detectadas e introducidas a las diferentes bases de datos (Nilsson et al., 2009). Estas representan una herramienta muy importante para la identificación de hongos, ya que constan de áreas de alta conservación y variabilidad que permiten desarrollar *primers* específicos para la determinación de hongos a nivel de especie (Atkins & Clarck, 2004; Bellemain et al., 2010).

2.6 Análisis filogenéticos

La filogenia es el proceso o la historia de la división de las especies a través del tiempo. Mediante esta, se pueden señalar y determinar las relaciones que existen entre organismos de diferentes especies. Para esto se utiliza las homologías, características propias de un grupo, las cuales se mantienen inalterables desde su aparición (Meléndez-Hevia, Raposo, Meléndez & Cabezas, 1997; O'Meara, 2012). Los árboles filogenéticos son una representación gráfica de la relación ancestros-descendientes entre secuencias de genes u organismos. El análisis de dichos árboles se puede realizar mediante técnicas como *Neighbor joining*, parsimonia, evolución mínima y máxima verosimilitud, los mismos que son analizados estadísticamente mediante *bootstrap* o por el método bayesiano (Holder & Lewis, 2003).

2.6.1 *Neighbor joining*

Uno de los métodos tradicionales para la reconstrucción de filogenias es el algoritmo *Neighbor joining* (NJ). Este es un método relativamente rápido y actúa mejor cuando la divergencia entre secuencias es baja (Holder & Lewis, 2003). El principio de este método es el de encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales (UTOs) que minimicen el largo total de la rama en cada estadio de agrupamiento de los UTOs empezando con un árbol en forma de estrella (Saitou & Nei, 1987). Esto implica que las secuencias de ADN obtenidas serán transformadas en una matriz, la cual representará un estimado de la distancia evolutiva de dichas secuencias (número de cambios que han ocurrido a lo largo de las ramas entre dos secuencias) (Holder & Lewis, 2003).

El algoritmo de NJ es uno de los métodos más rápidos para inferir árboles filogenéticos. Para la obtención de resultados confiables, los datos de las secuencias que se van a analizar deben tener una divergencia reciente. Si el objetivo es inferir relaciones más antiguas, los valores producidos por el algoritmo pueden tener poca fiabilidad (Holder & Lewis, 2003). Por ello, NJ es considerado un punto de partida para realizar análisis filogenéticos más extensos y precisos. El soporte dado a las relaciones en el árbol de NJ se puede explicar con la técnica estadística de *bootstrapping* (Felsenstein, 1985).

En el *bootstrapping*, la matriz de datos original es re-muestreada al azar, produciendo pseudo-réplicas de grupos de datos. Este método ofrece una medida de qué partes del árbol tienen bajo o alto soporte. En general, un valor superior o igual al 70% indica un alto soporte para un grupo (Hillis & Bull, 1993). Es importante tener en cuenta que las proporciones de *bootstrap* ayudan a predecir si el mismo resultado será observado en más datos, no si el resultado es correcto (Holder & Lewis, 2003).

2.6.2 Máxima verosimilitud

El método de máxima verosimilitud (ML) en la actualidad es el más empleado para inferir filogenias. Utiliza secuencias de ADN y, principalmente, toma en cuenta las características genéticas de los caracteres y las fuerzas evolutivas (Eguiarte, Souza, Núñez-Farfán & Hernández-Baños, 1997). De esta forma, escoge la hipótesis (topología y ramas del árbol evolutivo) que permita aumentar la probabilidad de observar los datos obtenidos.

Además, considera la elección de un modelo evolutivo, los datos y todos los árboles filogenéticos posibles (Goyenechea & Contreras-Ramos, 2007).

Para llevar a cabo el análisis filogenético con este método, es necesario utilizar modelos evolutivos probabilísticos, los cuales describen la evolución de las secuencias en el tiempo. Se puede construir un modelo de manera empírica usando propiedades calculadas a través de una comparación de las secuencias obtenidas, o también se lo realiza de manera paramétrica, utilizando propiedades químicas o biológicas del ADN (Liò & Goldman, 1998).

Tal modelo permite realizar una estimación de las distancias genéticas que existen entre dos secuencias homólogas, las cuales son calculadas por el número de sustituciones de nucleótidos (transversiones o transiciones) por sitio, que han ocurrido en el linaje evolutivo entre dichas secuencias y su ancestro común más reciente. Las distancias van a estar representadas por la longitud de las ramas del árbol filogenético (Holder & Lewis, 2003; Liò & Goldman, 1998). Si bien, a comparación con el método de *Neighbor joining* es más lento, la máxima verosimilitud captura completamente lo que los datos dicen sobre la filogenia.

2.6.3 Filogenética Bayesiana

Una de las metodologías desarrollada en los últimos años que, al igual que la máxima verosimilitud, utiliza modelos evolutivos, es la Inferencia Bayesiana. Este método estadístico toma en cuenta la información *a priori* de los caracteres moleculares como

pueden ser las secuencias de nucleótidos del ADN, de tal manera que se estimará la probabilidad de que los datos expliquen bien los árboles filogenéticos generados (Huelsenbeck, Ronquist, Nielsen, & Bollback, 2001; Peña, 2011).

La Inferencia Bayesiana se fundamenta en una cantidad conocida como probabilidad posterior y su análisis consta de tres componentes principales (Holder & Lewis, 2003; Huelsenbeck et al., 2001). El primero de ellos es la probabilidad *a priori*, la cual considera que todos los árboles que se puedan generar son igualmente probables. El segundo es la verosimilitud (*likelihood*), que es proporcional a la probabilidad de que la matriz (alineamiento de secuencias de ADN) esté representada por el árbol filogenético. El tercer componente es la probabilidad posterior de la hipótesis, la cual se genera al multiplicar la verosimilitud por la probabilidad *a priori* y puede ser interpretada como la probabilidad de que el árbol generado sea correcto (Holder & Lewis, 2003; Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Huelsenbeck et al., 2001; Peña, 2011).

Finalmente, el análisis se puede realizar mediante el uso del programa informático MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001), el cual utiliza el algoritmo *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) para la generación de la probabilidad posterior de árboles filogenéticos.

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio y recolección de la muestra

El presente estudio es de tipo transversal y descriptivo, y se realizó como parte del proyecto “Colección e inventario de hongos microscópicos que causan enfermedad en cultivos de importancia comercial (fitopatógenos) de la región oriental del Ecuador”, código L13299. El proyecto fue financiado por la PUCE.

Se recolectaron en total 100 hojas de manera aleatoria y estratificada, de diferentes plantas de cultivos de *Physalis peruviana* L (Anexo 1). Las muestras seleccionadas presentaban patologías evidentes en su tejido. El muestreo se realizó en el mes de junio del 2015, en cinco diferentes localidades del cantón Quito, en la provincia de Pichincha: La Merced o Localidad 1 (S 00°17.635' - W 078°24.158'; a 2611 m.s.n.m) donde se colectaron 40 muestras de hojas, Virgen de Lourdes o Localidad 2 (S 00°17.311' - W 078°24.384'; a 2628 m.s.n.m) con 14 muestras recolectadas, Alangasí o Localidad 3 (S 00°18.692' - W 078°24.944'; a 2620 m.s.n.m) donde se recolectaron 10 hojas, Tumbaco o Localidad 4 (S 00°13.539' - W 078°23.979'; a 2450 m.s.n.m) con 22 muestras y Yaruquí o Localidad 5 (S 00°11.596' - W 078°19.710'; a 2579 m.s.n.m) con un total de 14 hojas muestreadas.

Para identificar a cada muestra se utilizó un sistema de codificación, el cual consistió en la asignación una letra y un número, tanto a la hoja (H) muestreada como a la

planta (P) y la localidad (L) de donde se la obtuvo. Por ejemplo, el código L1P1H1 representa a la primera hoja muestreada, de la primera planta encontrada en la localidad 1. Esta modalidad se aplicó para todas las muestras en las cinco distintas localidades.

Las hojas se cortaron con tijeras podadoras desinfectadas (Anexo 2). Posteriormente, las muestras fueron colocadas en fundas nuevas de cierre hermético y etiquetadas con su código, la fecha y georreferencia. Todas las muestras fueron transportadas, cumpliendo una cadena de frío, manteniendo las mismas en óptimas condiciones, hacia el laboratorio 108 en el Edificio de Microbiología de la Escuela de Bioanálisis en la PUCE, donde fueron almacenada y procesadas.

3.2 Procesamiento de las muestras

3.2.1 Aislamiento y purificación de los hongos microscópicos

En primer lugar, se realizaron cortes en segmentos (5 x 5 mm) en las zonas lesionadas de las hojas como señala el estudio de Huang et al. (2009). A continuación, se efectuó el aislamiento de hongos mediante el procedimiento descrito por Crous, Verkley, Groenewald y Samson (2009) con ligeras modificaciones. El procedimiento consistió en una desinfección de los segmentos de hojas, colocándolas por un minuto en etanol al 70% y dos a cinco minutos en hipoclorito de sodio (NaOCl) al 3%. Para la remoción del NaOCl, se realizaron tres lavados de un minuto en agua destilada estéril. Una vez realizado este procedimiento, se colocaron los segmentos de hojas en placas Petri con agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) adicionada con estreptomina (1 ml.l⁻¹) y se mantuvo a

temperatura ambiente (25 °C). Los platos Petri fueron monitoreados diariamente y una vez que las colonias de hongos crecieron, fueron trasladadas a nuevas cajas con PDA para su purificación y posterior análisis molecular (Anexo 3).

3.3 Análisis molecular

La extracción de ADN y su amplificación mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se realizó en el Laboratorio de Ecología y Genética de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la PUCE.

3.3.1 Extracción de ADN

Una vez purificados los hongos microscópicos, se procedió a la extracción del ADN genómico total, para lo cual se utilizó el kit de extracción *Wizard® Genomic DNA Purification* de Promega. Para la obtención del ADN se utilizó un microtubo de 1,5 ml, donde se agregaron 10 mg de micelio superficial raspado de los hongos cultivados en placas Petri con PDA. Para este proceso, se utilizó un bisturí estéril. La extracción de ADN de las muestras de micelio se realizó de acuerdo al protocolo para tejido vegetal bajo las especificaciones y recomendaciones del fabricante (Promega, 2014). Finalmente, el ADN obtenido fue cuantificado utilizando el equipo *Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation* y el kit de cuantificación *The Qubit® 2.0 Quantitation Starter*. Una vez cuantificado el ADN se lo conservó a -20 °C para su posterior amplificación.

3.3.2 Amplificación de los espaciadores transcritos internos

La región ITS del ADN ribosomal que comprende ITS1, el gen 5.8S e ITS2 fue amplificada mediante PCR para lo cual se utilizaron los *primers* universales *forward* ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') y *reverse* ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') descritos por White et al. (1990). La reacción de PCR se realizó para un volumen de 25 μ l, la misma que contenía 22 μ l de *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, 2012), 0,5 del *primer forward* y *reverse* (10 μ M) y 2 μ l del ADN fúngico a una concentración de 10 ng. μ l⁻¹. La PCR se realizó en un termociclador que fue programado de acuerdo a las condiciones reportadas por White et al. (1990) con ligeras modificaciones. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 5 minutos de denaturación inicial a 94 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos de denaturación a 94 °C, 30 segundos de hibridación de los *primers* a 55°C, y una extensión de 30 segundos a 72 °C. La PCR culminó con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. Los productos obtenidos de la PCR migraron en gel de agarosa al 2,5% teñido con *SYBR® Safe* para la visualización mediante UV. Los productos fueron purificados para secuenciamiento con *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, de acuerdo a las condiciones del fabricante (Promega, 2010).

3.4 Identificación de especies

3.4.1 Secuenciación, edición y alineamiento de las secuencias

Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen en Seúl, Corea del Sur, para su secuenciación. Las secuencias *forward* y *reverse* obtenidas, se alinearon manualmente con

el *software Clustal W* implementado en el programa Geneious versión 5.4.7. (Kearse et al., 2012) además, estas secuencias se editaron y limpiaron para obtener las secuencias consenso. Con esta secuencia se realizó la identificación a nivel de especie de los hongos utilizando la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST). El programa comparó la identidad y cobertura de las secuencias consenso del presente estudio con secuencias disponibles en la base de datos del *GenBank-National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

El porcentaje de identidad indicó la homología o proporción de bases idénticas que comparten dos secuencias que se comparan, mientras que la cobertura indicó el porcentaje que BLAST pudo alinear entre la secuencias en estudio y el gen de interés (Flores et al., 2008). De tal manera que estos dos factores fueron tomados en cuenta para justificar la identificación de todos los aislados.

3.5 Análisis de Datos

3.5.1 Determinación de hongos microscópicos potencialmente patógenos y no patógenos

Una vez identificada la especie de los hongos microscópicos, se procedió a la clasificación de los mismos como potenciales patógenos, endófitos o saprófitos asociados a las patologías de las hojas, de acuerdo a la literatura encontrada en diferentes bases de datos disponibles en la *web* como *Mycobank* y en diversas revistas científicas.

3.5.2 Análisis filogenético

Todas las secuencias consenso identificadas a nivel de especie fueron ingresadas en una matriz para alinearlas utilizando el software *Clustal W*. Las secuencias alineadas se analizaron filogenéticamente mediante el método de distancia *Neighbor joining*. Para el análisis se escogieron dos grupos externos obtenidos de la base de datos *GenBank*, los cuales fueron seleccionados una vez que se realizó la identificación de los aislados. La evaluación del soporte de las ramas se realizó mediante el análisis estadístico *Bootstrap* con 1 000 repeticiones.

Las secuencias fueron analizadas por Máxima Verosimilitud (ML), pero también, durante el transcurso del estudio, se decidió extender el análisis utilizando de la Inferencia Bayesiana. Para el uso de estos métodos basado en caracteres genéticos, el uso de un modelo evolutivo fue muy necesario ya que solo con esta herramienta se pudo realizar una correcta descripción evolutiva de las secuencias obtenidas a partir de las muestras de ADN purificado de los aislados fúngicos (Kosiol, Bofkin, & Whelan, 2006).

La selección de los modelos dependió de los resultados obtenidos. Esto se debió a que solo con las secuencias completamente editadas, se puede conocer los cambios de nucleótidos que se presentan en sitios específicos de la cadena de ADN de cada individuo. En consecuencia, el programa jModelTest (Darriba, Taboada, Doallo, & Posada, 2012) pudo seleccionar, entre los más de 10 modelos existentes, el mejor para el análisis de ambos métodos.

El análisis de NJ se realizó con los programas MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013) y Geneious versión 5.4.7, el de Máxima Verosimilitud con el programa GARLI (Bazinet, Zwickl, & Cummings, 2014), y el de Inferencia Bayesiana mediante el uso del programa MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist, 2001).

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de hongos microscópicos de hojas de *Physalis peruviana* L.

De las 100 muestras de hojas recolectadas se aislaron 182 hongos microscópicos; sin embargo, en el transcurso del desarrollo de los mismos, 52 hongos resultaron contaminados por el hongo del género *Aspergillus*, el cual es considerado un contaminante frecuente de laboratorio (del Palacio, Cuétara, & Pontón, 2003). Es por esto que la contaminación afectó a los hongos sin importar la localidad de procedencia. Cabe destacar que, en todos los casos de contaminación, se procedió a la recuperación de los aislados obteniendo resultados negativos en su totalidad. Finalmente, un total de 130 hongos microscópicos fueron caracterizados molecularmente y utilizados para los análisis filogenéticos.

Los 130 hongos pertenecen a cinco diferentes localidades del cantón Quito y se distribuyen de la siguiente manera (Figura 1): 82 pertenecientes a la localidad 1 (La Merced), 8 a la localidad 2 (Virgen de Lourdes), 1 a la localidad 3 (Alangasí, San Vicente), 28 a la localidad 4 (Tumbaco, Rumihuaico) y 11 a la localidad 5 (Yaruquí).

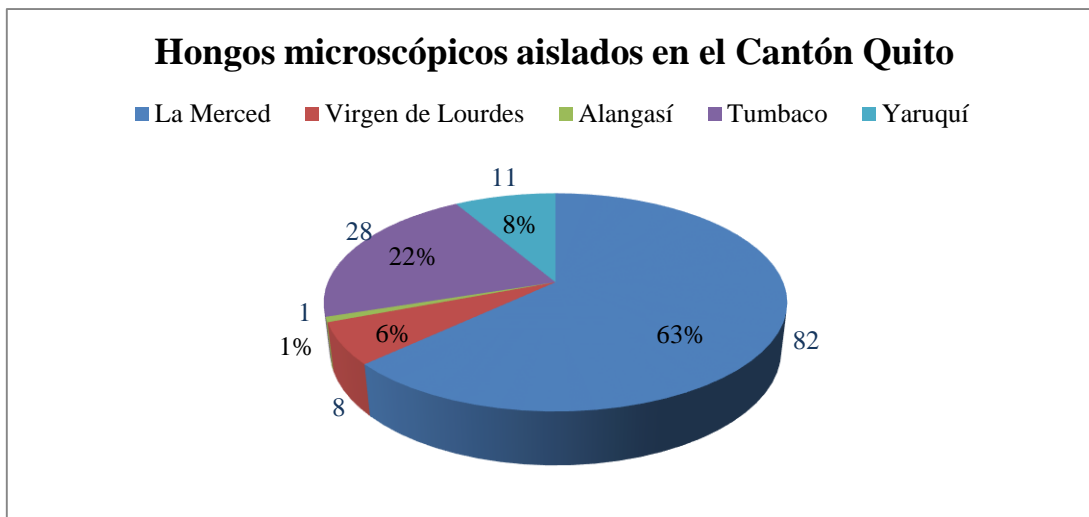


Figura 1. Número y porcentaje de hongos microscópicos aislados en cinco diferentes localidades del Cantón Quito, provincia de Pichincha.

En la localidad 1 se obtuvieron un mayor número de plantas con hojas que presentaban patologías, lo que justifica su 63% en aislados. En el resto de localidades se encontraron cultivos con similares números de plantas, pero no siempre se encontraban el mismo número de hojas lesionadas o con manchas.

Cabe señalar que las muestras de la localidad 3, a pesar de presentar manchas y lesiones en las hojas, no generaron un gran crecimiento de colonias fúngicas, a pesar de haber sido procesadas de la misma manera y bajo las mismas condiciones de laboratorio, que las muestras de las otras cuatro localidades. Existe, además, la posibilidad de que las lesiones (manchas foliares) hubieran sido causadas por factores físicos o por otro tipo de organismos (bacterias, insectos, animales, etc.).

4.2 Concentración de ADN y amplificación del producto de la PCR

4.2.1 Medidas de las concentraciones de ADN de las muestras de hongos

Las concentraciones medidas por el equipo *Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation* (Anexo 4) se encontraron en un rango desde 0,1 ng.µl⁻¹ hasta 64,8 ng.µl⁻¹. Como lo describe el fabricante (Invitrogen, 2010), este equipo fluorométrico tiene la capacidad de cuantificar cadenas simples y dobles de ADN, lo que produce una medida más precisa de la concentración con la que se va a trabajar.

Si bien existieron algunas concentraciones bajas de ADN, las muestras correspondientes no presentaron ningún tipo de problema al realizar la PCR, por lo que la amplificación de la región ITS del ADN fúngico fue exitosa en un 100 por ciento.

4.2.2 Amplificación de la región ITS

En la migración de los productos de la PCR en el gel de agarosa al 2,5% se pudo observar que, el tamaño de los amplicones fue de aproximadamente de 640 pb (Figura 2). Además, se puede observar en el carril 9 al *ladder* (marcador de masa molecular) de 100 pb que se utilizó para medir el tamaño de las bandas. Todas las bandas de los carriles en los cuales se encontraban las muestras de ADN de los hongos, mostraron el mismo patrón en cuanto al tamaño e intensidad, lo que facilitó la visualización y lectura de los geles.

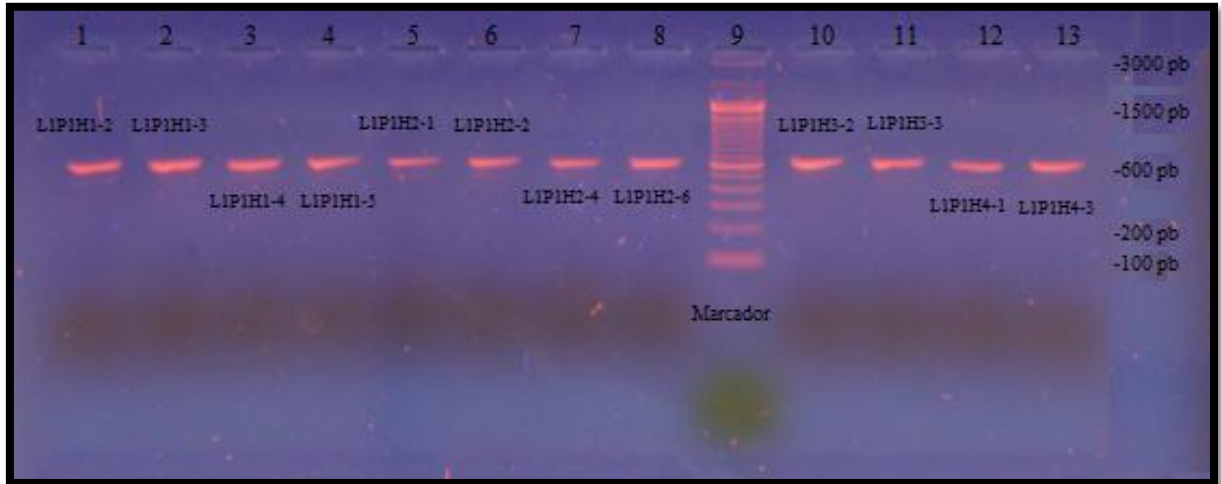


Figura 2. Visualización de los amplicones de la región ITS en gel de agarosa.

Cabe aclarar que para la codificación de cada hongo se mantuvo la misma de la muestra de la cual se lo aisló con la adición de un guión y un número. Esto se debe a que de cada hoja se aisló más de un hongo. Es así que podemos ver que existen los hongos nombrados inicialmente como L1P1H1-2 y L1P1H1-3 (carriles 1 y 2 respectivamente en la Figura 2)

Brasileiro, Moura, de Moraes y de Oliveira (2004) señalan que la región ITS de los hongos tiene un tamaño de 400 a 900 pb, información acotada por Nilsson et al. (2009) quien señala que la región ITS tiene un tamaño de aproximadamente 650 pb y que es obtenida en una simple ronda de PCR. Los tamaños de amplicones obtenidos en este estudio fueron muy similares a los valores mencionados en la literatura, por lo que se puede decir con gran certeza que, para todas las muestras la amplificación fue exitosa.

4.3 Identificación molecular de hongos microscópicos en *Physalis peruviana* L.

El análisis de las secuencias de la región ITS de las 130 muestras utilizadas para el estudio, permitió la identificación de 41 especies diferentes de hongos microscópicos. Para esto se tomó en cuenta los valores de porcentaje de cobertura y porcentaje de identidad señalados por la herramienta BLAST.

En la localidad 1 La Merced se identificaron 26 especies (Tabla 2), 5 en la localidad 2, Virgen de Lourdes (Tabla 3), 1 en la localidad 3, Alangasí (Tabla 4), 18 en la localidad 4, Tumbaco (Tabla 5) y 8 especies en la localidad 5 Yaruquí (Tabla 6).

Las especies que fueron identificadas molecularmente en este estudio pertenecen al *phylum* Ascomycota, lo cual concuerda con lo expuesto por Mueller et al. (2004), Rosa et al. (2011) y Sánchez-Fernández et al. (2013), quienes mencionan que la mayoría de hongos microscópicos se encuentran dentro de este grupo.

Las 41 especies identificadas están distribuidas en 21 géneros que son: *Alternaria*, *Cercospora*, *Phoma*, *Fusarium*, *Epicoccum*, *Diaporthe*, *Bipolaris*, *Biscogniauxia*, *Boeremia*, *Colletotrichum*, *Dothideales*, *Halorosellinia*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Periconia*, *Peyronellaea*, *Phaeosphaeriopsis*, *Pleosporales*, *Stagonosporopsis*, *Stemphylium* y *Xylaria*.

Tabla 2.

Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de *Physalis peruviana* L. pertenecientes a la localidad 1, La Merced.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank
L1P1H1-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P1H1-3	99	99	<i>Dothideales</i> sp	HQ607988.1
L1P1H1-4	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L1P1H1-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1
L1P1H2-1	100	99	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1
L1P1H2-2	99	99	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	EU343168.1
L1P1H2-4	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1
L1P1H2-6	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1
L1P1H3-2	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	KR094461.1
L1P1H3-3	100	100	<i>Fusarium equiseti</i>	KR094440.1
L1P1H4-1	100	99	<i>Phoma</i> sp.	JN207257.1
L1P1H4-3	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1
L1P2H1-1	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1
L1P2H1-3	100	100	<i>Bipolaris cynodontis</i>	HF934930.1
L1P2H1-4	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	JX454533.1
L1P2H1-5	100	100	<i>Fusarium venenatum</i>	KP295496.1
L1P2H1-6	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP699720.1
L1P2H1-7	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1
L1P2H2-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P2H3-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P2H3-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L1P2H4-1	100	99	<i>Alternaria brassicicola</i>	KF542557.1
L1P2H4-4	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L1P3H1-1	100	99	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	EU343168.1
L1P3H1-2	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FN868456.1
L1P3H1-3	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	KR094461.1
L1P3H1-4	100	100	<i>Fusarium equiseti</i>	KR094440.1
L1P3H2-1	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FN868456.1
L1P3H2-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1
L1P3H2-4	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1
L1P3H2-5	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1

(Continúa)

Tabla 2. (Continuación)

Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de *Physalis peruviana* L. pertenecientes a la localidad 1, La Merced.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank
L1P3H2-6	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1
L1P3H3-1	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	KM246282.1
L1P3H3-1 ^a	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1
L1P3H3-2	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L1P3H3-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1
L1P3H3-4	98	99	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098.1
L1P3H3-5	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1
L1P3H4-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1
L1P4H1-3	100	99	<i>Periconia byssoides</i>	KC954157.1
L1P4H2-1	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1
L1P4H2-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P4H2-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P4H2-4	100	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	FJ904917.1
L1P4H3-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (3)	KJ527009.1
L1P4H3-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (4)	KM215618.1
L1P4H3-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1
L1P4H4-1	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FJ424246.1
L1P4H5-1	100	99	<i>Pleosporales</i> sp.	HQ631051.1
L1P6H1-1	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	KM246282.1
L1P6H1-2	100	100	<i>Bipolaris cynodontis</i>	KJ909767.1
L1P6H1-3	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L1P6H1-4	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1
L1P7H1-1	97	99	<i>Xylaria venosula</i>	EF026149.1
L1P7H2-1	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L1P7H2-2	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1
L1P7H2-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P7H2-4	100	99	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1
L1P7H3-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P7H3-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1

(Continúa)

Tabla 2. (Continuación)

Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de *Physalis peruviana* L. pertenecientes a la localidad 1, La Merced.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank
L1P7H3-3	99	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L1P7H3-4	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P7H4-1	100	99	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1
L1P7H4-2	100	100	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	GU045304.1
L1P7H4-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P7H4-4	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP699720.1
L1P7H4-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FN868456.1
L1P7H4-6	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P7H4-7	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P7H4-8	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KM107824.1
L1P7H5-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L1P7H5-3	98	99	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098.1
L1P7H5-4	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P7H5-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	KP132016.1
L1P7H5-6	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P8H1-2	97	99	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098.1
L1P8H1-3	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP699721.1
L1P8H1-4	99	99	<i>Halorosellinia</i> sp.	JF773589.1
L1P8H1-5	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L1P8H1-6	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L1P8H2-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L1P8H2-3	90	90	<i>Alternaria tomato</i>	KP124446.1

Tabla 3.

Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de Physalis peruviana L. pertenecientes a la localidad 2, Virgen de Lourdes.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank
L2P1H1-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L2P2H1-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L2P2H1-2	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L2P2H1-3	100	99	<i>Phoma</i> sp.	JN207257.1
L2P2H3-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L2P2H3-4	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1
L2P2H5-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L2P2H5-2	100	99	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1

Tabla 4.

Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de Physalis peruviana L. pertenecientes a la localidad 3, Alangasí.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank
L3P1H1-1	97	99	<i>Xylaria</i> sp. (2)	EU016102.1

Tabla 5.

Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de *Physalis peruviana* L. pertenecientes a la localidad 4, Tumbaco.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank
L4P1H1-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L4P1H1-2	100	99	<i>Nigrospora</i> sp. (1)	JN207335.1
L4P1H1-5	100	100	<i>Stemphylium</i> sp.	JX164072.1
L4P1H2-1	100	99	<i>Peyronellaea glomerata</i>	AY183371.1
L4P1H2-2	100	99	<i>Nigrospora</i> sp. (2)	HQ630982.1
L4P1H2-3	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L4P1H3-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L4P1H3-2	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FJ904828.1
L4P1H4-2	100	99	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1
L4P1H4-3	100	99	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L4P1H4-4	100	100	<i>Colletotrichum boninense</i>	JX258799.1
L4P1H6-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L4P1H6-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L4P2H1-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L4P2H2-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L4P2H2-2	100	100	<i>Colletotrichum queenslandicum</i>	KJ947308.1
L4P2H2-3	100	99	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	KC790943.1
L4P2H2-4	100	99	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	KC790943.1
L4P2H3-1	100	98	<i>Xylaria</i> sp. (1)	FJ799949.1
L4P2H3-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L4P2H3-3	100	99	<i>Alternaria brassicicola</i>	KF542557.1
L4P2H3-4	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1
L4P2H3-5	99	97	<i>Biscogniauxia</i> sp.	JQ327868.1
L4P2H3-6	95	98	<i>Xylaria bambusicola</i>	KF381074.1
L4P2H5-1	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KM257026.1
L4P2H5-2	99	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L4P2H5-5	100	99	<i>Peyronellaea glomerata</i> (Sin <i>Phoma</i>)	AY183371.1
L4P3H1-1	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP174670.1

Tabla 6.

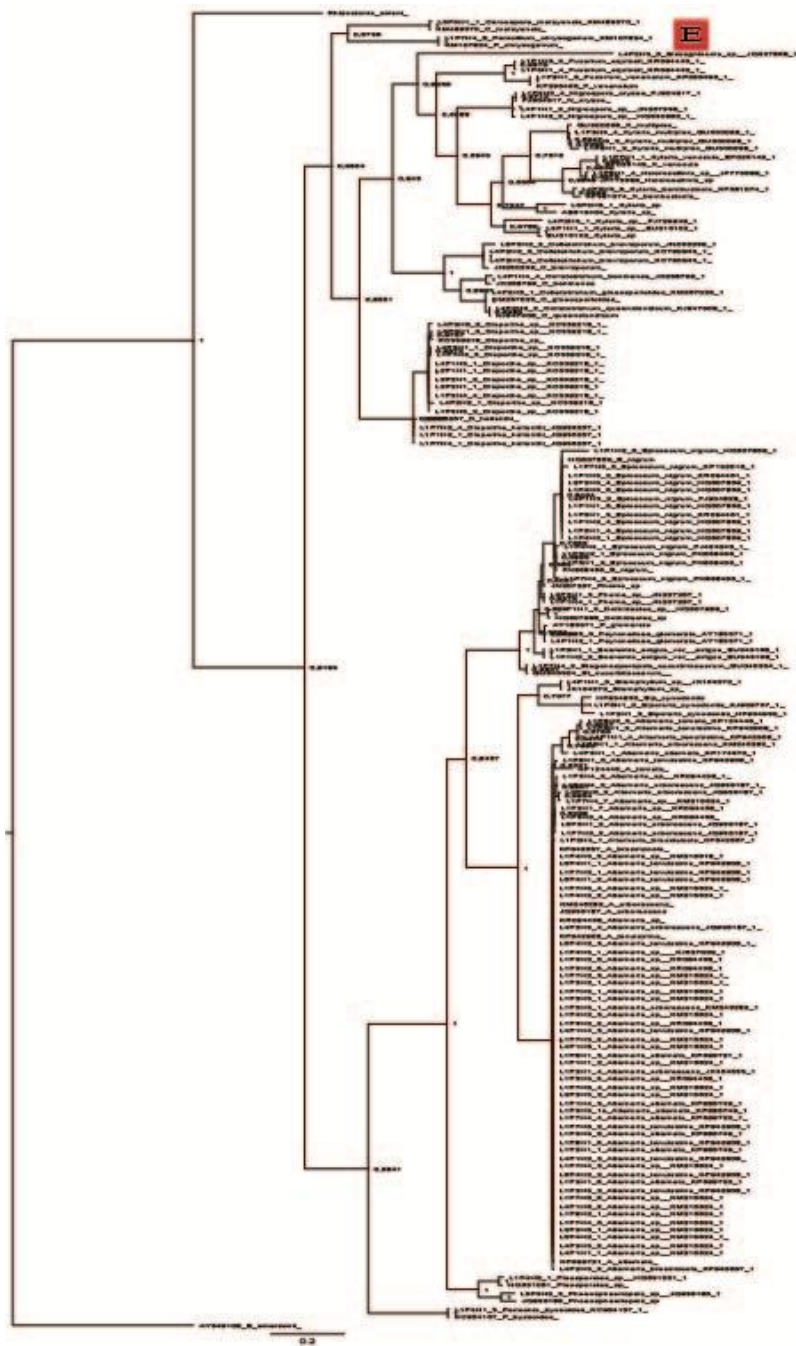
Identificación molecular mediante el análisis la región ITS de hongos microscópicos aislados de hojas de Physalis peruviana L. pertenecientes a la localidad 5, Yaruquí.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank
L5P3H1-1	99	100	<i>Cercospora malayensis</i>	KM489070.1
L5P3H1-2	100	99	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1
L5P3H1-3	100	100	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1
L5P3H2-2	100	99	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	JN050239.1
L5P3H2-3	100	99	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	JQ936185.1
L5P3H5-1	98	99	<i>Xylaria</i> sp. (3)	AB512404.1
L5P4H1-1	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L5P4H1-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L5P4H2-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1
L5P4H2-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1
L5P4H2-3	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1

4.4 Análisis filogenéticos

Los análisis de *Neighbor joining* e Inferencia Bayesiana muestran árboles con topologías muy similares, con tan solo algunas variaciones como se puede ver en las Figuras 3 y 4. El análisis mediante la metodología de Máxima Verosimilitud no presentó resultados debido a problemas con el programa y los servidores utilizados para este propósito.

Para la construcción de los árboles filogenéticos se utilizaron las secuencias de los 130 aislados identificados mediante el uso de la región ITS y 38 secuencias tomadas del GenBank (NCBI) correspondientes a especies similares a las identificadas en el presente estudio y a las especies *Blastocladiella emersonii* (*phylum* Blastocladiomycota) y *Rhizoctonia solani* (*phylum* Basidiomycota), las cuales fueron seleccionadas como grupos externos de ambos árboles (Tabla 7).



D
S
D
S

Figura 4. Topología de árbol filogenético bayesiano. Los tres diferentes colores diferencian a las clases de los hongos microscópicos aislados de hojas de *Physalis peruviana* L.: Dothideomycetes (D) color purpura, Sordariomycetes (S) color verde y Eurotiomycetes (E) color rojo.

Tabla 7.

Especies y números de acceso del GenBank utilizados en el estudio.

Especie	Nº de acceso de GenBank	Especie	Nº de acceso de GenBank
<i>Alternaria alternata</i>	KP699721	<i>Fusarium equiseti</i>	KR094440
<i>Alternaria arborescens</i>	KM246282	<i>Fusarium venenatum</i>	KP295496
<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187	<i>Halorosellinia</i> sp.	JF773589
<i>Alternaria brassicicola</i>	KF542557	<i>Nigrospora oryzae</i>	FJ904917
<i>Alternaria</i> sp.	KR094438	<i>Nigrospora</i> sp.	JN207335
<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KM107824
<i>Alternaria tomato</i>	KP124446	<i>Periconia byssoides</i>	KC954157
<i>Bipolaris cynodontis</i>	HF934930	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	JQ936185
<i>Biscogniauxia</i> sp.	JQ327868	<i>Phoma exigua</i> var. <i>Exigua</i>	EU343168
<i>Blastocladiella emersonii</i> *	AY349108	<i>Phoma glomerata</i>	AY183371
<i>Cercospora malayensis</i>	KM489070	<i>Phoma</i> sp.	JN207257
<i>Colletotrichum boninense</i>	JX258799	<i>Pleosporales</i> sp.	HQ631051
<i>Colletotrichum brevisporum</i>	JN050239	<i>Rhizoctonia solani</i> *	HG934415
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KM257026	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	GU045304
<i>Colletotrichum queenslandicum</i>	KJ947308	<i>Stemphylium</i> sp.	JX164072
<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257	<i>Xylaria bambusicola</i>	KF381074
<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098
<i>Dothideales</i> sp.	HQ607988	<i>Xylaria</i> sp.	AB512404
<i>Epicoccum nigrum</i>	FN868456	<i>Xylaria</i> sp.	EU016102
<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859	<i>Xylaria venosula</i>	EF026149

Nota: (*) Especies seleccionadas como grupo externo.

4.4.1 Análisis *Neighbor joining*

El alineamiento de las secuencias de los aislados junto a las secuencias tomadas del GenBank permitió la construcción del árbol en base al método *Neighbor joining* (Figura 3). Como se mencionó en la metodología, la selección de los grupos externos dependió de los resultados obtenidos en la identificación molecular y debido a que los aislados pertenecían solo al *phylum* Ascomycota, se tomó la decisión de utilizar dos especies de diferentes *phyla* como grupos externos: *Blastocladiella emersonii* (*phylum* Blastocladiomycota) y *Rhizoctonia solani* (*phylum* Basidiomycota). *B. emersonii* fue utilizada como grupo externo exitosamente en estudios filogenéticos de hongos, permitiendo enraizar el árbol filogenético para obtener una correcta topología (Suh & Sugiyama, 1993). Sin embargo, en este estudio también se seleccionó a *R. solani* como un segundo grupo externo, de tal manera que se pueda visualizar las diferencias en tres *phyla* distintos de hongos. En consecuencia, la formación del árbol permitió la conformación de varias agrupaciones, las cuales fueron designadas con las siglas NJG (por *Neighbor joining* Grupo) seguido de una numeración.

Este árbol filogenético fue dividido por la taxonomía de las especies que lo conforman a nivel de clase. Es así que, las agrupaciones que forman el árbol son tres clases taxonómicas diferentes de hongos: Dothideomycetes, Sordariomycetes y Eurotiomycetes, los cuales pertenecen al *phylum* Ascomycota. Arnold et al. (2007) en su análisis filogenético divide al árbol de la misma manera y, por tanto, presenta alta similitud con el del presente estudio, especialmente cuando se revisa la distribución de dichas agrupaciones.

Debido a que el árbol fue elaborado mediante la metodología de *Neighbor Joining* (Figura 3), se pudieron observar en las ramas los porcentajes de soporte del *bootstrap*. Varios estudios consideran que un soporte superior o igual al 70% brinda una información confiable sobre el posicionamiento de cada especie en el cladograma (Arnold et al., 2007; Kusaba & Tsuge, 1995). Este árbol filogenético evidenció agrupaciones pertenecientes a diferentes especies de hongos microscópicos, que forman una politomía importante. Esto nos indica que, posiblemente, exista una falta de información de estos grupos a nivel de sus secuencias de nucleótidos, probablemente ciertos nucleótidos no fueron determinados de manera correcta o se han producido mutaciones en las secuencias de los individuos en estudio (Martínez, 2007).

En la Figura 3A se pudieron observar ocho agrupaciones (NJG1 - NJG8) además del grupo externo *R. solani*. Cada agrupación está conformada por un género de hongo, donde se encuentran las especies pertenecientes al mismo. Las agrupaciones NJG1, NJG2 y NJG3 presentaron un alto soporte estadístico (100%), los géneros que los conformaron son *Biscogniauxia*, *Cercospora* y *Nigrospora* respectivamente. En este caso, cabe destacar que no existe relación estrecha entre estas tres agrupaciones (NJG1, NJG2 y NJG3), debido a que pertenecen a diferentes órdenes de hongos según lo indica la clasificación taxonómica realizada por el MycoBank (2016). Adicionalmente, se pudo observar que existe una estrecha relación entre las secuencias de hongos identificados en el estudio con las secuencias tomadas del GenBank.

Las agrupaciones NJG4 (*Xylaria* y *Halorosellinia*), NJG5 (*Diaporthe*), NJG6 (*Penicillium*), NJG7 (*Fusarium*) y NJG8 (*Colletotrichum*) pertenecen a la misma clase

Sordariomycetes, excepto por el grupo NJG6 el cual taxonómicamente se encuentra en la clase Eurotiomycetes. Las especies pertenecientes a *Diaporthe*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Colletotrichum* mostraron un alto valor de bootstrap con sus especies de referencia (entre 58,1% y 100%). Dentro de las agrupaciones cabe destacar al grupo NJG4, el cual representa a las especies pertenecientes a los géneros *Xylaria* (*X. multiplex*, *X. bambusicola* y *X. venosula*) y *Halorosellinia* (*Halorosellinia* sp.). Ambos géneros tienen una relación muy cercana. Esto es corroborado por los valores de soporte obtenidos en el árbol (entre 58,3 y 99,9%) y por el estudio filogenético llevado a cabo por Hidayat et al. (2006).

En la Figura 3B se pudieron observar ocho agrupaciones con sus respectivas especies: NJG9 (*Periconia byssoides*), NJG10 (especie de Pleosporales y *Phaeosphaeriopsis* sp.), NJG11 (*Stagonosporopsis cucurbitacearum*), NJG12 (*Boeremia exigua* var. *exigua*), NJG13 (especie de Dothideales), NJG14 (*Epicoccum nigrum*) y NJG15 (*Peyronellaea glomerata* y *Phoma* sp.). En esta zona del árbol filogenético se pudo observar la divergencia entre las clases Sordariomycetes (NJG9) y Dothideomycetes (NJG 10-16) con un valor de bootstrap de 82,9%. En NJG9, se obtuvo un soporte del 100% entre *P. byssoides* del estudio y su referencia.

Desde NJG10 a NJG15 se pudo apreciar una de las relaciones más estrechas que presentó este árbol filogenético, debido a que las especies de estas agrupaciones pertenecen en su mayoría al orden Pleosporales, excepto por la agrupación NJG13 (orden Dothideales) (Mycobank, 2016). NJG10 presenta un soporte del 100% en la relación entre “Pleosporales sp.” (especie aún sin clasificación dentro de este orden) y *Phaeosphaeriopsis* sp., y valores de 99,9 y 88,4% con sus especies de referencia, respectivamente. Las agrupaciones NJG11,

NJG12, NJG14 y NJG15 pertenecen a la familia Didymellaceae, lo que permite determinar una buena distribución de las ramas en el árbol. Además de tener un soporte del 100%, varios estudios confirman aún más su íntima relación (Aveskamp et al., 2010; Zhang et al., 2012). *S. cucurbitacearum* y *B. exigua* var. *exigua* presentan altos valores de bootstrap (100 y 99,9 respectivamente) con sus referentes para la identificación. NJG13 contiene al hongo “Dothidiales sp.” (especie aún sin clasificación dentro de este orden) con un soporte del 92,2% con la secuencia tomada del GenBank. Este microorganismo no tiene una relación con los hongos pertenecientes al orden Pleosporales, identificados en este trabajo de acuerdo a la clasificación realizada en el estudio de Zhang et al. (2012). *Epicoccum* presentó un valor de 85,1% de soporte estadístico. Aquí se agruparon todas las especies identificadas en este trabajo junto con sus secuencias de referencia. En NJG15 se ubicaron dos géneros hermanos *Peyronellaea* y *Phoma* que presentaron un soporte de 85% que los relaciona. Kernaghan et al. (2003) y MycoBank (2016) señalan que *Peyronellaea* es sinónimo de *Phoma*. Este hecho explica su relación cercana en el árbol de NJ.

En la Figura 3C se encuentran todas las especies pertenecientes al género *Alternaria*. Esta agrupación obtuvo un valor de soporte alto (98,7%), separándose del linaje de las especies pertenecientes a la familia Didymellaceae pero formando parte del orden Pleosporales. NJG16 presenta politomías. Esto se debe a que las secuencias de estos hongos no contienen la información necesaria para realizar una mejor distribución de las ramas dentro del árbol filogenético (Martínez, 2007). El estudio realizado por Kusaba y Tsuge (1995) destaca, además, que varias especies de *Alternaria* junto a *A. alternata* presentan altos valores (más del 85%) de homologías en su ADN, lo cual hace que las diferentes

especies de este género estén intercaladas, dificultando la interpretación de las ramas del árbol filogenético.

Para finalizar con el árbol concebido mediante NJ, en la Figura 3D se puede ver a las agrupaciones NJG17 y NJG18, además del grupo externo principal, *Blastodiella emersonii*. NJG17 estuvo formado por las especies *Stemphylium* sp. y *Bipolaris cynodontis*, pertenecientes a la familia Pleosporaceae (Zhang et al., 2012; MycoBank, 2016). Éstas presentaron un soporte de 54,7%, el cual no se considera alto; sin embargo, el soporte entre los hongos del estudio y sus especies de referencia es del 100%, lo que señala una alta probabilidad de que se trate de las mismas especies de microorganismos. En la agrupación NJG18 se encontró al mismo género de NJG4, *Xylaria*, formando parte de la politomía que presenta el árbol en todas sus agrupaciones. Entonces es probable que se haya producido una incertidumbre del orden correcto de la ramificación, lo que hizo que se separe de la agrupación NJG4 (Martínez, 2007). Cabe señalar que las especies a las cuales se ha nombrado con el orden al cual pertenecen no han sido clasificadas taxonómicamente, debido a la falta de información de sus secuencias.

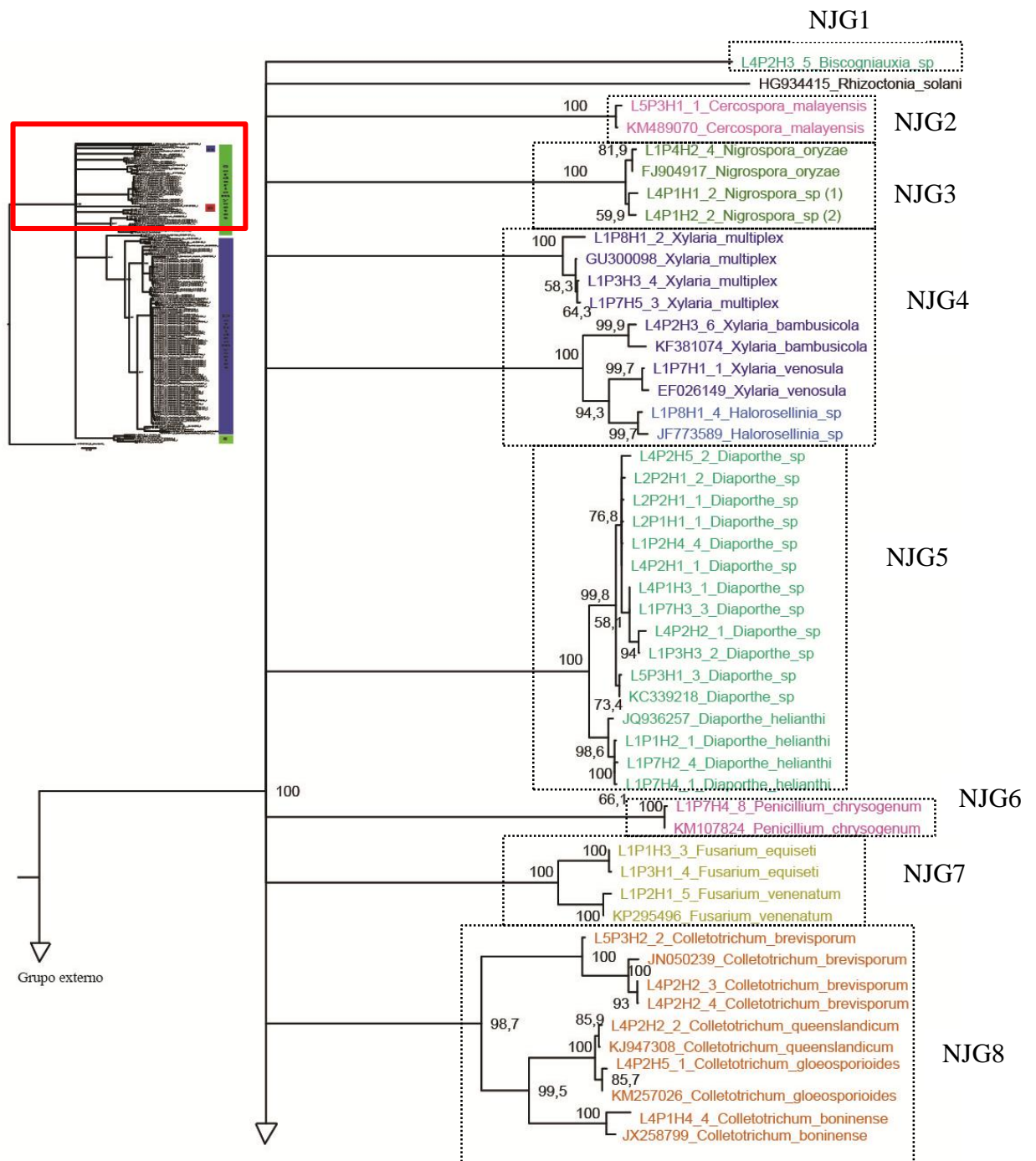


Figura 3A. Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestran las agrupaciones 1-8 y a *Rhizoctonia solani* como el segundo grupo externo. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con los barras de colores, Dothideomycetes (púrpura), Sordariomycetes (verde) y Eurotiomycetes (rojo).

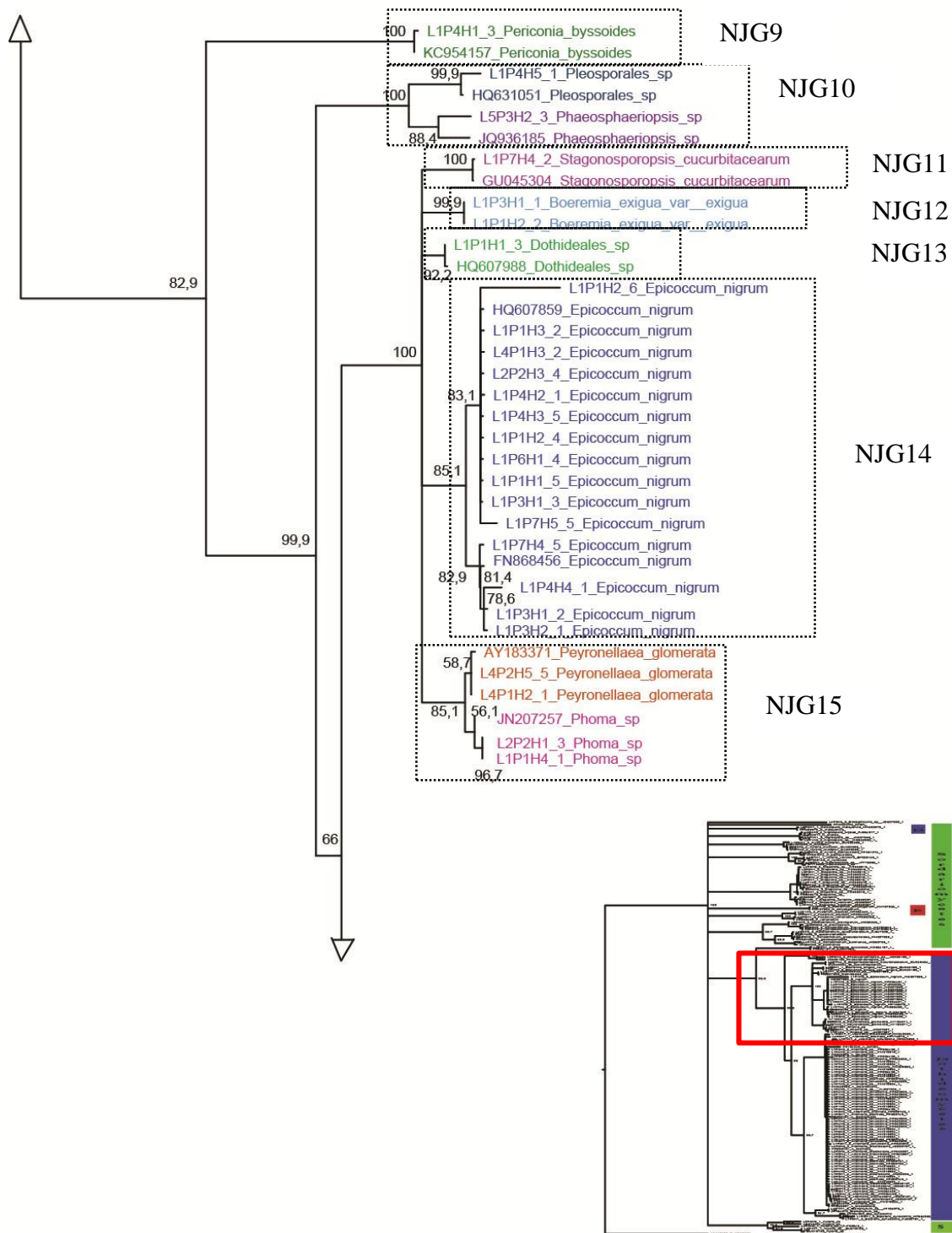
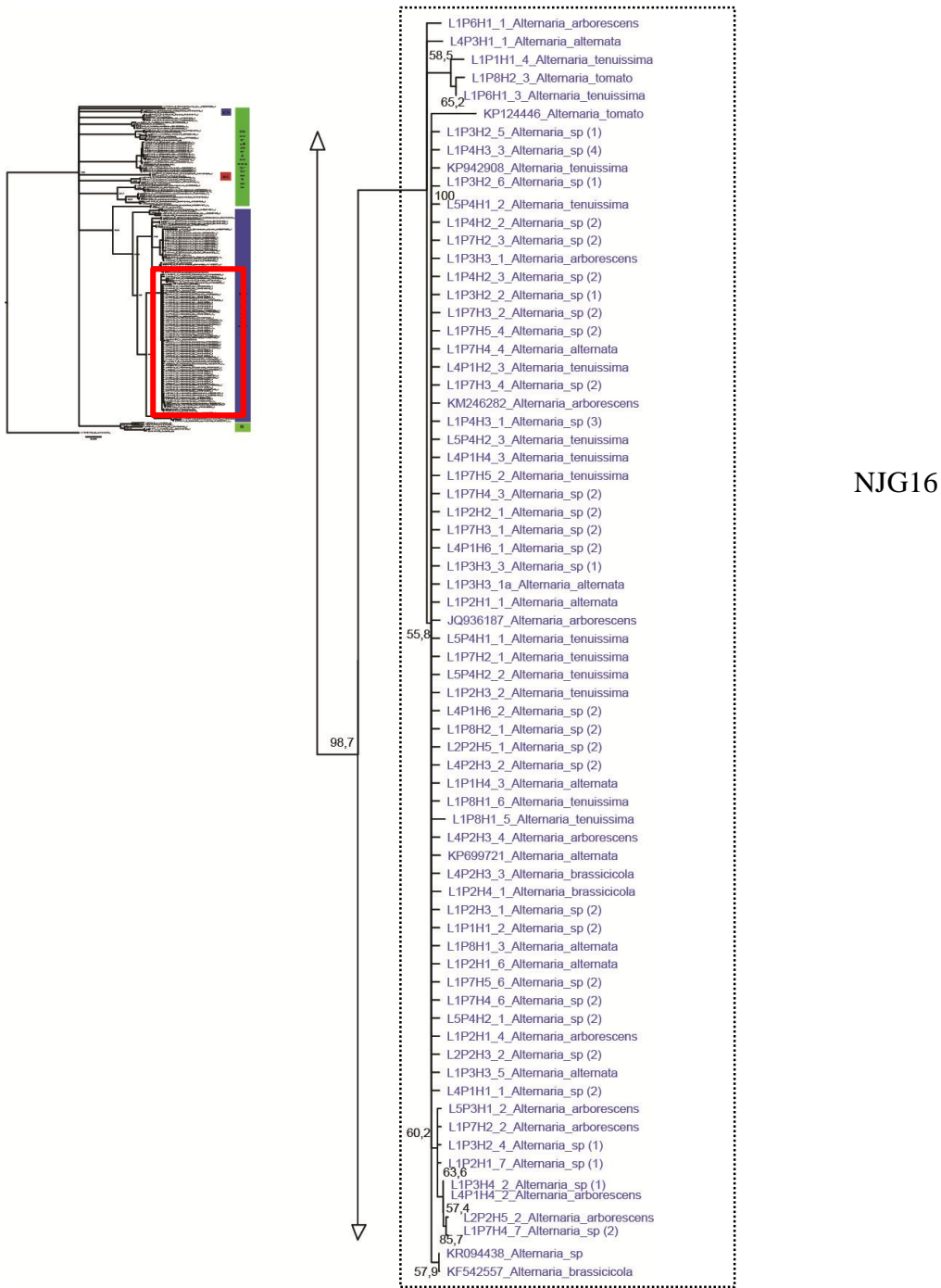


Figura 3B. Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestran las agrupaciones 9-15. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con los barras de colores: Dothideomycetes (púrpura) y Sordariomycetes (verde).



NJG16

Figura 3C. Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestra la agrupación 16. La clase a la cual pertenece se muestra con barra de color púrpura: Dothideomycetes.

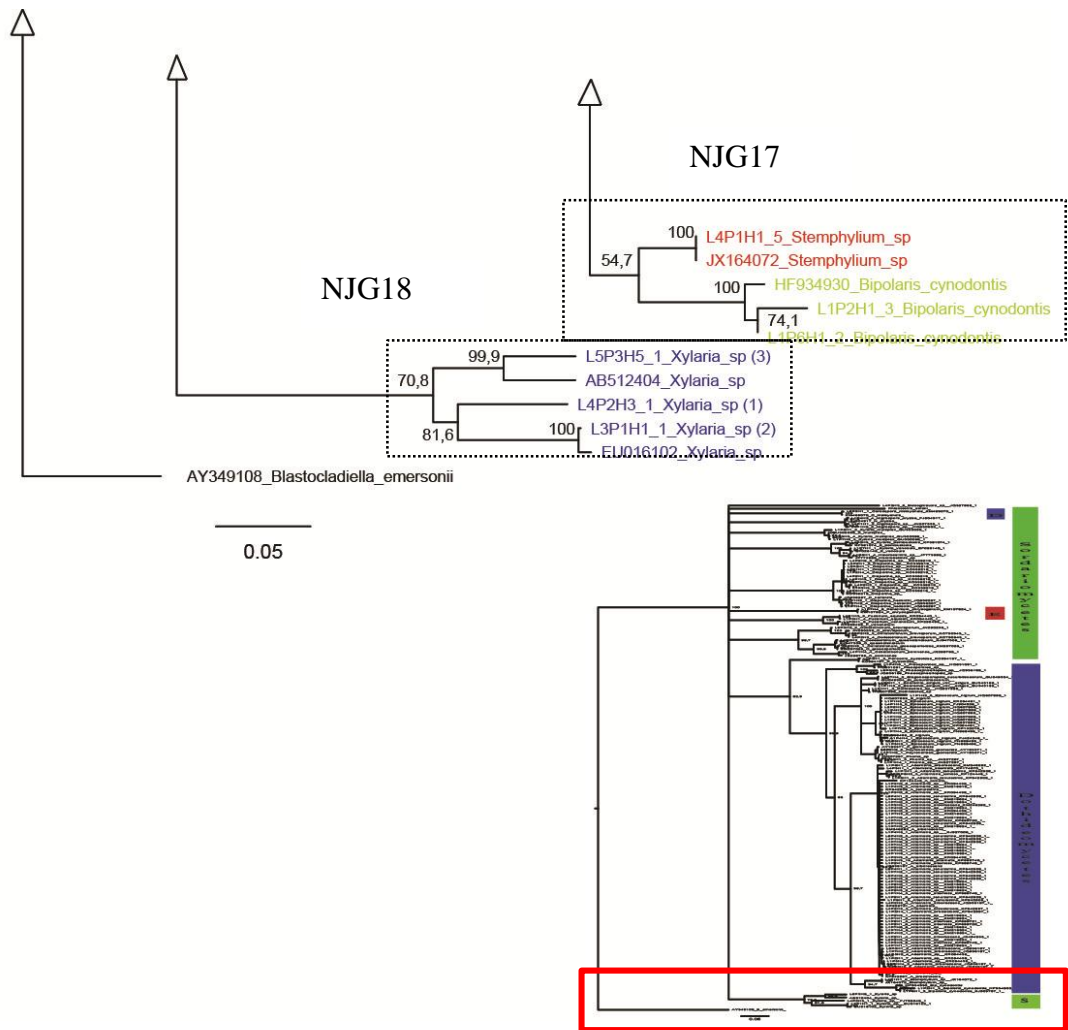


Figura 3D. Árbol filogenético obtenido mediante la técnica *Neighbor joining*. Se muestran las agrupaciones 17 y 18. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con los barras de colores: Dothideomycetes (púrpura) y Sordariomycetes (verde). La barra indica una distancia de 0.05 (por cada 100 nucleótidos cambian 5 bases).

4.4.2 Análisis de la Inferencia Bayesiana

El alineamiento de las secuencias de los aislados, las secuencias de referencia tomadas del GenBank y la utilización de un modelo evolutivo a partir de la matriz original permitió la construcción del árbol bayesiano (Figura 4). De la misma manera que en el árbol anterior, se utilizaron a *B. emersonii* y *R. solani* como grupos externos para mejorar la topología, visualización e interpretación de las relaciones entre hongos microscópicos. En consecuencia, la formación del árbol permitió la conformación de agrupaciones, las cuales han sido designadas con las siglas BG (grupo bayesiano por su nombre en inglés) seguido de una numeración.

El modelo evolutivo para sustitución de nucleótidos que se utilizó en el desarrollo del árbol fue SYM (Zharkikh, 1994). Este fue seleccionado por el programa jModelTest, utilizando la matriz original de las secuencias del estudio alineadas junto a las de referencia y grupos externos. Este modelo de sustitución junto con el algoritmo *Markov chain Monte Carlo* (MCMC) permitieron generar el árbol con la máxima probabilidad de ser observado (Holder & Lewis, 2003).

La topología de este árbol filogenético permitió una mejor interpretación sobre los ancestros en común de los diferentes grupos, de tal manera que se puede ver las estrechas o no tan íntimas relaciones filogenéticas entre los mismos. Como se puede observar, no hay presencia de politomías entre los diferentes grupos, lo cual nos asegura que existe una buena distribución de las ramas de árbol o los linajes de cada una de las especies. Para corroborar este hecho, se tomó en cuenta que valores de soporte de las ramas superiores o iguales a 0,95 son altos y brindan una información más acertada y confiable (James et al., 2006).

Al igual que en el análisis NJ, el árbol bayesiano fue dividido en varias figuras (4A hasta 4E), debido a su longitud. Como se observa en la Figura 4A, *R. solani*, como grupo externo secundario, permitió extender la topología del árbol de tal forma que el *phylum* Ascomycota (dentro del cual están todos los hongos de este estudio) quedó entre los *phyla* Basidiomycota y el del grupo externo principal, Blastocladiomycota. A continuación, se pudo ver la primera agrupación (BG1), conformada por *Cercospora malayensis* y *Penicillium chrysogenum*, el bajo soporte de la rama (0,5735) señala la poca probabilidad que estas especies estén relacionadas. El estudio realizado por James et al. (2006) muestra la evolución de los hongos desde sus ancestros acuáticos. De acuerdo a su filogenia, las clases de hongos de estas dos especies (clases Dothideomycetes y Eurotiomycetes, respectivamente) están separadas y no tienen una relación estrecha. Sin embargo, la relación con las especies de referencia, en ambos casos, tiene un soporte de 1 lo que confirma la identificación realizada en este estudio.

El BG2 estuvo conformado por varios géneros de hongos pertenecientes a la clase Sordariomycetes: *Biscogniauxia*, *Fusarium*, *Nigrospora*, *Xylaria* y *Halorosellinia*. Toda la agrupación tuvo un soporte alto de 0,9259 y es la razón por la que se decidió agrupar a dichos géneros. *Biscogniauxia* comparte familia con *Xylaria* y *Halorosellinia* (Mycobank, 2016), adicionalmente su relación es asociada en estudios que aíslan, identifican molecularmente y analizar filogenéticamente a estos hongos endófitos del sistema foliar de varias plantas (Osono, Tateno & Masuya, 2013). No obstante, no se encontró una estrecha relación con *Fusarium* y *Nigrospora*, por ello el bajo nivel de soporte en estos dos géneros con relación a *Biscogniauxia* (0,6088 y 0,6943 respectivamente). Cabe destacar que la íntima relación que guardan los hongos del presente estudio con los aquellos tomados del GenBank está apoyada por el alto soporte de las ramas del árbol. BG3 (*Colletotrichum*) y BG4 (*Diaporthe*)

presentaron valores de 0,9995 y 1. Esto asegura la buena distribución dentro del dendograma y, de igual manera su relación con sus especies de referencia.

En la Figura 4B se observa la agrupación BG5, la cual estuvo muy bien definida con hongos microscópicos pertenecientes a la familia Didymellaceae. Varios estudios analizan la relación de los géneros *Epicoccum*, *Phoma*, *Peyronellaea*, *Boeremia*, *Stagonosporopsis* y especies del orden Dothideales, de tal forma que concuerdan en que existe un vínculo muy estrecho (Cornejo, 2014; Kernaghan et al., 2003). Por ello, en este árbol se confirma esta íntima relación al tener en su rama un valor de soporte 1. El árbol bayesiano, al mostrar una topología sencilla de interpretar, permite considerar a la especie del orden Dothideales muy cercana a *Phoma* y *Peyronellaea*, teniendo en cuenta que estos géneros son considerados sinónimos como ya se ha discutido en el árbol obtenido mediante NJ (Kernaghan et al., 2003; Mycobank, 2016). El grupo BG6 se forma con las especies *Stemphylium* sp. y *Bipolaris cynodontis*, pertenecientes a la familia Pleosporaceae, como ya se ha mencionado en el previo (Mycobank, 2016; Zhang et al., 2012); sin embargo, el soporte en este árbol mejora a 0,7077 junto con un soporte de identificación con sus referentes de 1 en ambas especies. Este resultado junto con el de NJ confirman su clasificación taxonómica y correcta identificación.

El grupo BG7 estuvo compuesto por todas las especies identificadas en el estudio que pertenecen al género *Alternaria* (Figuras 4C y 4D). Al igual que en el árbol conseguido por NJ, este grupo presenta una politomía entre sus especies, que si bien posee un soporte alto de 1, dificulta saber si la identificación a nivel de especie se ha realizado con éxito. Las homologías en el ADN entre las variantes de *A. alternata* y la propia especie dificulta la diferenciación entre los individuos identificados con este género y sus diversas especies (Kusaba & Tsuge, 1995). Como se ha mencionado antes, la politomía conlleva a una falta de

información en las secuencias, por lo que se puede decir que el árbol bayesiano, en este grupo, no está resuelto (Martínez, 2007).

Finalmente, la Figura 4E nos presenta a las dos últimas agrupaciones BG8 y 9, además del grupo externo principal *B. emersonii*. En el grupo 8 se presentaron soportes altos de 1, tanto en la rama que relaciona a la especie *Pleosporales* sp., la cual no ha sido clasificada, con *Phaeosphaeriopsis* sp., como en la relación con sus especies de referencia. Estos valores pueden ayudar a determinar que *Pleosporales* sp. es especie hermana de *Phaeosphaeriopsis* sp., o que al menos podrían pertenecer a la misma familia de hongos (Zhang et al., 2012).



Figura 4A. Árbol filogenético bayesiano. Se muestran las agrupaciones 1-4 y a *Rhizoctonia solani* como el grupo externo secundario. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con los barras de colores: Dothideomycetes (purpura), Sordariomycetes (verde) y Eurotiomycetes (rojo).

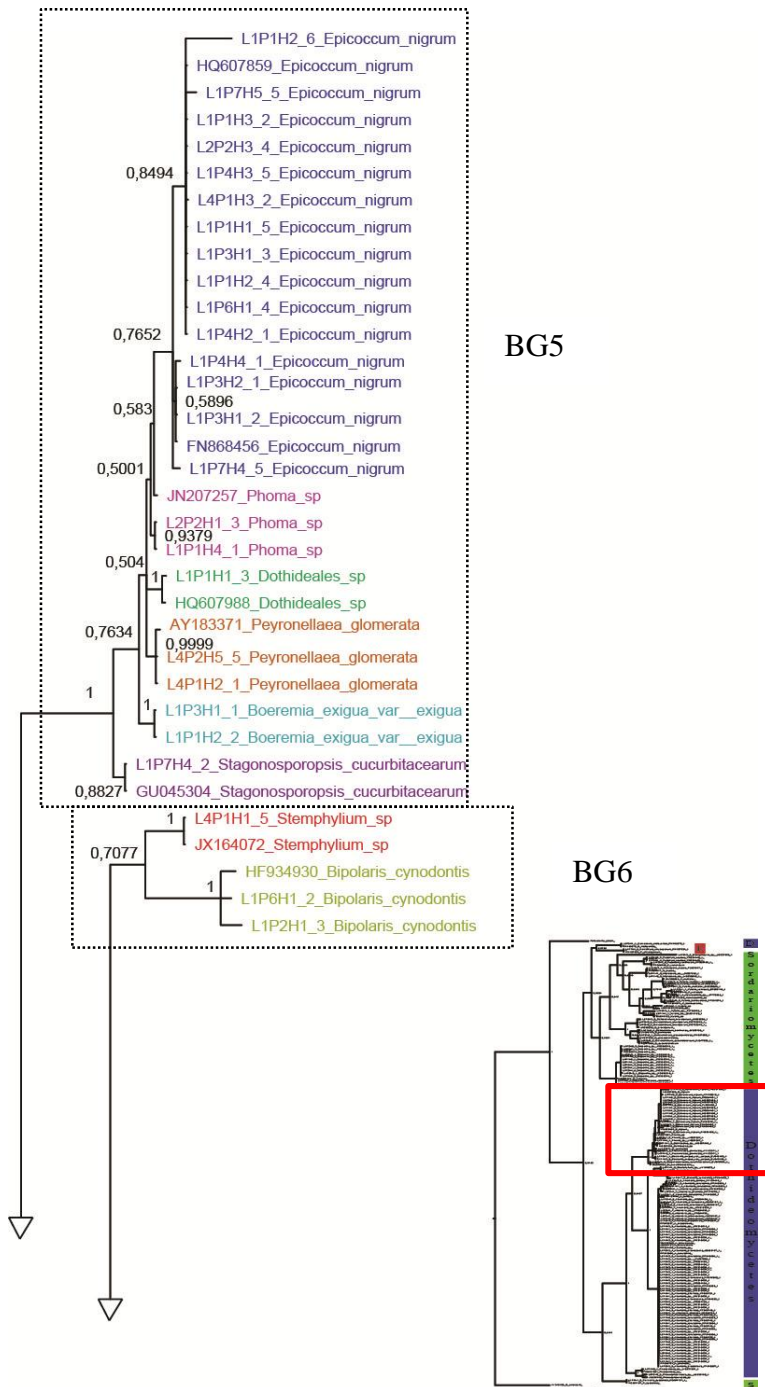


Figura 4B. Árbol filogenético bayesiano. Se muestran las agrupaciones 5 y 6. La clase a la cual pertenecen ambas agrupaciones se muestra con la barra de color púrpura que representa a los Dothideomycetes.

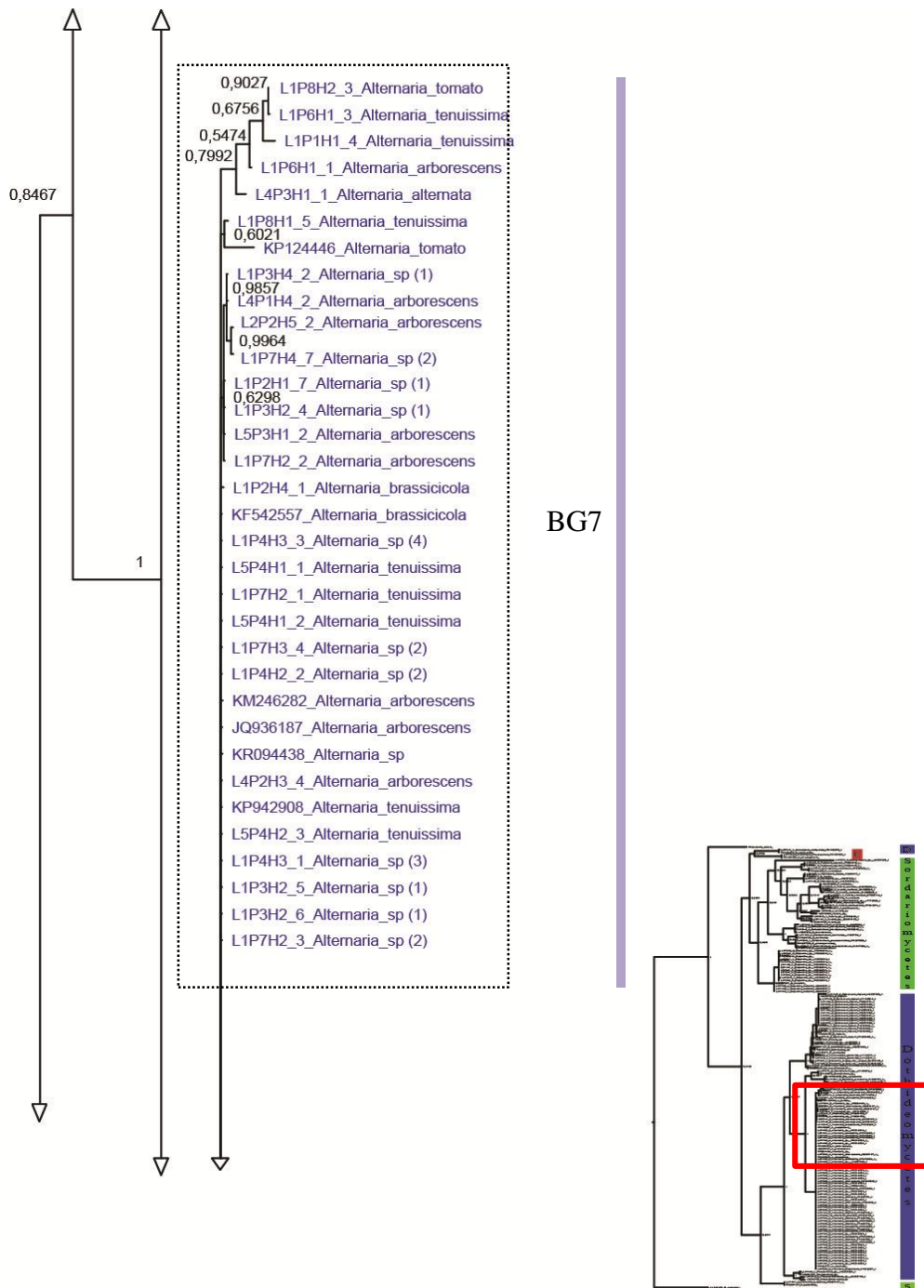


Figura 4C. Árbol filogenético bayesiano. Se muestra la primera parte de la agrupación 7. La clase a la cual pertenece se muestra con barra de color púrpura: Dothideomycetes.

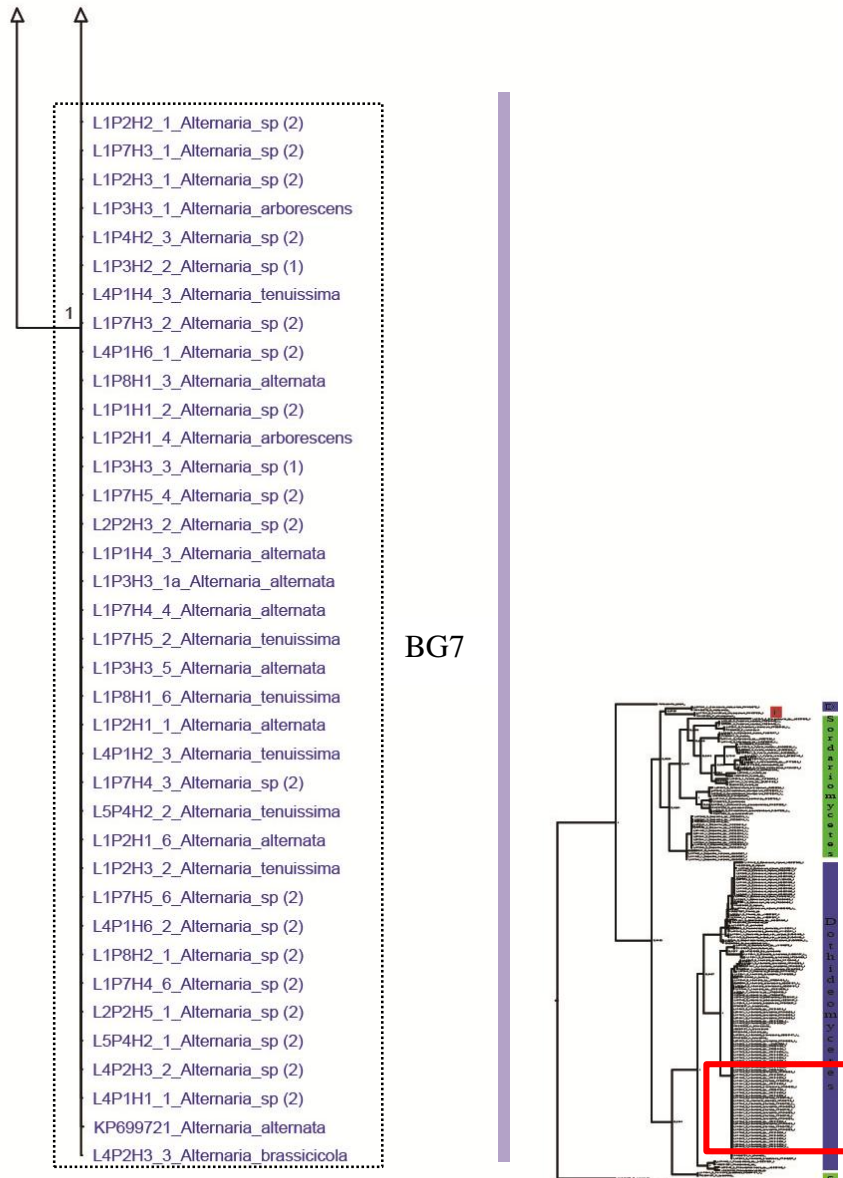


Figura 4D. Árbol filogenético bayesiano. Se muestra la segunda parte de la agrupación 7. La clase a la cual pertenece se muestra con barra de color púrpura: Dothideomycetes.



Figura 4E. Árbol filogenético bayesiano. Se muestran las agrupaciones 8 y 9. Las clases a las cuales pertenece cada agrupación se muestran con las barras de colores: Dothideomycetes (púrpura) y Sordariomycetes (verde). La barra indica una distancia de 0.2 (por cada 100 nucleótidos cambian 20 bases).

4.5 Determinación de hongos microscópicos potencialmente fitopatógenos o saprófitos

De acuerdo a investigaciones realizadas en el país, los hongos responsables de producir enfermedades en las hojas de la uvilla son: *Cercospora* sp., *Alternaria* sp., *Phoma* sp., *Cladosporium* sp., y asociado al marchitamiento vascular, se ha descrito a *Fusarium* sp. (Chicaiza, 2008; INIAP, 2014). Estudios realizados en países vecinos como Colombia y Brasil identificaron a las especies: *Cercospora physalidis* Ell., *C. diffusa* Ell. y Ev., *C. physaliodes* Ell. y Barth, *Entyloma australe* Speg., *Sclerotinia sclerotiorum*, además de las ya identificadas en Ecuador (Forero de La-Rotta, 2014; Muniz et al., 2012 citado por Fischer et al., 2014; Zapata et al., 2005). Por lo tanto, se considera que cuatro de los 21 géneros que se identificaron en el presente estudio son hongos con características de patogenicidad.

Alternaria sp. es considerado un hongo fitopatógeno, ya que causa al menos siete diferentes tipos de enfermedades en las plantas, mediante la producción de toxinas específicas (Kusaba & Tsuge, 1995). Dentro del género *Alternaria* se identificaron nueve especies diferentes. *A. alternata* es un hongo muy interesante. Se lo conoce por ser cosmopolita y generalmente saprófito. No obstante, existen patógenos de esta especie que se los denomina patotipos de *A. alternata* productores de toxinas específicas, como por ejemplo *A. arborescens* (Hu et al., 2012; Kusaba & Tsuge, 1995; Takaoka et al., 2014; Tsuge et al., 2012). Las especies *A. brassicisola*, *A. tunuissima* y *A. tomato*, de acuerdo a diferentes estudios realizados, son considerados fitopatógenos en plantas de la familia Solanaceae, y, por lo tanto, potenciales patógenos para la uvilla (Mansour, Abdel-Megeed, Nasser & Salem, 2015; Sandipan, Patel, Jagtap, & Patel, 2014; van Wees, Chang, Zhu, & Glazebrook, 2003; Zheng & Wu, 2013).

El hongo *Cercospora* es responsable de causar la enfermedad foliar más importante en los cultivos de uvilla. Las especies responsables de la mancha gris en hojas de esta planta son *C. diffusa* E. y E. y *C. physalidis* Ellis (Perea, Rodríguez, Fischer, Velásquez, & Micán, 2010). A pesar de esto, no se encontró una relación entre la especie identificada en el presente estudio, *C. malayensi*, con la uvilla. Este hongo es considerada como un fitopatógeno de la planta de oca (*Abelmoschus esculentus*), perteneciente a la familia Malvaceae, distinta la de *P. peruviana* (Nsimi et al., 2013).

Los hongos *Phoma* sp. y *Fusarium oxysporum* están asociados a patologías graves en la planta de uvilla, causando las enfermedades conocidas como muerte descendente y marchitez vascular, respectivamente (Enciso-Rodríguez et al., 2013; Perea et al., 2010). Las especies de *Fusarium* identificadas fueron distintas a la asociada a uvilla. *F. equiseti* se encuentra en el suelo y puede afectar a plantas gramíneas, colonizando los cereales y produciendo micotoxinas responsables de enfermedades en el cultivo e intoxicaciones en animales de granja (Hestbjerg, Nielsen, Thrane, & Elmholt, 2002; Marín et al., 2012). *F. venenatum* ha sido utilizada desde los años sesenta para la producción de micoproteínas para el consumo humano (Wiebe, 2002). No se ha reportado relación alguna entre ambas especies de *Fusarium* y *P. peruviana*. Adicionalmente, se identificó a los hongos *Peyronellaea glomerata* (sinónimo de *Phoma glomerata*) y *Boeremia exigua* var. *exigua* (sinónimo de *Phoma exigua* var. *exigua*). El primero es un saprófito del suelo que se suele aislar de material orgánico en descomposición (Kernaghan, Sigler, & Khasa, 2003); el segundo puede ser un fitopatógeno, ya que, como ha reportado Hemmati (2014), la especie *B. exigua* es la responsable de manchas foliares en hojas de tomate, a diferencia de *Boeremia exigua* var.

exigua que es conocida como saprófito de suelo o un parásito débil de una amplia gama de plantas.

Lim et al. (1996) destacan al género *Bipolaris* como un hongo fitopatógeno. Principalmente, destacan a *B. cynodontis* como productor de toxinas que afectan al tejido foliar. Sin embargo, el estudio realizado por Larran, Mónaco y Alippi (2001) en hojas de tomate (*Solanum lycopersicum*) considera a *B. cynodontis* como un hongo endófito. Pero, como se ha mencionado antes, los miembros de este grupo de microhongos pueden actuar como potenciales patógenos (Schulz et al., 1999). La especie *Biscogniauxia* sp. es considerada como un hongo endófito, esto gracias al estudio realizado por Venegas, Gutiérrez y Marín (2013) en Colombia, donde se lo aisló de tejidos de la planta de fréjol e identificó morfológica y molecularmente.

Las especies del género *Colletotrichum* son consideradas como hongos endófitos en diferentes cultivos de interés comercial y como fitopatógenos para otros como papaya o uva (Lu et al., 2000; Moriwaki, Sato, & Tsukiboshu, 2003; Vieira, Nascimento, & Michereff, 2013). Las especies identificadas en el estudio fueron: *C. boninense*, *C. brevisporum*, *C. gloeosporioides* y *C. queenslandicum*. Por otro lado, se identificó también a *Diaporthe helianthi*, principal agente de la enfermedad conocida como Phomopsis en el girasol (*Helianthus annuus*) y a *Diaporthe* sp. Las especies de *Diaporthe* pueden ser fitopatógenas de diversos cultivos, plantas ornamentales y árboles silvestres. Sin embargo, también se las puede clasificar como endófitas y saprófitas (Bert et al., 2002; Huang et al., 2015). No se ha encontrado relación con plantas pertenecientes a la misma familia botánica que la uvilla.

Epicoccum nigrum es un hongo mitosporico que puede colonizar diferentes tipos de sustratos y está asociado a la descomposición vegetal primaria. Además, puede presentarse como endófito en diversos tipos de plantas que no están relacionadas, lo que habla de la excelente capacidad de adaptación del hongo. Cabe destacar que es conocida la actividad de biocontrolador contra patógenos de *E. nigrum* como *Pythium* (Fávaro, Sebastianes & Araújo, 2012). Al género *Nigrospora* se lo ha reconocido como un endófito y productor de metabolitos secundarios (Trisuwan et al., 2009). Es así que en el estudio realizado por Trisuwan et al. (2008), se reporta que *Nigrospora* sp. produce metabolitos con actividad antibacteriana. La otra especie identificada en este estudio fue *N. oryzae*, la cual es conocida como fitopatógena para varias especies de plantas como maíz y algodón (Zhou, Zhong, Hu & Gao, 2015). No se ha reportado relación alguna con *P. peruviana*.

Varias especies identificadas en este trabajo pertenecen al género *Xylaria* y se caracterizan por ser hongos endófitos productores de metabolitos bioactivos. Entre ellas están *X. bambusicola*, *X. multiplex* y *X. venosula*. Además, se identificó a *Xylaria* sp., que si bien no se ha determinado el nombre de la especie, probablemente por falta de marcadores moleculares para su identificación, varios autores también la toman en cuenta en el grupo de *Xylaria* que posee las características antes mencionadas (Lin et al., 2001; Liu et al., 2008; Pongcharoen et al., 2008).

Finalmente, los hongos identificados como *Halorosellinia* sp., *Penicillium chrysogenum*, *Periconia byssoides* y *Stemphylium* sp. han sido descritos y reportados como endófitos productores de metabolitos utilizados en diferentes aplicaciones biotecnológicas (Banerjee, Jana & Mahapatra, 2009; Chen et al., 2015; de Siqueira, Conti, de Araújo, & Souza-Mota, 2011; Gao et al., 2011; Xia et al., 2007). *Stagonosporopsis cucurbitacearum* y

Phaeosphaeriopsis sp. se caracterizan por estar asociados a patologías en cultivos de papa y en diferentes tipos de arbustos con usos ornamentales, como *Aesculus parviflora* (Golzar & Wang, 2012; Louis, Waikhom, Singh, Talukdar, & Roy, 2014). La especie identificada como *Dothideales* sp. puede ser ubicada dentro de ese orden perteneciente al *phylum* Ascomycota, donde se pueden encontrar hongos fitopatógenos y endófitos como se han reportado en ciertos estudios (Bills, González & Platas, 2012).

5. CONCLUSIONES

Las localidades de las cuales colectó las hojas cumplieron con uno de los propósitos del estudio, el cual fue analizar muestras de hojas con manchas o lesiones en su tejido. Al muestrear en cinco diferentes localidades se logró aumentar el número de aislados y la posibilidad de encontrar especies de hongos que no hayan sido relacionados con dichas patologías en las hojas de uvillas.

El procesamiento de las 100 muestras de hojas con lesiones o manchas foliares permitió el aislamiento, purificación y extracción de ADN de 130 hongos microscópicos para su caracterización molecular. No obstante, el problema ocasionado por el hongo *Aspergillus* en el laboratorio produjo la pérdida de 52 aislados los cuales no pudieron ser recuperados debido al alto nivel de contaminación.

En base a la identificación molecular, se reportaron 41 diferentes especies de hongos microscópicos asociadas a manchas foliares en hojas de *Physalis peruviana* L. Dichas asociaciones son posibles por características fitopatógenos, saprofíticas y endófitas particulares de cada especie a grupo de especies fúngicas. Los géneros más abundantes aislados de las muestras fueron *Alternaria*, *Epicoccum*, *Diaporthe*, *Xylaria* y *Colletotrichum*. Dentro de estos géneros las especies *Alternaria* sp., *A. tenuissima*, *E. nigrum*, *Diaporthe* sp., *X. multiplex* y *C. brevisporum* fueron aislados en mayores cantidades que las demás.

El análisis filogenético mediante NJ e Inferencia Bayesiana permitió corroborar y dar un mayor soporte a la identificación molecular de los hongos microscópicos debido a la comparación entre las secuencias de ADN del GenBank y de los aislados. Cabe destacar que

en cuanto a la topología, valores de soporte ($\geq 0,95$), especificidad y facilidad de interpretación, el árbol filogenético bayesiano fue superior al de NJ. El análisis de Máxima Verosimilitud no arrojó resultados por lo que no se incluye en la comparación antes mencionada.

En ambos análisis filogenéticos se presentaron politomías lo cual puede ser indicio de varios eventos. Al generarse varias ramas de un mismo nodo (más de dos), se considera que los diferentes linajes provenientes del nodo politómico pudieron haberse separado al mismo tiempo o de una manera rápida en un proceso de evolución en lugar de hacerlo secuencialmente, provocando una mala interpretación por parte de los métodos filogenéticos utilizados. Otra posibilidad para la generación de politomías puede generarse a nivel de la información de las secuencias de ADN, la cual puede impedir determinar el orden de las ramificaciones de los árboles, posiblemente por contradicciones entre las secuencias de ADN de los aislados. El análisis de Inferencia Bayesiana redujo de gran manera las politomías en comparación al realizado por el método de NJ.

La mayor cantidad de especies aisladas de lesiones en hojas de *Physalis peruviana* L. pertenecen al género de hongos fitopatógenos *Alternaria*, lo cual concuerda con los reportes e investigaciones realizadas dentro y fuera del país sobre el rol de este hongo microscópico en la producción de enfermedades en el tejido foliar. La identificación que llegó solo hasta nivel de género y, en casos puntuales, orden se pudo deber a la falta de información en las secuencias con las cuales se trabajó en el estudio. Esto pudo ser provocado por una deficiente purificación del ADN previo a la secuenciación.

6. RECOMENDACIONES

Durante el trabajo de laboratorio, la contaminación de *Aspergillus* en los aislados de hongos microscópicos fue muy frecuente. Entonces, se aconseja realizar una buena desinfección del área de trabajo. En caso de determinar que el laboratorio se encuentra contaminado con este u otro hongo, se debe realizar una limpieza y desinfección que incluya el uso de etanol al 70%, formol y luz UV para la eliminación de esporas.

Sería de gran interés realizar los postulados de Koch con las especies que se han determinado como fitopatógenas y conocer si tiene la capacidad de producir manchas foliares en tejido sano de hojas *Physalis peruviana* L.

Complementario a los postulados de Koch, un análisis de la biodiversidad es ideal para conocer la riqueza de poblaciones de microorganismo presentes en cada una de las localidades, las cuales también serán analizadas más a profundidad. Cabe recalcar que en el presente estudio el objetivo fue la identificación de hongos por métodos alternativos (moleculares) a los tradicionales.

Se recomienda utilizar el análisis de Inferencia Bayesiana debido a las ventajas que presenta como el tiempo de generación del árbol filogenético (aproximadamente 3 días) y la precisión de sus resultados. Conjuntamente, es considerado por varios autores como el método de análisis filogenético más completo. *Neighbor joining*, si bien tiene falencias, es muy útil para estudios que no necesiten un análisis filogenético tan profundo como los de biodiversidad de microorganismos.

La literatura destaca que los hongos microscópicos también pueden afectar a las diferentes partes de la planta como tallo, raíces, flores y fruto. Sería un gran complemento para este estudio el aislamiento e identificación de estos microorganismos. Se podría tener una visión más amplia sobre los patógenos que afectan a la planta de uvilla. y además, determinar si existe algún tipo de relación favorable o no para el desarrollo de dichos hongos.

REFERENCIAS

- Abang, M. M., Winter, S., Green, K. R., Hoffmann, P., Mignouna, H. D., & Wolf, G. A. (2002). Molecular identification of *Colletotrichum gloeosporioides* causing yam anthracnose in Nigeria. *Plant Pathology*, 51, 63–71. Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.0032-0862.2001.00655.x/epdf>
- Abello, J. F., & Kelemu, S. (2006). Hongos endófitos: ventajas adaptativas que habitan en el interior de las plantas. *Revista Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 7 (2), 55-57. Recuperado de http://www.corpoica.org.co/sitioWeb/Archivos/Revista/6_HongosEndfitos_RevCorpoica_V7N2_2006_CorregidoDEF.pdf
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. Quinta Edición. Londres: Elsevier Inc.
- Altamirano, M. (2010). *Estudio de la cadena productiva de uvilla (Physalis peruviana L.) en la Sierra Norte del Ecuador* (Disertación de Ingeniería). Recuperado de <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/950/1/95220.pdf>
- Alves, F., Ramos, B., García, M., Eslava, A., & Díaz, J. (2002). A DNA-Based Procedure for In Planta Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. *Phytopathology*, 92 (3), 237-244. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PHTO.2002.92.3.237>
- Atkins, S. D., & Clark, I. M. (2004). Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J. Appl.*

Genet., 45 (1), 3-15. Recuperado de http://jag.igr.poznan.pl/2004-Volume-45/1/pdf/2004_Volume_45_1-3-15.pdf

Arnold, A., Henk, D., Eells, R., Lutzoni, F., & Vilgalys, R. (2007). Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in loblolly pine inferred by culturing and environmental PCR. *Mycologia*, 99 (2), 185–206. Recuperado de <http://www.mycologia.org/content/99/2/185.full.pdf+html>

Banerjee, D., Jana, M., & Mahapatra, S. (2009). Production of exopolysaccharide by endophytic *Stemphylium* sp. *Micología Aplicada Internacional*, 21 (2), 57-62. Recuperado de https://www.researchgate.net/profile/Debdulal_Banerjee/publication/40542849_Production_of_Exopolysaccharide_by_Endophytic_Stemphylium_SP/links/00b7d52bd8fbc16007000000.pdf

Bazinet, A. L., Zwickl, D. J., & Cummings, M. P. (2014). A Gateway for Phylogenetic Analysis Powered by Grid Computing Featuring GARLI 2.0. *Systematic Biology*, 63 (5), 812-818. doi:10.1093/sysbio/syu031.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. (2010). Research article ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiology*, 10 (189), 1-9. Recuperado de <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/189>

- Bert, P., Jouan, I., Tourvieille de Labrouhe, D., Serre, F., Nicolas, P., & Vear, F. (2002). Comparative genetic analysis of quantitative traits in sunflower (*Helianthus annuus* L.) 1. QTL involved in resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* and *Diaporthe helianthi*. *Theor Appl Genet*, *105*, 985–993. doi:10.1007/s00122-002-1004-3
- Bills, G., Gonzales, V., & Platas, G. (2012). *Kabatiella bupleuri* sp. nov. (Dothideales), a pleomorphic epiphyte and endophyte of the Mediterranean plant *Bupleurum gibraltarium* (Apiaceae). *Mycologia*, *104* (4), 962–973. doi: 10.3852/12-003
- 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 (Physalis peruviana)*. Boletín técnico N° 10. Recuperado de <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00170.pdf>
- Chen, C. J., Zhou, Y. Q., Liu, X. X., Zhang, W. J., Hu, S. S., Lin, L. P., Huo, G. M., Jiao, R. H., Tan, R. X., & Ge, H. M. (2015). Antimicrobial and Anti-inflammatory Compounds from a Marine fungus *Pleosporales* sp, *Tetrahedron Letters*, *56* (5), 6182-6189. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/sci-hub.io/science/article/pii/S0040403915301210>
- Chicaiza, G. (2008). *Inventario de enfermedades fungosas de la uvilla (Physalis peruviana) en las parroquias de Yaruqui y Amaguaña del Cantón Quito, Provincia de*

Pichincha (Disertación de Ingeniería). Recuperado de <http://www.biblioteca.ueb.edu.ec/bitstream/15001/173/1/TESIS%20DE%20UVILLA.pdf>

Cornejo, F. (2014). *Diversidad de hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en fréjol común (Phaseolus vulgaris L.) en la provincia de Loja, Ecuador, 2013* (Disertación de Pregrado). [CD]. Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Bioanálisis, Quito, Ecuador.

Corredor, I. C., Cepero, M. C., & Restrepo, S. (2007). Evaluación de la susceptibilidad de endófitos aislados de rosa (*Rosa hybrida*) a fungicidas comerciales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10 (1), 59-74. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77690108>

Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., & Samson, R. A. (2009). *Fungal Biodiversity*. The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.

Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9 (8), 772. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4594756/>

de Siqueira, V., Conti, R., de Araújo, J., & Souza-Motta, C. (2011). Endophytic fungi from the medicinal plant *Lippia sidoides* Cham. and their antimicrobial activity. *Symbiosis*, 53, 89–95. doi:10.1007/s13199-011-0113-7

- del Palacio, A., Cuétara, M., & Pontón J. (2003). El diagnóstico de laboratorio de la aspergilosis invasora. *Rev. Iberoam. Micol.*, 20, 90-98. Recuperado de <http://www.reviberoammicol.com/2003-20/090098.pdf>
- Eguiarte, L., Souza, V., Nuñez-Farfán, J., & Hernández-Baños, B. (1997). El análisis filogenético: métodos, problemas y perspectivas. *Bol. Soc. Bot.*, 60, 169-181. Recuperado de http://132.248.9.195/pdbis/268245/268245_05.pdf
- Enciso-Rodríguez, F. E., González, C., Rodríguez, E. A., López, C. E., Landsman D., Barrero, L. E., & Mariño-Ramírez, L. (2013). Identification of Immunity Related Genes to Study the *Physalis peruviana* – *Fusarium oxysporum* Pathosystem. *PLoS ONE*, 8 (7). doi:10.1371/journal.pone.0068500
- Fávaro, L., Sebastianes, F., & Araújo, W. (2012). *Epicoccum nigrum* P16, a sugarcane endophyte, produces antifungal compounds and induces root growth. *PLoS ONE*, 7 (6). doi:10.1371/journal.pone.0036826
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39 (4), 783–791. Recuperado de <http://biostat.jhsph.edu/~jleek/teaching/2011/754/reading/felsenstein.pdf>
- FHIA. (2008). Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. Hoja técnica N°1 (2^{da} Ed., pp. 1-4). Recuperado de http://www.fhia.org.hn/downloads/proteccion_veg_pdfs/hojatecnica1deterioropososecha%20.pdf

Fischer, G., & Almanza, P. (1993). Nuevas Tecnologías en el cultivo de la uchuva, *Physalis peruviana* L. *Revista Agrodesarrollo*, 4 (1-2), 292-304. Recuperado de http://www.researchgate.net/publication/256702401_Nuevas_tecnologas_en_el_cultivo_de_uchuva_Physalis_peruviana_L

Fischer, G., Almanza-Merchán, P. J., & Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Rev. Bras. Frutic.*, 36 (1), 1-15. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>

Fischer, G., Ebert, G., & Lüdders, P. (2007). Production, seeds and carbohydrate contents of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruits grown at two contrasting Colombian altitudes. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 81, 29-35. Recuperado de <http://pub.jki.bund.de/index.php/JABFQ/article/view/2107>

Flores, O., Rendón, J., Martínez, F., Guerra, G., Sierra, E., & Pardo, J. (2008). Las herramientas del modelado molecular. *Mensaje Bioquímico*, 32, 95-134. Recuperado de http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq08v32p95_134_Pardo.pdf

Forero de La-Rotta, M. C. (2014). Enfermedades de la uchuva (*Physalis peruviana* L.). En C. P. Pássaro (Ed.), *Physalis peruviana* L.: Fruta andina para el mundo (1ª Ed., pp. 49-78). Recuperado de

http://www.vidarium.org/sites/default/files/archivos/cornucopia_2014._uchuva_physalis_peruviana_l._fruta_andina_para_el_mundo.pdf#page=51

Galvis, J. A., Fischer, G., & Gordillo, O. P. (2005). Cosecha y poscosecha de la uchuva. En G. Fischer, D. Miranda, W. Piedrahita y J. Romero (Eds.), *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.) en Colombia* (1^a Ed., pp. 165-190). Recuperado de http://www.asohofrucol.com.co/archivos/biblioteca/biblioteca_23_Avances%20cultivo%20uchuva.pdf

Gao, S. S., Li, X. M., Du, F. Y., Li, C. S., Proksch, P., & Wang, B. G. (2011). Secondary metabolites from a marine-derived endophytic fungus *Penicillium chrysogenum* QEN-24S. *Mar. Drugs*, 9, 59-70. doi:10.3390/md9010059

Golzar, H., & Wang, C. (2012). First report of *Phaeosphaeriopsis glaucopunctata* as the cause of leaf spot and necrosis on *Ruscus aculeatus* in Australia. *Australasian Plant Dis. Notes*, 7, 13–15. doi:10.1007/s13314-011-0035-5

Goyenechea, I., & Contreras-Ramos, A. (2007). Controversias en sistemática filogenética. En A. Contreras-Ramos, C. Cuevas, I. Goyenechea y U. Iturbe (Eds.), *La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad* (1^a Ed., pp. 47-54). Recuperado de http://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_SistBioAnimal/Irene_Mayer/GC2007Controversias.pdf

- Hemmati, R. (2014). First report of *Boeremia exigua* on tomato in Iran. *Iran. J. Plant Path.*, 50 (3), 141. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/274314930_First_report_of_Boeremia_exigua_on_tomato_in_Iran
- Hestbjerg, H., Nielsen, K., Thrane, U., & Elmholt, S. (2002). Production of Trichothecenes and Other Secondary Metabolites by *Fusarium culmorum* and *Fusarium equiseti* on Common Laboratory Media and a Soil Organic Matter Agar: An Ecological Interpretation. *J. Agric. Food Chem.*, 250, 7593–7599. Recuperado de <http://pubs.acs.org/sci-hub.io/doi/abs/10.1021/jf020432o>
- Higginbotham, S. J., Arnold, A. E., Ibañez, A., Spadafora, C., Coley, P. D., & Kursar, T. (2013). Bioactivity of Fungal Endophytes as a Function of Endophyte Taxonomy and the Taxonomy and Distribution of Their Host Plants. *PLOS ONE*, 8 (9), e73192. doi:10.1371/journal.pone.0073192
- Higgins, K. L., Coley, P. D., Kursar, T. A., & Arnold, A. E. (2011). Culturing and direct PCR suggest prevalent host generalism among diverse fungal endophytes of tropical forest grasses. *Mycologia*, 103 (2), 247–260. doi: 10.3852/09-158
- Hillis, D. M., & Bull, J. J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42 (2), 182–192. Recuperado de <http://www.zo.utexas.edu/faculty/antisense/papers/HillisandBull.pdf>

- Holder, M., & Lewis, P. O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and bayesian approaches. *Nature*, 4, 275-284. doi:10.1038/nrg1044
- Huang, W.Y., Cai, Y.Z., Hyde, K.D., Corke, H., & Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. *Fungal Diversity*, 33, 61-75. Recuperado de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/33-3.pdf>
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., Surveswaran, S., Hyde, K. D., Corke, H., & Sun, M. (2009). Molecular phylogenetic identification of endophytic fungi isolated from three *Artemisia* species. *Fungal Diversity*, 36, 69-88. Recuperado de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD36-5.pdf>
- Huang, F., Udayanga, D., Wang, X., Hou, X., Mei, X., Fu, Y., Hyde, K.D., & Li, H. (2015). Endophytic *Diaporthe* associated with Citrus: a phylogenetic reassessment with seven new species from China, *Fungal Biology*, 119 (5), 331-347. doi:10.1016/j.funbio.2015.02.006
- Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17 (8), 754-755. Recuperado de <http://webpages.icav.up.pt/PTDC/BIA-BEC/104097/2008/23.pdf>
- Huelsenbeck, J. P., Ronquist, F., Nielsen, R., & Bollback, J. P. (2001). Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, 294, 2310-2314.

Recuperado de <http://science.sciencemag.org.sci-hub.io/content/294/5550/2310.short>

INIAP. (2014). *Manejo de enfermedades. Uvilla*. Recuperado de <http://tecnologia.iniap.gob.ec/images/rubros/contenido/uvilla/7enfermedades.pdf>

Invitrogen. (2010). *Qubit® 2.0 Fluorometer*. Recuperado de http://www.mbl.edu/jbpc/files/2014/05/Qubit2_Fluorometer_UserManual.pdf

Juarez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4 (2), 14-23. Recuperado de [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Mentjies, P., & Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28 (12), 1647-1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199

Kernaghan, G., Sigler, L., & Khasa, D. (2003). Mycorrhizal and root endophytic fungi of containerized *Picea glauca* seedlings assessed by rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.*, 45, 128–136. doi:10.1007/s00248-002-1024-1

- Kosiol, C., Bofkin, L., & Whelan, S. (2006). Phylogenetics by likelihood: Evolutionary modeling as a tool for understanding the genome. *Journal of Biomedical Informatics*, 39, 51–61. doi:10.1016/j.jbi.2005.08.003
- Kusaba, M., & Tsuge, T. (1995). Phylogeny of *Alternaria* fungi known to produce host-specific toxins on the basis of variation in internal transcribed spacers of ribosomal DNA. *Curr. Genet.*, 28, 491-498. Recuperado de <http://link.springer.com.sci-hub.io/article/10.1007/BF00310821>
- Lim, C., Miyagawa, H., Tsurushima, T., Ueno, T., & Sato, M. (1996). Cochlioquinol: A new cochlioquinone derivative produced by the plant pathogenic fungus *Bipolaris cynodontis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60 (4), 724-725. doi:10.1271/bbb.60.724
- Lin, Y., Wu, X., Feng, S., Jiang, G., Zhou, S., Vrijmoed, L., & Jones, G. (2001). A novel N-cinnamoylcyclopeptide containing an allenic ether from the fungus *Xylaria* sp. (strain c2508) from the South China Sea. *Tetrahedron Letters*, 42, 449–451. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com.sci-hub.io/science/article/pii/S0040403900019481>
- Liò, P., y Goldman, N. (1998). Models of Molecular Evolution and Phylogeny. *Genome Res.*, 8, 1233-1244. doi:10.1101/gr.8.12.1233
- Liu, X., Dong, M., Chen, X., Jiang, M., Lv, X., & Zhou, J. (2008). Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp.YX-28 and identification of its antimicrobial compound 7-

amino-4-methylcoumarin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 78, 241–247.
doi:10.1007/s00253-007-1305-1

Louis, B., Waikhom, S., Singh, W., Talukdar, N., & Roy, P. (2014). Diversity of Ascomycetes at the potato interface: New devastating fungal pathogen posing threat to potato farming. *Plant pathology journal*, 13 (1), 18-27.
doi:10.3923/ppj.2014.18.27

Lu, H., Zou, W., Meng, J., Hu, J., & Tan, R. (2000). New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp., an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, 151, 67–73. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/sci-hub.io/science/article/pii/S0168945299001995>

Mansour, M., Abdel-Megeed, A., Nasser, R., & Salem, M. (2015). Comparative evaluation of some woody tree methanolic extracts and paraloid B-72 against phytopathogenic mold fungi *Alternaria tenuissima* and *Fusarium culmorum*. *BioResource*, 10 (2), 2570-2584. Recuperado de http://152.1.0.246/index.php/BioRes/article/view/BioRes_10_2_2570_Mansour_Evaluation_Woody_Tree_Methanolic_Extracts/3426

Marín, P., Antonio Moretti, A., Ritieni, A., Jurado, M., Vázquez, C., M., & González-Jaén, M. T. (2012). Phylogenetic analyses and toxigenic profiles of *Fusarium equiseti* and *Fusarium acuminatum* isolated from cereals from Southern Europe. *Food Microbiology*, 31, 229-237. doi:10.1016/j.fm.2012.03.014

- Martínez, L. (2007). Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En L. Eguiarte, V. Souza, X. Aguirre (Eds.), *Ecología molecular* (pp. 87-160). Recuperado de <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap4.pdf>
- Meléndez-Hevia, E., Raposo, R. R., Meléndez, R., & Cabezas, H. (1997). Revisión de los métodos filogenéticos de secuencias: una crítica a la teoría de Kimura sobre el neutralismo de la evolución molecular. *Revista de la Academia Canaria de Ciencias*, 9, 65-86. Recuperado de <http://www.metabolismo.biz/web/wp-content/uploads/Filogenia.pdf>
- MiCC. (2016). Microfungi Collections Consortium. Recuperado de <http://www.microfungi.org>
- Mora, A. M. (2012). *Hongos endófitos asociados a Espeletia grandiflora del PNN Chingaza* (Disertación de Pregrado). Recuperado de <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/11804/1/MoraBarahonaAngelicaMaria2012.pdf>
- Moriwaki, J., Sato, T., & Tsukiboshi, T. (2003). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum boninense* sp. nov. from Japan. *Mycoscience*, 44, 47–53. doi:10.1007/s10267-002-0079-7
- Morrow, C. A., & Frase, J. A. (2009). Sexual reproduction and dimorphism in the pathogenic basidiomycetes. *FEMS Yeast Res.*, 9, 161–177. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00475.x

Mueller, G., Bills, G., & Foster, M. (Eds.). (2004). *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*. San Diego, EE.UU: Elsevier Inc.

Mycobank. (2016). Fungal Databases, Nomenclature & Species Banks. Recuperado el 9 de mayo de 2016, de <http://www.mycobank.org/>

Nilsson, R. H., Ryberg, M., Abarenkov, K., Sjökvist, E., & Kristiansson, E. (2009). The ITS regions a target for characterization of fungal communities using emerging sequencing technologies. *FEMS Microbiol. Lett.*, 296, 97–101. doi:10.1111/j.1574-6968.2009.01618.x

Nsimi, A., Bell, J., Dabandata, C., Tiwa, M., Ngalle, H., Godswill, N., & Amougou, A. (2013). Assessment of the sensitivity of some varieties of okra [*Abelmoschus esculentus* (Moench)] to cercosporiose of the leaves caused by *Cercospora malayensis* and *Pseudocercospora abelmoschii*. *World Journal of Bioscience and Biotechnology Research*, 1 (1), 1-11. Recuperado de http://www.wjbbbr.com/WJBBR_Vol.%201,%20No.%201,%20December%202013/Assessment%20of%20the%20sensitivity.pdf

O'Meara, B. C. (2012). Evolutionary Inferences from Phylogenies: A Review of Methods. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 43, 267–85. doi:10.1146/annurev-ecolsys-110411-160331

- Osono, T., Tateno, O., & Masuya, H. (2013). Diversity and ubiquity of xylariaceous endophytes in live and dead leaves of temperate forest trees. *Mycoscience*, 54 (1), 54-61. Recuperado de <http://hdl.handle.net/2433/173402>
- Pássaro, C. P. (2014). Prólogo. En C. P. Pássaro (Ed.), *Physalis peruviana* L.: Fruta andina para el mundo (1ª Ed., pp. 5-6). Recuperado de http://www.vidarium.org/sites/default/files/archivos/cornucopia_2014._uchuvas_physalis_peruviana_1._fruta_andina_para_el_mundo.pdf#page=51
- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Rev. peru biol.*, 18 (2), 265 – 267. Recuperado de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rpb/v18n2/a23v18n2.pdf>
- Perea, M., Rodríguez, N., Fischer, G., Velásquez, M., & Micán, Y. (2010). Uchuva *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). En M. Perea, L. P. Matallana, A. Tirado (Eds.), *Biología aplicada al mejoramiento de los cultivos de frutas tropicales* (pp. 466- 490). Recuperado de [https://www.researchgate.net/profile/Gerhard_Fischer/publication/257765328_Uchuva_Physalis_peruviana_L._\(Solanaceae\)/links/02e7e525d40123f8d2000000.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Gerhard_Fischer/publication/257765328_Uchuva_Physalis_peruviana_L._(Solanaceae)/links/02e7e525d40123f8d2000000.pdf)
- Pinzón, Y., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2013). Diagnóstico molecular diferencial *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum* en ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15 (1). Recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/39750/41963>

Pongcharoen, W., Rukachaisirikul, V., Phongpaichit, S., Kühn, T., Pelzing, M., Sakayaroj, J., & Taylor, W. (2008). Metabolites from the endophytic fungus *Xylaria* sp. PSU-D14. *Phytochemistry*, 69, 1900–1902. doi:10.1016/j.phytochem.2008.04.003

PROEcuador. (2013). *Boletín de comercio exterior*. Recuperado de http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/07/PROEcuador_IC_03-31.pdf

Prohens, J., & Sepúlveda, S. T. (2014). Recursos genéticos y mejoramiento de *Physalis peruviana* L. En C. P. Pássaro (Ed.), *Physalis peruviana* L.: Fruta andina para el mundo (1ª Ed., pp. 8-21). Recuperado de http://www.vidarium.org/sites/default/files/archivos/cornucopia_2014._uchuvasalisperuviana_1._fruta_andina_para_el_mundo.pdf#page=51

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. (2012). *GoTaq® Green Master Mix*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/product%20information%20sheets/g/gotaq%20green%20master%20mix%20protocol.pdf>

Promega. (2014). *Wizard® Genomic DNA Purification Kit*. Recuperado de <https://worldwide.promega.com/~media/files/resources/protocols/technical%20manuals/0/wizard%20genomic%20dna%20purification%20kit%20protocol.pdf>

Rodríguez, J., Velandia, J., & Viteri, S. (2010). Evaluación de Microorganismos Aislados de Gallinaza por su Potencial para el Biocontrol de *Fusarium (F. oxysporum)* en Plántulas de Uchuva (*Physalis peruviana*). *Rev. Fac. Nat. Agr. Medellín*, 63, (2), 5499-5509. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/rfnam/v63n2/a04v63n01.pdf>

Rodríguez, R. J., White Jr, F. J., Arnold, A. E., & Redman, R. S. (2009). Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182 (2), 314-330. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.02773.x

Rodríguez-Tudela, J. L., Cuesta, I., Gómez-López, A., Alastruey-Izquierdo, A., Bernal-Martínez, L. & Cuenca-Estrella, M. (2008). Pruebas moleculares en el diagnóstico micológico. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 26 (13), 47-53. Recuperado de http://apps.elsevier.es/watermark/ctl_servlet?_f=10&pidet_articulo=13128780&pidet_usuario=0&pcontactid=&pidet_revista=28&ty=84&accion=L&origen=zonalectura&web=www.elsevier.es&lan=es&fichero=28v26nSupl.13a13128780pdf001.pdf

Rosa, L., Vieira, M., Cota, B., Johann, S., Alves, T., Zani, C., & Rosa, C. (2011). Endophytic Fungi of Tropical Forests: A Promising Source of Bioactive Prototype Molecules for the Treatment of Neglected Diseases. En C. Rundfeldt (Ed.), *Drug*

Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies (pp. 471-472).

doi:10.5772/27783

Saitou, N., & Nei, M. (1987). The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4 (4), 406-425. Recuperado de <http://mbe.oxfordjournals.org/content/4/4/406.long>

Sánchez-Fernández, R. E., Sánchez-Ortiz, B. L., Sandoval-Espinosa, Y. K., Ulloa-Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. C., & Macías-Rubalcava, M. L. (2013). Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 16 (2), 132-146. Recuperado de <http://www.scielo.org.mx/pdf/tip/v16n2/v16n2a6.pdf>

Sandipan, P., Patel, N. A., Jagtap, P. K., & Patel, M. C. (2014). Cause of phytoextracts on development of tomato fruit rot and effect on spore germination caused by *Alternaria tomato* (Cooke) G. F. Weber causing fruit rot of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rasayan J. Chem.*, 7 (3), 252–255. Recuperado de http://rasayanjournal.co.in/vol-7/issue_3/7_Vol.7_3_20252-255_20202014_20RJC-1140.pdf

Sandoval, C. (2004). Manejo integrado de Enfermedades en cultivos hidropónicos. Recuperado de <http://dspace.atalca.cl/bitstream/1950/2931/1/Sandoval.pdf>

- Schulz, B., Römmert, A., Dammann, U., Aust, H., & Starck, D. (1999). The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? *Mycological Research*, 103 (10), 1275-1283. doi:10.1017/S0953756299008540
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109 (6), 661–686. doi:10.1017/S095375620500273X
- Schoch, C. L., Sung, G. H., López-Giráldez, F., Townsend, J. P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., . . . Spatafora, J. W. (2009). The Ascomycota tree of life: a phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst. Biol.*, 58 (2), 224-39. doi:10.1093/sysbio/syp020
- Suh, S., & Sugiyama, J. (1993). Phylogeny among the basidiomycetous yeasts inferred from small subunit ribosomal DNA sequence. *Journal of General Microbiology*, 139, 1595-1598. Recuperado de <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/139/7/mic-139-7-1595.pdf?expires=1467083038&id=id&acname=guest&checksum=6C39240878A76617491323AB8916DF02>
- Takaoka, S., Kurata, S., Harimoto, Y., Hatta, R., Yamamoto, M., Akimitsu, K., & Tsuge, T. (2014). Complex regulation of secondary metabolism controlling pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Alternaria alternata*. *New Phytologist*, 202: 1297–1309. doi:10.1111/nph.12754

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipinski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 30 (12), 2725–2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tarbell, T. (2008). Molecular characterization of fungal species from pure cultures and environmental samples. Fordham University. Recuperado de <http://www.biotechniques.org/students/2008/tarbell/paper>.
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., & Sakayaroj, J. (2008). Epoxydons and a Pyrone from the Marine-Derived Fungus *Nigrospora* sp. PSU-F5. *Journal of Natural Products*, 71 (8). doi:10.1021/np8002595
- Trisuwan, K., Rukachaisirikul, V., Sukpondma, Y., Preedanon, S., Phongpaichit, S., & Sakayaroj, J. (2009). Pyrone derivatives from the marine-derived fungus *Nigrospora* sp. PSU-F18. *Phytochemistry*, 70, 554–557. doi:10.1016/j.phytochem.2009.01.008
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., . . . Otani, H. (2012). Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiol Rev*, 37, 44–66. doi:10.1111/j.1574-6976.2012.00350.x
- Unda, F., Agüero, J., Fariñas, M. C., & Martínez-Martínez, L. (2011). Identificación de hongos de importancia clínica mediante técnicas moleculares. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 29 (4), 282–285. doi:10.1016/j.eimc.2010.12.011

USDA. (2016). Natural Resources Conservation Service. Recuperado de <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=PHPE4>

van Wees, S., Chang, H., Zhu, T., & Glazebrook, J. (2003). Characterization of the Early Response of *Arabidopsis* to *Alternaria brassicicola* Infection Using Expression Profiling[w]. *Plant Physiol.*, *132*, 606-617. Recuperado de <http://www.plantphysiol.org/content/132/2/606.full.pdf+html>

Venegas, K., Gutiérrez, P., & Marín, M. (2013). Molecular identification of fungi isolated from bean tissues with anthracnose symptoms. *Acta biol. Colomb.*, *19* (1), 143-154. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v19n2/v19n2a2.pdf>

Vieira, W. A., Nascimento, R. J., & Michereff, S. J. (2013). First Report of Papaya Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. *The American Phytopathological Society*, *97* (12), 1659. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-05-13-0520-PDN>

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>

- Whitson, M., & Manos, P. (2005). Untangling *Physalis* (Solanaceae) from the Physaloids: A Two-Gene Phylogeny of the Physalinae. *Systematic Botany*, 30 (1), 216-230. http://www.jstor.org/sci-hub.io/stable/25064051?seq=1#page_scan_tab_contents
- Wiebe, M. G. (2002). Myco-protein from *Fusarium venenatum*: a well-established product for human consumption. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 421-427. doi:10.1007/s00253-002-0931-x
- Xia, X., Huang, H., She, Z., Shao, C., Liu, F., Cai, X., Vrijmoed, L., & Lin, Y. (2007). H and C NMR assignments for five anthraquinones from the mangrove endophytic fungus *Halorosellinia* sp. (No. 1403). *Magn. Reson. Chem.*, 45, 1006-1009. doi:10.1002/mrc.2078
- Yang, Z., & Bielawski, J. P. (2000). Statistical methods for detecting molecular adaptation. *TREE*, 15 (12). Recuperado de <http://abacus.gene.ucl.ac.uk/ziheng/pdf/2000YangBielawskiTREEv15p496.pdf>
- Yoo, J., & Eom, A. (2012). Molecular Identification of Endophytic Fungi Isolated from Needle Leaves of Conifers in Bohyeon Mountain, Korea. *Mycobiology*, 40 (4), 231-235. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.4.231>
- Zapata, J., Saldarriaga, A., Londoño, M., & Díaz, C. (2005). Las enfermedades limitantes en cultivo y poscosecha de la uchuva y su control. En G. Fischer, D. Miranda, W. Piedrahíta, y J. Romero (Eds.), *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (Physalis peruviana L.) en Colombia*. (1ª Ed., pp. 99-103). Recuperado de

https://www.researchgate.net/publication/258052317_Avances_en_cultivo_poscosecha_y_exportacin_de_la_uchuva_%28Physalis_peruviana_L.%29_en_Colombia

Zheng, H. H., & Wu, X. H. (2013). First report of *Alternaria* blight of potato caused by *Alternaria tenuissima* in China. *The American Phytopathological Society*, 97 (9), 1246. Recuperado de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-08-12-0763-PDN>

Zhou¹, Q., Zhong¹, J., Hu¹, Y., & Gao, B. (2015). A novel nonsegmented double-stranded RNA mycovirus identified in the phytopathogenic fungus *Nigrospora oryzae* shows similarity to partitivirus-like viruses. *Arch Virol*. 161 (1), 229-232. doi:10.1007/s00705-015-2644-3

ANEXOS

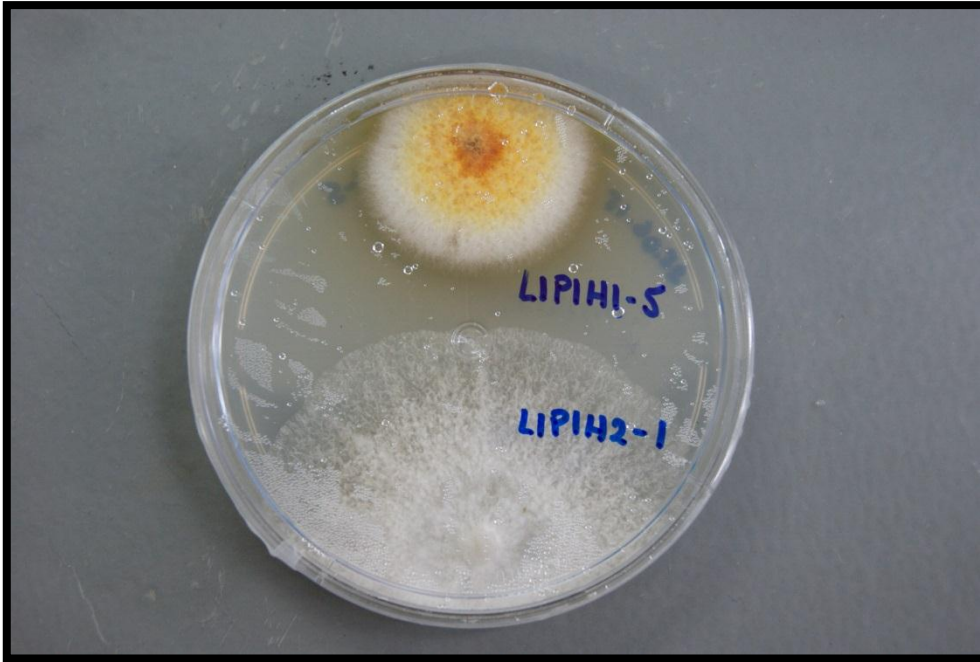
Anexo 1. Planta de uvilla (*Physalis peruviana* L.) de la Localidad 1 (La Merced).



Anexo 2. Toma de muestras en diferentes en las diferentes localidades.



Anexo 3. Hongos microscópicos aislados y purificados en cajas con medio PDA en el laboratorio.



Anexo 4.

Concentraciones de ADN de las especies de hongos identificados medidos por el equipo *Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation*.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank	Concentración de ADN (ng/μl)
L1P1H4-3	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1	2,94
L1P2H1-1	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1	2,9
L1P2H1-6	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP699720.1	6,76
L1P3H3-1 ^a	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1	0,584
L1P3H3-5	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP985749.1	0,688
L1P7H4-4	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP699720.1	21,2
L1P8H1-3	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP699721.1	0,436
L4P3H1-1	100	100	<i>Alternaria alternata</i>	KP174670.1	1,436
L1P2H1-4	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	JX454533.1	0,674
L1P3H3-1	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	KM246282.1	11,5
L1P6H1-1	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	KM246282.1	0,24
L1P7H2-2	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1	4,54
L2P2H5-2	100	99	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1	1,502
L4P1H4-2	100	99	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1	0,694
L4P2H3-4	100	100	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1	0,418
L5P3H1-2	100	99	<i>Alternaria arborescens</i>	JQ936187.1	0,274
L1P2H4-1	100	99	<i>Alternaria brassicicola</i>	KF542557.1	2,82
L4P2H3-3	100	99	<i>Alternaria brassicicola</i>	KF542557.1	0,448
L1P2H1-7	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1	62,6
L1P3H2-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1	2,26
L1P3H2-4	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1	2,98
L1P3H2-5	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1	23
L1P3H2-6	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1	5,52
L1P3H3-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1	30
L1P3H4-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (1)	KR094438.1	0,23
L1P1H1-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	2,98
L1P2H2-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	1,102
L1P2H3-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	13

(Continúa)

Anexo 4. (Continuación)

Concentraciones de ADN de las especies de hongos identificados medidos por el equipo *Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation*.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank	Concentración de ADN (ng/μl)
L1P4H2-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	0,576
L1P4H2-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	1,106
L1P7H2-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	4,22
L1P7H3-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	64,8
L1P7H3-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	1,258
L1P7H3-4	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	1,602
L1P7H4-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	6,4
L1P7H4-6	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	51,8
L1P7H4-7	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	0,982
L1P7H5-4	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	2,2
L1P7H5-6	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	0,322
L1P8H2-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	1,174
L2P2H3-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	3,36
L2P2H5-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	1,608
L4P1H1-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	5,56
L4P1H6-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	0,876
L4P1H6-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	0,304
L4P2H3-2	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	0,228
L5P4H2-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (2)	KM215624.1	0,326
L1P4H3-1	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (3)	KJ527009.1	10,14
L1P4H3-3	100	100	<i>Alternaria</i> sp. (4)	KM215618.1	11
L1P1H1-4	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	4,4
L1P2H3-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	9,04
L1P6H1-3	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	2,32
L1P7H2-1	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	6,24
L1P7H5-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	2,26
L1P8H1-5	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	2,02
L1P8H1-6	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	1,166
L4P1H2-3	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	1,412
L4P1H4-3	100	99	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	0,96
L5P4H1-1	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	0,404
L5P4H1-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	0,552
L5P4H2-2	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	1,652
L5P4H2-3	100	100	<i>Alternaria tenuissima</i>	KP942908.1	0,36
L1P8H2-3	90	90	<i>Alternaria tomato</i>	KP124446.1	2,96
L1P2H1-3	100	100	<i>Bipolaris cynodontis</i>	HF934930.1	5,32

(Continúa)

Anexo 4. (Continuación)

Concentraciones de ADN de las especies de hongos identificados medidos por el equipo *Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation*.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank	Concentración de ADN (ng/μl)
L1P6H1-2	100	100	<i>Bipolaris cynodontis</i>	KJ909767.1	3,04
L4P2H3-5	99	97	<i>Biscogniauxia</i> sp.	JQ327868.1	0,146
L1P1H2-2	99	99	<i>Boeremia exigua</i> var.	EU343168.1	1,3
L1P3H1-1	100	99	<i>Boeremia exigua</i> var.	EU343168.1	9,32
L5P3H1-1	99	100	<i>Cercospora malayensis</i>	KM489070.1	0,402
L4P1H4-4	100	100	<i>Colletotrichum boninense</i>	JX258799.1	0,31
L4P2H2-3	100	99	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	KC790943.1	0,994
L4P2H2-4	100	99	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	KC790943.1	0,87
L5P3H2-2	100	99	<i>Colletotrichum brevisporum</i>	JN050239.1	0,734
L4P2H5-1	100	100	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	KM257026.1	0,244
L4P2H2-2	100	100	<i>Colletotrichum queenslandicum</i>	KJ947308.1	0,322
L1P1H2-1	100	99	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1	10,2
L1P7H2-4	100	99	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1	8,78
L1P7H4-1	100	99	<i>Diaporthe helianthi</i>	JQ936257.1	0,748
L1P2H4-4	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	8,5
L1P3H3-2	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	21,8
L1P7H3-3	99	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	3,02
L2P1H1-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	0,302
L2P2H1-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	3,76
L2P2H1-2	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	12,42
L4P1H3-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	0,314
L4P2H1-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	0,1
L4P2H2-1	100	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	0,414
L4P2H5-2	99	99	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	0,292
L5P3H1-3	100	100	<i>Diaporthe</i> sp.	KC339218.1	0,148
L1P1H1-3	99	99	Dothideales sp	HQ607988.1	3,92
L1P1H1-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1	6,02
L1P1H2-4	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1	6,8
L1P1H2-6	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1	12,38
L1P1H3-2	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	KR094461.1	6,72
L1P3H1-2	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FN868456.1	0,56
L1P3H1-3	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	KR094461.1	3,88

(Continúa)

Anexo 4. (Continuación)

Concentraciones de ADN de las especies de hongos identificados medidos por el equipo *Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation*.

Código	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Especie identificada	No. Genbank	Concentración de ADN (ng/μl)
L1P3H2-1	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FN868456.1	4,5
L1P4H2-1	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1	0,488
L1P4H3-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1	6,32
L1P4H4-1	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FJ424246.1	0,128
L1P6H1-4	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1	4,34
L1P7H4-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FN868456.1	0,502
L1P7H5-5	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	KP132016.1	2,26
L2P2H3-4	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	HQ607859.1	1,94
L4P1H3-2	100	100	<i>Epicoccum nigrum</i>	FJ904828.1	0,95
L1P1H3-3	100	100	<i>Fusarium equiseti</i>	KR094440.1	0,876
L1P3H1-4	100	100	<i>Fusarium equiseti</i>	KR094440.1	2,36
L1P2H1-5	100	100	<i>Fusarium venenatum</i>	KP295496.1	9,78
L1P8H1-4	99	99	<i>Halorosellinia</i> sp.	JF773589.1	0,504
L1P4H2-4	100	100	<i>Nigrospora oryzae</i>	FJ904917.1	5,22
L4P1H1-2	100	99	<i>Nigrospora</i> sp. (1)	JN207335.1	5,3
L4P1H2-2	100	99	<i>Nigrospora</i> sp. (2)	HQ630982.1	0,814
L1P7H4-8	100	100	<i>Penicillium chrysogenum</i>	KM107824.1	49
L1P4H1-3	100	99	<i>Periconia byssoides</i>	KC954157.1	0,886
L4P1H2-1	100	99	<i>Peyronellaea glomerata</i>	AY183371.1	6,52
L4P2H5-5	100	99	<i>Peyronellaea glomerata</i>	AY183371.1	0,288
L5P3H2-3	100	99	<i>Phaeosphaeriopsis</i> sp.	JQ936185.1	0,528
L1P1H4-1	100	99	<i>Phoma</i> sp.	JN207257.1	5,82
L2P2H1-3	100	99	<i>Phoma</i> sp.	JN207257.1	5,7
L1P4H5-1	100	99	Pleosporales sp.	HQ631051.1	4,18
L1P7H4-2	100	100	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	GU045304.1	3,92
L4P1H1-5	100	100	<i>Stemphylium</i> sp.	JX164072.1	3
L4P2H3-6	95	98	<i>Xylaria bambusicola</i>	KF381074.1	0,318
L1P3H3-4	98	99	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098.1	3,2
L1P7H5-3	98	99	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098.1	1,632
L1P8H1-2	97	99	<i>Xylaria multiplex</i>	GU300098.1	0,3
L4P2H3-1	100	98	<i>Xylaria</i> sp. (1)	FJ799949.1	5,02
L3P1H1-1	97	99	<i>Xylaria</i> sp. (2)	EU016102.1	20,2
L5P3H5-1	98	99	<i>Xylaria</i> sp. (3)	AB512404.1	2,26
L1P7H1-1	97	99	<i>Xylaria venosula</i>	EF026149.1	0,894