

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

ESCUELA DE BIOANÁLISIS

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MICROBIÓLOGA**

**Diversidad de hongos asociados a lesiones foliares en naranjilla (*Solanum quitoense*
Lam.) en varias localidades de la Amazonía Ecuatoriana, 2015.**

MARÍA FERNANDA DÁVILA LARA

DIRECTORA: Mtr. Jeniffer Yánez

Quito, 2016

DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo, MARÍA FERNANDA DÁVILA LARA, C.I. 172352423-5, autora del trabajo de graduación intitulado: DIVERSIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A LESIONES FOLIARES EN NARANJILLA (*Solanum quitoense* Lam.) EN VARIAS LOCALIDADES DE LA AMAZONÍA ECUATORIANA, 2015 previa a la obtención del grado académico de MICROBIÓLOGA 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.

MARÍA FERNANDA DÁVILA LARA,

C.I. 172352423-5

DEDICATORIA

“Si realmente amas la naturaleza, encontrarás la belleza en todas partes”

Vincent Van Gogh

A mi familia, especialmente a mis más preciados tesoros **Alicia Lara y Fabiola Galárraga.**

AGRADECIMIENTOS

Mi disertación va dedicada a personas muy especiales, que han estado en cada etapa de mi vida siempre apoyándome, dándome las fuerzas necesarias para salir adelante en todo lo que me he propuesto, tanto para crecer a nivel personal y profesionalmente.

A **Alicia Lara y Fabiola Galárraga**, mis más preciados tesoros, las que con orgullo llamo madres, quienes me han guiado y apoyado en todo este tiempo. Mi claro ejemplo de dedicación y fuerza. Siempre pido a Dios que permanezcan a mi lado, todos los días de mi vida. LES AMO.

A **Anita Lara**, la hermana que Dios puso en mi camino, aquella que siempre ha estado ahí para escucharme y darme los mejores consejos para mi vida.

A **Sebastián Manosalvas**, el compañero perfecto, a usted quién ha estado incondicionalmente en todo momento de mi vida, quien me ha enseñado que los pequeños detalles son los que más valen, quien con su paciencia me acompañó en toda la ejecución de esta disertación. Le amo.

A mi **segunda Familia Manosalvas**, los que siempre me han recibido en su hogar con los brazos abiertos para la realización de esta tesis. Muchas gracias.

A mi directora de disertación, **Mtr. Jeniffer Yáñez**, por darme la oportunidad de llevar acabo esta investigación; además del apoyo y confianza que me ha brindado a lo largo de mi carrera y, especialmente, al trabajar para su proyecto. Al mismo tiempo le agradezco por las correcciones realizadas en esta disertación.

A mis lectores **Diana Astorga y Pablo Palacios**, por la ayuda que me han brindado al realizar las correcciones pertinentes para mejorar este escrito.

A **Rosita Bayas**, por contribuir en la escritura de mi plan de disertación, así como en la toma de muestras, el aislamiento y purificación de hongos, y la parte molecular, dejando de lado parte de sus actividades.

Al **Ingeniero Julio Sánchez**, quien, con mucha cordialidad y paciencia, me aportó con cada uno de sus conocimientos en el tema bioestadística, incluso proporcionándome ideas para que mi disertación tenga un buen soporte.

A **José Luíz Díaz, Adriana Chiriboga, Alejandra Moya y Andrés Espíndola**, por ofrecerme su conocimiento y parte de su tiempo en lo que respecta la realización e interpretación de mi árbol filogenético.

A **Nicole Sotomayor** te agradezco por cuidar de mis hongos cuando no pude estar presente y por ser mi amiga y mi apoyo en toda esta etapa universitaria.

A **María Fernanda Proaño**, por el tiempo que te tomaste en enviarme cada uno de los papers desde Estados Unidos, que en Ecuador no se encontraban disponibles, para que pueda continuar con la escritura de mi disertación.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Páginas preliminares	
DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. OBJETIVOS	4
1.1.1. Objetivo General	4
1.1.2. Objetivos Específicos.....	4
1.2. HIPÓTESIS.....	4
CAPITULO II.....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Naranja (<i>Solanum quitoense</i> Lamark).....	6
2.2.1 Generalidades de la naranja	6
2.2.2 Usos y propiedades medicinales de la naranja.....	7
2.2.3 Plagas del cultivo	8
2.2.3.1 Control de plagas.....	8
2.2.4 Enfermedades del cultivo.....	8
2.2.4.1 Enfermedades causadas por bacterias, virus y nematodos	9
2.2.4.2 Control de enfermedades.....	9
2.2.4.3 Enfermedades causadas por hongos	9
2.2.4.4 Control de enfermedades.....	9

2.3	Generalidades de hongos.....	10
2.3.1	Hongos parásitos.....	11
2.3.2	Hongos saprófitos.....	11
2.3.3	Hongos simbiotes.....	11
2.3.4	Hongos endófitos.....	12
2.4	Identificación de hongos.....	12
2.4.1	Identificación molecular.....	12
2.4.1.1	Espaciadores transcritos internos (ITS).....	13
2.4.1.2	Secuenciamiento.....	14
2.5	Biodiversidad.....	14
2.5.1	Índices de dominancia, diversidad y equidad.....	14
2.5.2	Análisis multidimensional de las comunidades.....	15
2.6	Relaciones Filogenéticas.....	16
2.6.1	<i>Neighbor-Joining</i>	16
CAPITULO III.....		18
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1	Tipo de estudio.....	18
3.2	Recolección de las muestras.....	18
3.3	Procesamiento de las muestras.....	19
3.3.1	Aislamiento de hongos asociados a lesiones foliares.....	19
3.3.2	Purificación de hongos asociados a lesiones foliares.....	20
3.3.3	Identificación molecular de hongos aislados.....	20
3.3.3.1	Extracción de ADN.....	21
3.3.3.2	Amplificación de ADN.....	21
3.3.3.3	Secuenciamiento de ADN e identificación de géneros y especies.....	22
3.3.4	Cálculo y análisis de índices de diversidad.....	22
3.3.5	Análisis filogenético.....	23
CAPÍTULO IV.....		25
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1	Aislamiento de hongos.....	25
4.2	Concentración y pureza de ADN.....	25

4.3	Amplificaciones de las secuencias ITS	26
4.4	Identificación molecular de los hongos obtenidos	26
4.5	Diversidad de hongos asociados a lesiones foliares de naranjilla	36
4.5.1	Distribución de la abundancia de especies y de individuos en las localidades de la región Amazónica.....	38
4.5.2	Distribución de la riqueza de especies y abundancia por localidad muestreada en la región Amazónica	39
4.5.3	Índice de dominancia, diversidad y equidad	42
4.5.4	Análisis de escalamiento multidimensional	43
4.5.5	Análisis <i>Simper</i>	44
4.6	Análisis filogenético de hongos asociados a lesiones foliares de la planta de naranjilla .	46
CONCLUSIONES.....		56
RECOMENDACIONES		58
REFERENCIAS		59
ANEXOS.....		79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Espaciadores internos transcritos.	13
Figura 2. Planta y hoja de naranjilla con lesiones.	18
Figura 3. Proceso de aislamiento de hongos asociados a lesiones foliares. (A) Desinfección de tejidos vegetales con etanol 70%, hipoclorito de sodio 10% y agua estéril. (B) Siembra de segmentos de hojas en medio PDA con antibiótico.....	20
Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Colletotrichum lupini</i> en PDA. (A) Cara superior de la colonia. (B) Cara inferior de la colonia. (C) Observación microscópica de esporas en lente de 40 x.....	20
Figura 5. Porcentaje y procedencia de hongos asociados a lesiones de naranjilla utilizados para secuenciación genómica.	25
Figura 6. Ejemplo de la visualización de los productos de PCR de la región ITS en gel de agarosa al 2,5%.....	26
Figura 7. Riqueza de especies por localidades de la región Amazónica, en términos de presencia de especies frente al total de especies identificadas en el estudio.	38
Figura 8. Abundancia de individuos por localidad de la región Amazónica frente al total de individuos encontrados en el estudio.....	38
Figura 9. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia en la localidad de Cosanga-Napo.	39
Figura 10. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia de la localidad de Loreto-Vía a Orellana.	40
Figura 11. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia de la localidad de Pindo Mirador-Pastaza.	40
Figura 12. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia de la localidad de Jimbiloma-Morona Santiago.	41
Figura 13. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia en la localidad vía a Macas.	41

Figura 14. Análisis multivariado (NMDS) por medio del índice de Bray Curtis de los sitios diferenciados en función de la composición de especies encontradas en cada una de las localidades de la región Amazónica. 44

Figura 15. Estructura completa del árbol filogenético de hongos asociados a lesiones foliares de la naranjilla en varias localidades de la Amazonia Ecuatoriana mediante *Neighbor-Joining*. 49

Figura 16. Árbol filogenético obtenido mediante el método *Neighbor-Joining* para hongos asociados a lesiones foliares de la naranjilla en varias localidades de la Amazonia Ecuatoriana. 50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Producción, rendimiento y superficie del cultivo de naranjilla- nacional. (MAGAP, 2016)</i>	7
Tabla 2. <i>Coordenadas de lugares de muestreo en la región Amazónica.</i>	19
Tabla 3. <i>Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Cosanga-Napo</i>	27
Tabla 4. <i>Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Loreto-vía a Orellana</i>	27
Tabla 5. <i>Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Pindo Mirador-Pastaza</i>	27
Tabla 6. <i>Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Jimbiloma-Morona Santiago</i>	32
Tabla 7. <i>Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en la vía a Macas</i>	33
Tabla 8. <i>Hongos identificados, organizados por localidad y número de géneros y/o especies encontradas, analizados mediante el programa PAST por sitio muestreado</i>	36
Tabla 9. <i>Datos obtenidos mediante el programa PAST.</i>	37
Tabla 10. <i>Análisis Simper de la contribución de las especies o taxa en cada una de las localidades</i>	45

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de hojas y plantas de naranjilla muestreadas.....	79
Anexo 2. Protocolo para extracción de ADN.....	83
Anexo 3. Pureza y concentración de ADN de los 156 aislamientos de hongos obtenidos de lesiones foliares de la naranjilla.....	84
Anexo 4. Géneros y especies obtenidas de 156 aislados de hongos de todas las localidades estudiadas.....	86
Anexo 5. Cuerpos fructíferos. A) Pseudotecio B) Peritecio.....	87
Anexo 6. Ejemplo de la secuencia y cromatograma obtenido del hongo L5N25_Colletotrichum lupini_JQ936134.1.....	88

RESUMEN

La naranjilla o lulo es un cultivo nativo de los Andes, con gran importancia a nivel nacional e internacional por sus propiedades nutritivas y/o por ser una fruta perfecta para la agroindustria. Sin embargo, su producción se ha visto afectada por infecciones causadas por microorganismos fitopatógenos, especialmente por hongos. El presente estudio fue desarrollado para conocer la diversidad de hongos que se encuentran asociados a lesiones foliares de naranjilla de varias localidades de la Amazonía ecuatoriana. Cinco localidades fueron escogidas en las provincias de Napo, Orellana, Pastaza y Morona Santiago. Cuarenta muestras fueron procesadas para obtener 266 hongos aislados, de los cuales 156 fueron identificados molecularmente mediante la secuenciación de la región ITS (Espaciadores Internos Transcritos) del ADN ribosomal. Las secuencias obtenidas fueron comparadas mediante la herramienta BLAST del Banco de Genes del NCBI, consiguiendo porcentajes de similitud y homología del 100%, encontrándose además 29 especies de hongos que actúan en su mayoría como endófitos.

Los índices ecológicos de Shannon, Simpson y Pielou aplicados permitieron establecer que la localidad con mayor índice de diversidad es la de Pindo Mirador- Pastaza. El análisis de las comunidades en forma multidimensional, por medio del índice de Bray Curtis, demostró que la localidad de Pindo Mirador- Pastaza es muy diferente del resto de localidades en cuanto a la composición de especies. Por otro lado, el análisis *Simper* permitió determinar que *Phomopsis* sp., *Diaporthe* sp., *D. citri*, *D. schini*, *Xylaria berteri*, *Colletotrichum boninense*, *C. lupini* y *Neurospora tetrasperma* fueron las especies que más contribuyeron a la diferenciación de cada una de las localidades. Sin embargo, estos resultados se encontraron sesgados por un mayor esfuerzo de muestreo realizado en la localidad de Pindo Mirador- Pastaza.

Finalmente, la topología del árbol filogenético procedente del método *Neighbor-Joining* reveló la formación de tres ramificaciones principales con siete grupos del *phylum* Ascomycota. El árbol fue robusto y significativo al obtener valores superiores o iguales a 70 sobre cada una de las ramas.

ABSTRACT

The *naranjilla* or *lulo* is an Andean fruit of great importance at both national and international levels, because of its nutrient content and its importance for agroindustry. However, *naranjilla*'s production has been affected by infections caused by microbial pathogens, especially microscopic fungi. The present study was developed in order to determine the diversity of fungi associated to *naranjilla*'s foliar injuries in different places of Ecuadorian Amazon. Forty samples were processed to obtain 266 fungi isolates, from these 156 were identified molecularly by the ITS sequence region (Internal Transcribed Spacer) of ribosomal DNA. The resulting sequences were compared using the BLAST tool of the NCBI Genes Bank. Percentages of similarity and homology of 100% were reached with 29 different species, which were mostly endophytic.

The applied ecological indexes of Shannon, Simpson and Pielou, showed that the *Pindo-Mirador* location is more diverse than others in terms of species composition. The multidimensional analysis of the communities with the Bray Curtis index demonstrated that the *Pindo Mirador-Pastaza* location is also significantly different from the rest. On the other hand, the *Simper* analysis showed that the species contributing to differentiation between locations were *Phomopsis* sp., *Diaporthe* sp., *D. citri*, *D. schini*, *Xylaria berteri*, *Colletotrichum boninense*, *C. lupini* and *Neurospora tetrasperma*. However, these results are biased in larger sample size for the *Pindo Mirador- Pastaza* site.

Finally, the topology tree obtained by Neighbor-Joining revealed that fungi isolates belonged to three main branches including six groups of *phylum* Ascomycota. The topology tree branches obtained values of robustness and significance of 70.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Solanum quitoense Lam., conocida comúnmente como naranjilla o lulo, es una fruta nativa de la cordillera de los Andes, principalmente consumida y cultivada en Ecuador, Colombia, Perú y América Central (Acosta, Pérez y Vaillant, 2009; Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias [INIAP], 2011; Revelo et al., 2010). El cultivo de esta fruta tiene alta importancia tanto a nivel nacional como internacional, debido a las propiedades nutritivas tanto de olor como de color que la convierten en una fruta perfecta para la agroindustria, pues permite la elaboración de helados, conservas, mermeladas, bebidas refrescantes, entre otros productos (Acosta et al., 2009; INIAP, 2011). En Ecuador, esta solanácea es cultivada a gran escala en la región Amazónica, en las provincias de Napo, Pastaza y Morona Santiago, y en menor escala en Sucumbíos, Zamora Chinchipe y Orellana (Revelo et al., 2010).

Según datos del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP, 2016), la superficie cosechada del cultivo de naranjilla en el 2015 alcanzó las 3.281 ha con una producción total de 44.360 toneladas métricas y un rendimiento de 13.52 ton.ha⁻¹ a nivel nacional. Sin embargo, esta producción se ve perjudicada por infecciones causadas por microorganismos fitopatógenos, especialmente hongos (Revelo et al., 2010).

En el Ecuador, las pérdidas de cultivos de naranjilla pueden alcanzar hasta un 100%, debido mayormente a infecciones generadas por hongos. Los agricultores llevan a cabo medidas preventivas para reducir y controlar las plagas de naranjilla. Entre éstas se encuentran el uso de fungicidas, las prácticas culturales como podas permanentes y la destrucción de hojas, brotes y frutos infestados que están en el suelo o en la planta, se desinfecta el suelo, no se siembra en sitios encharcados, se realiza rotación de cultivos (INIAP, 2000), y el control biológico, que ha demostrado ser muy efectivo contra enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Lozano, Chamorro, Floriano, Vera y Dimas, 2007; Tipanluisa, 2011).

A nivel de Sudamérica, se ha llevado a cabo la identificación y caracterización morfológica de hongos patógenos que afectan a la naranjilla. En general, entre los principales

patógenos se reportan *Botrytis* sp., *Cladosporium* sp. y *Colletotrichum* spp. (Contreras, 2006; Molina, 2010). En el Ecuador, se han identificado morfológicamente varios hongos que infectan algunas partes de la planta como, por ejemplo, *Fusarium* sp., *C. gloeosporioides*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp., *Septoria solanicola*, *Botrytis cinerea*, *Gloesporium* sp., *Cladosporium* sp. y *Cercospora* sp. (Angulo, 2006; IICA, 2011; INIAP, 2000; Solagro, 2006, Quinchia y Cabrera, 2006; Revelo et al., 2010).

En Ecuador se han realizado estudios sobre la diversidad de hongos endófitos típicos, aislados de lesiones necróticas de tallos, vainas y hojas de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), encontrando *Fusarium* sp., *Epicoccum nigrum*, *Alternaria tenuissima* y *Boeremia telephii*, los mismos que tienen interés biotecnológico (Cornejo, 2014). Delgado, Vázquez e Icaza (2009) evaluaron la actividad antagónica de hongos endófitos como *Fusarium*, *Alternaria*, *Nigrospora*, *Coelomycetes* y *Phoma*, aislados en plantas medicinales de chuquiragua y ñachag. Tanto en el país como en otros países productores de naranjilla, no se han encontrado estudios moleculares ni de diversidad disponibles a la fecha.

El amplio y complejo reino Fungi permite encontrar hongos dentro de la naturaleza como saprófitos, parásitos, simbioses y endófitos, que colaboran en una serie de procesos dentro del agroecosistema y que, al ser manejados apropiadamente, son de beneficio e importancia para los agricultores, la ecología y la biotecnología (Alexopoulos et al., 1996; Arauz, 1998; Durán, Mora y Ramírez, 1998; González-Espinosa, Ramírez-Marcial y Ruiz-Montoya, 2005; Villalba, 2005). Sin embargo, se debe recordar que también pueden acarrear problemas para humanos, animales y plantas al actuar como parásitos de los mismos. En el mundo existe un aproximado de 1.5 millones de especies de hongos de los cuales tan solo 69.000 han sido descritos. Por éste el motivo, no se ha logrado tener un conocimiento completo y exacto sobre su identidad y distribución (Alexopoulos et al., 1996; González-Espinosa, Ramírez-Marcial & Ruiz-Montoya, 2005).

Para solucionar este conflicto, la ecología ofrece diversas formas de cuantificación de la diversidad de especies de un ecosistema, basados especialmente en índices de diversidad. Se trata de expresiones matemáticas que relacionan tanto la riqueza como la uniformidad de especies. Por tanto, los índices que se aplicaron para esta investigación fueron los índices de Shannon, Simpson y Pielou, por ser los más utilizados (Colwell, 2009; Gliessman, 2002; Magurran, 2004).

Para dar un mayor sustento al estudio, se aplicó el análisis de las comunidades en forma multidimensional con el índice de Bray Curtis y el análisis *Simper* (comunicación personal Sánchez, 2 de febrero de 2016). Estos análisis permitieron establecer el porcentaje de contribución de las especies y las diferencias en cada una de las localidades monitoreadas, de acuerdo a la composición de especies encontradas (Guerrero y Ramírez, 2012; Halffter, Soberón, Koleff y Melic, 2005; Hernández y Suquideros, 2008; Herrera, 2000; Linares, 2001; Mutschke y Montiel, 2010; Ríos, Badii, Landeros y Cerna, 2008).

Para el análisis filogenético, se empleó el método de *Neighbor-Joining* (NJ), el más rápido y eficaz en la obtención de un árbol con la topología correcta y con el menor número de mutaciones. Además, es aplicable a cualquier tipo de distancia evolutiva, facilitando la interpretación de las ramas del árbol final (Peña, 2011; Pérez, 2012; Saitou y Nei, 1987).

La importancia de estudiar la diversidad de estos microorganismos radica en que se podrá aprovechar del conocimiento de cada una de las aplicaciones biotecnológicas en las que pueden ser utilizados. En este caso particular, en donde se busca optimizar la producción de naranjilla a nivel nacional, estas investigaciones permiten identificar especies de hongos patógenos u oportunistas lo que conlleva a tomar medidas preventivas y un mejor control enfocado a la eliminación de los mismos, logrando satisfacer las presentes y futuras demandas alimenticias del país.

Sin embargo, el inconveniente que se presenta es que, los estudios de diversidad biológica no han sido muy considerados, ya sea por el gran tamaño y complejidad del grupo o también por la falta de personal. Esto lleva a un serio problema, debido a que si no se realiza este tipo de estudios algunas especies importantes pueden estar pasando desapercibidas (González-Espinosa et al., 2005). Otra desventaja que surge al estudiar la diversidad de hongos es que, al momento de identificarlos morfológicamente, muchas veces hay ausencia de estructuras reproductivas. Por tanto, la identificación molecular se hace indispensable. Es por esto que, mediante el análisis de espaciadores transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés), incluido el gen ribosomal 5.8S, se puede lograr una identificación molecular de hongos (Lacap, Hyde y Liew, 2003). El ITS comprende dos regiones, ITS-1 e ITS-2, del ADN ribosomal no codificante.

Esta región se caracteriza por presentar zonas conservadas y variables, convirtiéndose en el marcador ideal para la identificación de especies y estudios

filogenéticos (Joshi, Souframanien, Chand y Pawar, 2006). De esta manera, con los resultados obtenidos de la presente investigación se podrán conocer los diferentes géneros y especies de hongos que actualmente se encuentran asociados a las hojas de naranjilla.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo General

Determinar la diversidad de hongos asociados a manchas foliares en naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en varias localidades de la Amazonía Ecuatoriana.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Aislar y purificar hongos microscópicos asociados a lesiones foliares en la naranjilla.
- Identificar molecularmente las especies de hongos mediante la secuenciación de la región ITS del ADN ribosomal.
- Determinar la diversidad mediante los índices de Simpson y Shannon.
- Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies de hongos identificados, mediante el algoritmo *Neighbor-Joining* (NJ).

1.2. HIPÓTESIS

Existe diversidad de hongos asociados a manchas foliares en naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en varias localidades de la Amazonía Ecuatoriana.

CAPITULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

La naranjilla se puede cultivar en zonas tropicales, llegando a producir frutos durante todo el año, lo que permite optimizar tiempo, espacio y generar utilidad a la agroindustria. Ecuador y Colombia son los países con mayor producción de naranjilla, ya que se ha conseguido importancia comercial al introducirse en los mercados nacionales e internacionales (Granados, Torrenegra, Acevedo y Romero, 2013; IICA, 2007; Rojas, Muñoz, Terán, Prado y Quiñónez, 2010). Sin embargo, el cultivo de naranjilla se ve amenazado por la presencia de plagas y enfermedades, especialmente provocadas por hongos, que limitan su producción (Revelo et al., 2010).

En Colombia se evaluó la presencia de patógenos en algunos clones de naranjilla, encontrando a *Phytophthora infestans*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum* sp. y *Cladosporium* sp. como los hongos más limitantes, que ocasionaron algunas enfermedades en este cultivo (Rojas et al., 2010). Asimismo, se enfatizó en la caracterización microbiológica de los aislados obtenidos de *Colletotrichum* sp. y en la realización de pruebas de patogenicidad que permitieran proponer estrategias que reduzcan y mejoren la productividad frutícola del país (Contreras, 2006).

En cuanto al estudio de hongos asociados a lesiones, se puede mencionar trabajos realizados en México con eucalipto, en donde se llevó a cabo la identificación morfológica y caracterización molecular de la región ITS, mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En lesiones foliares se encontraron *Chaetomella*, *Penicillium*, *Botrytis*, *Pestalotiopsis* y *Alternaria* (Pérez-Vera, Yáñez-Morales, Alvarado-Rosales, Cibrián-Tovar y García-Díaz, 2005). Por otro lado, en España se llevó a cabo una investigación en hongos asociados a gramíneas silvestres de pastos naturales, donde se identificó una diversidad de hongos como *Fusarium culmorum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Cochliobolus* spp., *Drechslera* spp., *Colletotrichum falcatum*, *Leptosphaerulina* spp., *Ustilago cynodontis*, *Epichloe baconii* y patógenos de insectos como *Cordyceps* spp., *Metarrhizium anisopliae* y *Verticillium lecanii*, especies productoras de micotoxinas y antimicrobianos (Sánchez, Bills, García y Zabalgoageazcoa, 2004).

En lo que respecta a estudios de diversidad de hongos, se puede señalar trabajos realizados con hongos endofíticos y rizosféricos en el suroeste de China, con el propósito de investigar los beneficios que otorgan las plantas que crecen en ecosistemas geotérmicos (Zhou et al., 2015). Para esta investigación se aislaron un total de 1.589 hongos, de los cuales los géneros más dominantes fueron *Curvularia*, *Acrophialophora*, *Penicillium* y *Aspergillus*. Posteriormente, se realizó un análisis filogenético, determinando que los hongos endofíticos poseen una estrecha relación con los hongos rizosféricos. No obstante, se determinó que algunos de estos hongos poseen un patrón de distribución, que depende de las condiciones ambientales y de las especies de plantas que se encuentren en el hábitat (Zhou et al., 2015).

Por otro lado, en diversos hábitats naturales de China, se llevó a cabo un estudio sobre la biodiversidad, distribución ecológica y la actividad antimicrobiana de hongos endófitos presentes en ginseng (*Angelica sinensis*) (Jiang et al., 2013). En donde los géneros más dominantes fueron *Gongromella*, *Coniosporieae*, *Fusella*, *Myxormia*, *Ozonium*, *Pestalotia*, *Phacodium* y *Sphaceloma*. Este estudio permitió conocer que cada una de las especies aisladas son específicas del lugar, tejido y época. A su vez, cada uno de ellas son potenciales agentes microbianos que ayudan al crecimiento y resistencia de la planta, cumpliendo con el pasar de los tiempos una importante función biológica en el ecosistema (Jiang et al., 2013).

2.2 Naranjilla (*Solanum quitoense* Lamark)

2.2.1 Generalidades de la naranjilla

La naranjilla o lulo (nombre común en Colombia), pertenece a la familia Solanaceae, el género *Solanum* y la especie *quitoense* Lamark (INIAP, 1993). Este cultivo nativo de los Andes se encuentra en tierras altas entre 1.500-2.800 m.s.n.m. (León, 2000), distribuido entre Colombia, Ecuador, Perú y los países de América Central. Esta planta fue domesticada por los españoles al llegar al continente americano (Acosta et al., 2009, INIAP, 2011; Revelo et al., 2010).

Según datos del MAGAP (2016), la superficie cosechada del cultivo de naranjilla en el 2015 alcanzó las 3.281 hectáreas (ha), con una producción total de 44.360 toneladas métricas (t) y un rendimiento de 13,52 t.ha⁻¹ a nivel nacional (Tabla 1).

Tabla 1.*Producción, rendimiento y superficie del cultivo de naranjilla- nacional.*

Año	Producción (t)	Rendimiento (t.ha ⁻¹)	Superficie (ha)
2012	47,101	14,00	3,364
2013	49,580	14,00	3,541
2014	52,189	15,00	3,479
2015	44,360	13,52	3,281
PROMEDIO	48,307	14,13	3,417

Nota: Recuperado de Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca (MAGAP), 2016.

La naranjilla es un arbusto con una altura de 1 a 2 metros, con tallos cilíndricos muy ramificados, duros y lisos, que en algunas ocasiones pueden presentar espinas. Las hojas son muy grandes y ovaladas, con bordes sinuosos y marcados. Cuando las hojas son jóvenes presentan un color morado y poseen pelos que se encuentran en los bordes y nervios en el lado inferior de la hoja. Sus flores pueden estar solas o agrupadas y su fruto es globoso con numerosas semillas, recubierto por una cáscara dura anaranjada (León, 2000).

Por otro lado, las condiciones ambientales y edáficas que recomiendan Revelo et al. (2010) para desarrollar y producir este cultivo corresponden especialmente a zonas con clima tropical y subtropical húmedo, con una textura de suelo franco, franco-arcillosa y franco-arenosa. Es también recomendable tomar en cuenta la profundidad de siembra de la planta (mayor a 60 cm aproximadamente), que tenga buen drenaje y sobretodo buen contenido de materia orgánica.

El tiempo de producción de la naranjilla es corto debido a que la cosecha es de 6 a 8 meses después del transplante. Además, su mayor producción es desde el primer año de edad y puede durar hasta tres años (INIAP, 2012).

2.2.2 Usos y propiedades medicinales de la naranjilla

La gran importancia comercial de este cultivo se debe a que esta fruta posee un sabor exquisito, la pulpa de color verde intenso se equilibra con un amarillo anaranjado, y, lo más importante, el alto contenido de proteínas, vitaminas, azúcares, aceites esenciales, ácido cítrico, ácido tartárico y sales minerales. Esta noble fruta permite la elaboración de diversos productos alimenticios como: helados, jugos frescos, pulpa congelada, conservas, mermeladas, pasteles, salsas, almíbares, cocteles, entre otros productos (Angulo, 2006; INIAP, 2011).

Este fruto tiene un gran contenido de vitamina C, que refuerza el sistema inmunológico. Su consumo ayuda a la prevención de enfermedades como la anemia y al desarrollo de enfermedades respiratorias; ayuda a la cicatrización de heridas, al desarrollo de huesos, dientes, encías y cartílagos; y previene el envejecimiento prematuro (Revelo et al., 2010). El alto contenido de fósforo y vitamina A ayuda a cuidar la visión, previene la hipertensión, y alivia las enfermedades nerviosas. Incluso se lo recomienda a quienes sufren de insomnio (Revelo et al., 2010). Al mismo tiempo, se ha establecido que la naranjilla tiene propiedades diuréticas, ayuda al organismo a eliminar toxinas, y reduce la acumulación de ácido úrico en la sangre, por lo que esta fruta es recomendada para quienes padecen de gota (Angulo, 2006).

2.2.3 Plagas del cultivo

Entre los principales insectos que afectan a la naranjilla se encuentran el gusano del fruto (*Neoleucinodes elegantalis*), el perforador del cuello (*Faustinus apicalis*), el barrenador del tallo y ramas (*Alcidion* sp.), los pulgones o áfidos de las hojas (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Myzus ornato*), el escarabajo o picudo de flores y frutos (*Anthonomus* sp.) y el escarabajo del follaje (*Epilachna flavofasciata*) (INIAP, 2000; Revelo et al, 2010).

2.2.3.1 Control de plagas

En el cultivo de naranjilla se recomienda realizar prácticas culturales, podas permanentes, desmalezado a tiempo, destrucción de hojas, brotes y frutos infestados que están en el suelo o en la planta, como parte de la estrategia para el control de plagas (INIAP, 2000; Revelo et al, 2010). Entre los insecticidas utilizados como medida de control están Abamectina, Alfacipermetrina, Acefato, Carbaryl, Dimetoato, Diazinón, Malathion, Pyrinox, entre otros (Revelo et al, 2010). Como control biológico se recomienda la liberación de parasitoides de *Trichogramma* sp. o la aplicación de *Bacillus thuringiensis*, *Metarhizium* sp., *Lecanicillium* sp. y *Beauveria bassiana* (Lozano et al., 2007).

2.2.4 Enfermedades del cultivo

El cultivo de naranjilla es muy susceptible al ataque de diversos organismos patogénicos durante todo el ciclo vegetativo. Las principales enfermedades pueden ser causadas por bacterias, virus, nematodos y hongos (IICA, 2007; Quinchia y Cabrera, 2006).

2.2.4.1 Enfermedades causadas por bacterias, virus y nematodos

Las enfermedades ocasionadas por bacterias, virus y nematodos afectan al tallo, al follaje y al sistema radicular de la naranjilla. Dentro de los principales microorganismos que causan problemas en este cultivo se encuentran las bacterias como *Ralstonia solanacearum* y *Erwinia* sp.; el virus del mosaico rugoso y el virus del amarillamiento intervenal; y los nematodos como *Meloidogyne incógnita*, *Meloidogyne javanica* y *Meloidogyne arenaria* (INIAP, 2000; Quinchia y Cabrera, 2006; Revelo et al, 2010).

2.2.4.2 Control de enfermedades

Para la prevención y el control de enfermedades producidas por bacterias, virus y nematodos se recomiendan las prácticas culturales como podas permanentes, quema y eliminación de toda la planta u órgano infectado, desinfección del suelo y las estacas que se utilicen, no sembrar en sitios encharcados y programar rotación de cultivos (Lozano et al., 2007; INIAP, 2000). Además, para virus se recomienda usar plantas sanas, controlar insectos vectores, destruir plantas enfermas y evitar intercalar con cultivos como tomate de árbol, tomate riñón o pimiento (Revelo et al, 2010). Para el control químico de nematodos se aplica Bioway (INIAP, 2000). *Paecilomyces lilacinus* es aplicado como controlador biológico (Lozano et al., 2007).

2.2.4.3 Enfermedades causadas por hongos

Las enfermedades que se desarrollan en la naranjilla afectan al tallo, frutos y hojas. Los principales patógenos que atacan a este cultivo son *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Phoma* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Phytophthora* sp. *Alternaria* sp., *Septoria solanicola*, *Cladosporium* sp, *Botrytis* sp. y *Cercospora* sp. (INIAP, 2000; Quinchia y Cabrera, 2006; Revelo et al., 2010; Rogg, 2000; Solagro, 2006).

2.2.4.4 Control de enfermedades

En el cultivo de naranjilla se recomienda realizar prácticas culturales, podas permanentes y la destrucción de hojas, brotes y frutos infestados que están en el suelo o en la planta, como parte de la estrategia para el control de enfermedades. Conjuntamente, como una medida preventiva, se debe desinfectar el suelo y las estacas que se utilicen, no realizar

siembras en sitios encharcados, llevar a cabo una rotación de cultivos y de plaguicidas. Entre los fungicidas usados como medidas de control, se menciona a Amistar, Daconil, Score, Bayleton, Curathane, Fitoalexin, Phyton, Ridomil Gold y Rodax (Revelo et al, 2010). En particular, para el control de enfermedades foliares, se lleva a cabo la aplicación de productos a base de cobre, así como también de sustancias curativas como fosfonato potásico, Metalaxil, Difenconazon, Triadimefon y Azoxistrobina (INIAP, 2011). Como control biológico, *Trichoderma* sp. y *Gliocladium* sp. han demostrado ser muy efectivos contra enfermedades causadas por hongos como *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora infestans* y *Sclerotinia sclerotiorum* (García et al., 2007; Tipanluisa, 2011). Por otro lado, nuevas tecnologías enfocadas en la resistencia genética de nuevas variedades de naranjilla se están desarrollando, para mejorar la producción, rentabilidad, calidad e inocuidad (Miranda, 2012).

Sin embargo, el problema a enfrentar actualmente es la afectación de las perspectivas económicas, pues la falta de información para la nutrición adecuada del cultivo de naranjilla se suma a su alta susceptibilidad al ataque de plagas y enfermedades, además de problemas fitosanitarios (Guayasamín, 2015; Valverde, Espinosa y Bastidas, 2010).

2.3 Generalidades de hongos

Los hongos son organismos eucariotas, carentes de flagelos, cilios y clorofila. Se diseminan y se reproducen mediante esporas sexuales o asexuales. Su pared celular está compuesta por celulosa, quitina o, en algunos casos, por ambos componentes. Poseen una estructura vegetativa llamada micelio. Este, a su vez, está compuesto por hifas, que pueden ser ramificadas o filamentosas y, al mismo tiempo, septadas o cenocíticas (Alexopoulos et al., 1996; Arauz, 1998; Quiroga y Peniche, 1992). Los hongos constituyen un grupo polifilético, es decir, que no provienen del mismo tronco evolutivo y se encuentran ampliamente distribuidos en una gran variedad de nichos ecológicos (Alexopoulos et al., 1996; Alexopoulos, Mims y Blackwell, 1996).

Los hongos forman un grupo muy extenso de organismos que actúan como saprófitos, parásitos, simbioses y endófitos (Arauz, 1998; Durán, Mora y Ramírez, 1998; Villalba, 2005). Se estima que existe un millón y medio de especies de hongos, de los cuales 72.000 han sido descritas hasta el momento (Ruiz, 2013). Por tal motivo, los hongos constituyen un elemento fundamental dentro de la biodiversidad mundial, ya que controlan

procesos esenciales a nivel industrial y dentro del ecosistema. Las funciones que cumplen son de degradación, depredación, participación en el ciclo de carbono y nutrientes, son fuente de alimento tanto para humanos como para animales, forman interacciones con otros seres vivos, y hasta actúan como patógenos. No obstante, su función se verá alterada según el entorno donde se encuentren (Peay, Kennedy y Bruns, 2008). Cuando son fitopatógenos afectan a distintas partes del tejido vegetal, dependiendo del huésped y del tiempo en el que actúe, provocando en el proceso clorosis, necrosis o lesiones foliares. Estas pueden presentarse de diferentes formas, ya sea asociadas a los bordes, puntas o incluso pueden cubrir o rodear las nervaduras de las hojas (Arauz, 1998; Durán, Mora & Ramírez, 1998; Villalba, 2005).

2.3.1 Hongos parásitos

Estos hongos se caracterizan por causar enfermedades en otros organismos, ocasionando en algunos casos la muerte del huésped. Los hongos parásitos obtienen los nutrientes a partir de otros seres vivos. Son causantes de graves daños biológicos y económicos (Quiroga y Peniche, 1992).

2.3.2 Hongos saprófitos

Se considera un grupo importante, debido a que se encuentran en todos los hábitats terrestres y son los principales recicladores del planeta. Cumplen una función ecológica distinguida, ya que obtienen sus nutrientes y energía de una gran variedad de compuestos orgánicos en descomposición y recirculan los nutrientes dentro del ecosistema. Estos hongos pueden llegar a ser parásitos en el caso de que un árbol muera por otras causas (Elevitch, 2004; El Magno, 2009; Oliver y Schweizer, 1999).

2.3.3 Hongos simbiotes

Las micorrizas se consideran hongos simbiotes al formar una asociación benéfica con otros seres vivos como las plantas. Son indispensables para la movilización de los nutrientes, ya que absorben el nitrógeno inorgánico y el fósforo del suelo, mientras que la planta brinda protección y es su fuente de carbono. Dentro de éste grupo también se encuentran los líquenes (Quiroga y Peniche, 1992; Varma y Kharkwal, 2009).

2.3.4 Hongos endófitos

Se considera endófitos a aquellos hongos que se encuentran habitando los tejidos de plantas, creciendo dentro de las raíces, tallos y hasta en hojas, sin causar perjuicio o daño aparente a las plantas. Sin embargo, si el tejido vegetal comienza a debilitarse o a morirse, éstos hongos pueden convertirse en patógenos latentes de las mismas plantas en las que residen, causándoles síntomas notables (Gamboa-Gaitán, 2006; Sánchez-Fernández et al., 2013; Turrialba, 2006). Las plantas comúnmente albergan a hongos endófitos, los mismos que han sido identificados como potenciales productores de metabolitos (Rehman et al., 2008).

2.4 Identificación de hongos

Para una apropiada identificación de hongos, Garzón (2013) recomienda el manejo de métodos morfológicos y moleculares como una perfecta combinación. El método morfológico es la identificación tradicional y se fundamenta en el aislamiento de los microorganismos en un medio de cultivo para la posterior caracterización de aspectos macroscópicos (color, tamaño y forma del micelio) como microscópicos (morfología y tamaño de la espora) (Suaad, 2013). La técnica es laboriosa, requiere de mucho tiempo y de experiencia para poder diferenciar y reconocer adecuadamente a las especies, razón por la que se opta por la identificación molecular como una técnica altamente sensible y específica (Larena y Melgarejo, 2009), además de ser una metodología precisa, objetiva y rápida en la que se puede procesar un gran número de muestras al mismo tiempo (Riveros et al., 2001).

2.4.1 Identificación molecular

Para el estudio y descripción más precisa de hongos microscópicos a nivel de géneros y especies es necesario llevar a cabo una identificación molecular. Existe una amplia variedad de métodos moleculares que se caracterizan por ser más rápidos, sensibles y específicos que los tradicionales, los mismos que pueden ser llevados a cabo e interpretados fácilmente. Las técnicas moleculares ayudan a distinguir a organismos que se encuentran muy relacionados en diversos niveles taxonómicos. Las técnicas más utilizadas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) y la secuenciación (Capote, Pastrana, Aguado y Sánchez-Torres, 2012).

La PCR amplifica millones de copias de secuencias de ADN específicas, a partir de una o varias copias de un fragmento de ADN, incluso si la fuente de ADN extraída es de mala calidad. La amplificación del ADN se ejecuta a través de ciclos de denaturación, alineación y extensión a diferentes temperaturas, utilizando primers específicos, dNTPs, Taq polimerasa termoestable, cloruro de magnesio (MgCl₂), agua y un buffer adecuado. Para poder observar los fragmentos de ADN amplificados, se lleva a cabo una electroforesis en gel de agarosa y se coloca una molécula intercalante. Con el tiempo, esta técnica se popularizó por ser rápida, barata y sencilla de realizar (Capote et al., 2012; Mohini y Deshpande, 2010).

2.4.1.1 Espaciadores transcritos internos (ITS)

La identificación molecular exitosa de hongos consiste en la amplificación por PCR de los espaciadores transcritos internos o también denominado región ITS. (Capote et al., 2012; Scoch et al., 2012). La región ITS es una parte del complejo de genes ribosomales (RNAr). La región ITS-1 se ubica entre los genes ribosomales 18S y 5.8S, mientras que la región ITS-2 se ubica entre los genes ribosomales 5.8S y 28S (Figura 1) (Scoch et al, 2012).

Esta región es un marcador genético versátil que se caracteriza por ser ubicuo en la naturaleza y por estar presente en todos los eucariotas. Su alto número de copias de genes de ARNr permite que se obtenga una amplificación con una alta sensibilidad. Debido al gran número de secuencias que se encuentran disponibles en las bases de datos, se puede realizar una validación con una alta confiabilidad en los ensayos de detección que se realicen. La región ITS permite la generación y diseño de *primers* que se encuentran alternados con zonas altamente variables y conservadas, permitiendo que se dé una discriminación por medio de una amplia gama de niveles taxonómicos. Además, la región ITS ha sido utilizada para análisis filogenéticos, en pruebas diagnósticas y en la evaluación de procesos evolutivos (Capote et al., 2012; Puerta, 2007).

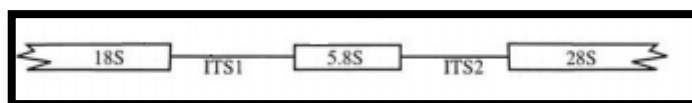


Figura 1. Espaciadores internos transcritos.

2.4.1.2 Secuenciamiento

La secuenciación es un método útil en la determinación de secuencias de ADN que produce información genómica significativa (Reguero, 2014). La identificación de hongos microscópicos por medio de la secuenciación se ha desarrollado debido a un incremento en el número de las secuencias y genes de hongos seleccionados en las bases de datos. Se recomienda realizar la amplificación por PCR con *primers* universales, seguidas por una secuenciación y una comparación en bases de datos que se encuentren disponibles, para obtener la especie determinada (Capote et al., 2012).

2.5 Biodiversidad

Definida como la variabilidad y variedad de vida en la Tierra, que envuelve a todas las poblaciones, especies y organismos, la variación genética existente entre éstos y los conjuntos de complejos de comunidades y ecosistemas en los que forman parte de los diferentes procesos en donde se encuentran presentes (Olalde y Aguilera, 1998; Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, 2010).

El papel que cumple la biodiversidad es fundamental para el adecuado funcionamiento de los ecosistemas. Sin embargo, hoy en día la biodiversidad se ve afectada por factores ocasionados por el cambio climático, la sobreexplotación, cambios en el uso del suelo, la contaminación y las especies invasoras, que producen pérdida de hábitats y cambios en los ecosistemas (Selliers, 2010).

2.5.1 Índices de dominancia, diversidad y equidad

Los índices ecológicos son funciones matemáticas empleadas para estudios de diversidad, debido a que sirven para estimar la cantidad y la distribución de especies, para realizar una comparación biológica de un conjunto de organismos colectados en diferentes localidades (Colwell, 2009; Moreno, 2001). Entre los más utilizados se encuentran el Índice de Simpson, el Índice de Shannon y el Índice de Pielou (Colwell, 2009; Magurran, 2004).

El índice de Simpson es una de las medidas de diversidad más significativas. Se lo conoce por la dominancia de especies con mayor representatividad y permite medir la riqueza de organismos existentes (Fernández, 2008; Gliessman, 2002; Magurran, 2004;

Orellana, 2009; Ramírez, 2005). Este índice se calcula a partir de la fórmula ($D = \sum ni (ni - 1) / (N(N - 1))$), donde ni es el número de individuos de la i -ésima especie y N es el total de individuos (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001; Magurran, 2004). De modo que, mientras el valor D más tiende a 1, menor es la diversidad (Sánchez, 2011).

Por otro lado, el índice de Shannon-Wiener es el más utilizado en la literatura ecológica y se basa en la probabilidad de hallar un determinado individuo en un ecosistema. Examina la riqueza o cantidad de especies que se encuentran en el área de estudio y la abundancia o cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001; Heip, Herman y Soetaert, 1998; Orellana, 2009). Este índice se calcula a partir de la fórmula ($H' = - \sum pi \ln pi$), donde H' representa el índice de Shannon, \sum es la sumatoria de todas las especies, pi se refiere a la abundancia proporcional o relativa de las i -ésimas especies, que es igual a (n/N) , donde n es el número de especies en un área en particular y N el total de individuos de todas las especies y \ln es el logaritmo base “e” (Cruz-Reyes y Camargo-Camargo, 2001; Magurran, 2004; Somarriba, 1999;).

El índice de equidad de Pielou, también llamado uniformidad de Shannon, mide la proporción de la diversidad observada en cada sitio en relación a la máxima diversidad esperada, estableciendo que todas las especies son igualmente abundantes. Este índice va a proporcionar valores entre 0 y 1, para poder establecer que todas las especies son igualmente abundantes y así determinar una equidad en las especies encontradas en cada localidad (comunicación personal Sánchez, 2 de febrero de 2016). Pielou se calcula en base a la fórmula ($J' = H' / H' \text{ max}$), donde H' representa al índice de Shannon-Wiener. $H' \text{ max}$ es el índice de Shannon máximo que corresponde al logaritmo del número total de especies ($\ln(S)$) (Fernández, 2008; Magurran, 2004; Reyes y Torres-Florez, 2009).

2.5.2 Análisis multidimensional de las comunidades

El escalamiento multidimensional (NMDS) es una técnica multivariante, que se encarga de representar datos por medio de una construcción de puntos que exhibe una disimilitud, permitiendo conocer las interrelaciones existentes en un conjunto de objetos (Guerrero y Ramírez, 2012; Linares, 2001).

Actualmente, el índice de Bray Curtis es una medida que se maneja ampliamente en la ecología. Este índice determina la diferencia entre datos de abundancia de cada especie

encontrada en una comunidad. De modo que, todas las especies ya sean abundantes o inusuales, tendrán la misma importancia dentro de dicha comunidad. El rango descrito para esta medida va de 0 (similar) a 1 (diferente) (Badii, Landeros y Cerna, 2008; Halffter, Soberón, Koleff y Melic, 2005; Hernández y Suquideros, 2008; Herrera, 2000). Para esta medida se aplica el siguiente cálculo ($B = n \sum (X_{ij} - X_{jk}) / n \sum (X_{ij} + X_{jk})$), donde B es la medida de Bray-Curtis, X_{ij} X_{jk} son el número de individuos (aislados en cada muestra) j y k; y n es el número de especies en las muestras (Krebs, 1999). Asimismo, en este análisis es importante determinar el *stress*, el cual mide la representación de los datos en el gráfico obtenido por medio del escalamiento multidimensional. Donde el 20% es establecido como pobre, el 10 % es equitativo, el 5% es bueno, el 2½% es excelente y el 0% o cero *stress* es perfecto (Kruskal, 1964).

El análisis *Simper* determina la contribución que tienen las especies o taxas en cuanto a la similitud o disimilitud entre las agrupaciones de muestras (Ríos, Mutschke, & Montiel, 2010).

2.6 Relaciones Filogenéticas

Mediante las relaciones filogenéticas se contribuye en gran medida al conocimiento, comprensión y descubrimiento de los orígenes y relaciones evolutivas entre los microorganismos, en este caso de los hongos (Alexopoulos et al., 1996; Hibbett y Donoghue, 1998). Estas relaciones se representan por medio de un cladograma o árbol que muestra la genealogía o, en otras palabras, las relaciones ancestro-descendientes (López y Pérez, 1999). Para el análisis filogenético existen varios métodos como son *Neighbor-Joining*, máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana (Peña, 2011).

2.6.1 Neighbor-Joining

Para la construcción del árbol se utilizará el programa Geneious, desarrollado para garantizar trabajos de investigaciones orientados a la bioinformática mediante el uso de la tecnología (Kearse et al., 2012). El *Neighbor-Joining* (NJ) es un método de distancia desarrollado por Saito y Nei en 1987, y funciona como un código de barras molecular cuyo fundamento es la identificación de individuos de especie desconocida. Éste método es muy utilizado para la reconstrucción filogenética por agrupamiento de secuencias (vecinos) que tengan menor distancia genética. El objetivo es explicar la filogenia final al involucrar el

menor número de mutaciones en la menor longitud de ramas del árbol, siendo muy eficiente para grandes grupos de datos y por consumir poco espacio informático (Peña, 2011; Pérez, 2012). El método de NJ no debe ser utilizado para establecer las relaciones filogenéticas, debido a que no toma en cuenta la relación ancestro-descendiente ni la descendencia por modificación. Esta técnica es recomendada para reflejar el grado de similitud que poseen las secuencias, en donde los individuos que pertenecen a una misma especie establecerán grupos aislados por su alto nivel de igualdad (Peña, 2011).

Para dar un soporte estadístico a las ramas del árbol filogenético generado por NJ, se utiliza el método *Bootstrap*. Se trata de una técnica de evaluación de remuestreo de datos, que resuelve problemas relacionados con la prueba de significación estadística o la estimación de intervalos de confianza, estableciendo si se ha recuperado la filogenia adecuada (Baxevanis y Oullette, 2001; Ledesma, 2008). Así mismo, se utilizará el modelo de Jukes-Cantor que establece qué tan distantes son los taxones unos de otros, desarrollando una representación exitosa (Prasetya, Saefuddin y Muladno, 2011).

CAPITULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de estudio

El presente estudio es de tipo descriptivo y formó parte del proyecto denominado “Colección e inventario de hongos microscópicos que causan enfermedad en cultivos de importancia comercial (fitopatógenos) de la región oriental del Ecuador”, código L13299, financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador en el año 2015.

3.2 Recolección de las muestras

Un total de 40 hojas para todas las localidades estudiadas de la Amazonía fueron muestreadas de manera aleatoria simple de acuerdo con la disponibilidad de plantas que presentaban lesiones en las hojas de los cultivos de naranjilla (este sesgo fue debido a que el proyecto rector pedía la recolección de hojas con sintomatología asociada al ataque de hongos) (Figura 2) (ver Anexo 1). Las hojas fueron cortadas de la planta con tijeras podadoras e inmediatamente colocadas en fundas Ziploc®, etiquetadas con la fecha, localidad y georeferenciadas con coordenadas métricas aplicando el Sistema de Coordenadas Universal Transversal de Mercator (UTM, por sus siglas en inglés).



Figura 2. Planta y hoja de naranjilla con lesiones.

El muestreo se llevó a cabo en el mes de mayo del 2015 y las muestras fueron transportadas en *coolers* con hielo a los laboratorios de la Escuela de Bioanálisis de la PUCE para su procesamiento inmediato. El lugar de muestreo, la georeferenciación de estos sitios y el número de muestras tomadas se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2.

Coordenadas de lugares de muestreo en la región Amazónica.

Lugar de muestreo	Coordenadas				Número de muestras
	X	Y	WGS	Zona	
Cosanga-Napo	180769	9936090			4
Loreto-Vía a Orellana	193238	9920938			5
Pindo Mirador-Pastaza	823164	9837285	84	18- Sur	20
Jimbiloma-Morona Santiago	816346	9750501			6
Vía a Macas	814626	9750261			5

Nota: WGS= Sistema Geodésico Mundial

3.3 Procesamiento de las muestras

3.3.1 Aislamiento de hongos asociados a lesiones foliares

Para el aislamiento de los hongos de las hojas de los cultivos de naranjilla, se realizó el procedimiento utilizado por Crous, Verkley, Groenewald y Samson (2010); Lizarraga, Panta y Dodds (1989) y Pelaez y Jimenéz (2001), que se detalla a continuación:

Se cortaron segmentos de 1 cm² de partes de la hoja lesionada. Los cortes fueron desinfectados con etanol al 70% por un minuto, seguido de cinco minutos en hipoclorito de sodio al 10%. Estos cortes se lavaron en agua estéril tres veces antes de realizar la siembra en platos de Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) con el antibiótico cloranfenicol y se las incubó a temperatura ambiente (20- 27°C) (Figura 3).

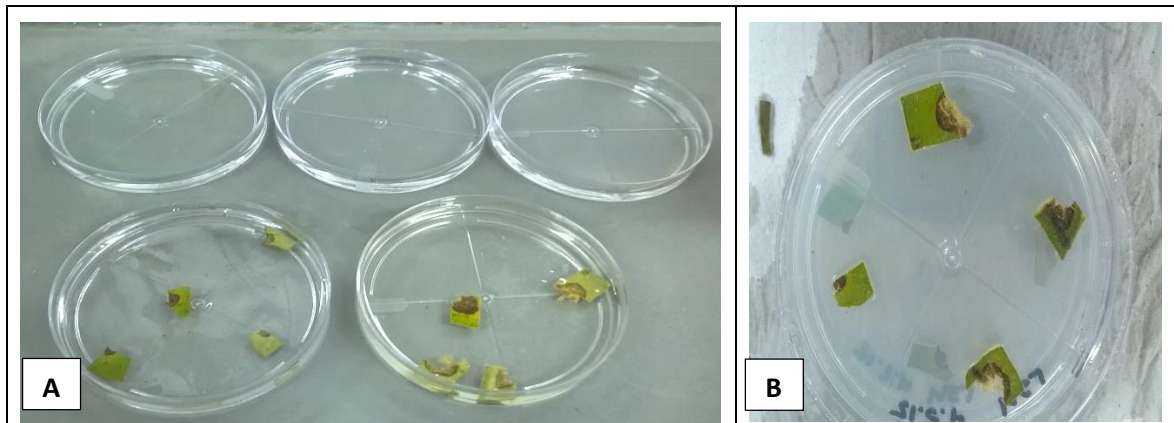


Figura 3. Proceso de aislamiento de hongos asociados a lesiones foliares. (A) Desinfección de tejidos vegetales con etanol 70%, hipoclorito de sodio 10% y agua estéril. (B) Siembra de segmentos de hojas en medio PDA con antibiótico.

3.3.2 Purificación de hongos asociados a lesiones foliares

El crecimiento de los hongos fue revisado diariamente. Una vez evidenciado el crecimiento fúngico, se realizaron pases a un nuevo medio de cultivo PDA para obtener un cultivo puro (García y Camargo, 1998) (Figura 4A y B). Asimismo, con la ayuda de cinta adhesiva, una coloración simple con azul de metileno y un microscopio óptico con un aumento de 40 x, se logra la caracterización microscópica del hongo purificado (Figura 4C) (López-Jácome et al., 2014).

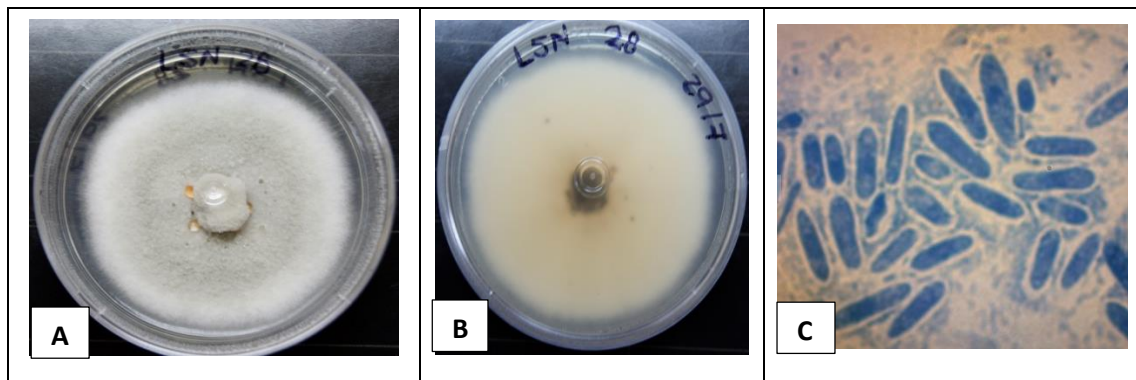


Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de *Colletotrichum lupini* en PDA. (A) Cara superior de la colonia. (B) Cara inferior de la colonia. (C) Observación microscópica de esporas en lente de 40 x.

3.3.3 Identificación molecular de hongos aislados

Este proceso consiste en la extracción de ADN y su amplificación mediante PCR. Se realizó en el laboratorio de Ecología y Genética de la Escuela de Ciencias Biológicas de la PUCE.

3.3.3.1 Extracción de ADN

Una vez purificados los hongos asociados a lesiones foliares en la naranjilla, se procedió a la extracción del ADN fúngico total, para lo cual se usó el kit de *Wizard® Genomic DNA Purification* de Promega (ver anexo 2). Es muy importante obtener un ADN de buena calidad y concentración para conseguir una validez en los resultados (Saltos, 2012). Los valores de pureza del ADN deben oscilar entre 1.8-2 (Puerta y Ureña, 2005).

3.3.3.2 Amplificación de ADN

La PCR se usó para la amplificación de un fragmento de alrededor 500 pb de la región ITS que comprende ITS1, el gen 5.8S y el ITS2 del ADN ribosomal. Para la amplificación del ITS se utilizaron los *primers* universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') diseñados por White, Bruns, Lee y Taylor (1990). Para la reacción de PCR se utilizó la mezcla *GoTaq® Green Master Mix* (Promega, 2012). El volumen final de reacción fue de 25 μ l, el mismo que contenía 22 μ l de *GoTaq® Green Master Mix*, 0,5 μ l de cada *primer* (10 mM) y 2 μ l de ADN fúngico a una concentración de alrededor 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$. Para la amplificación, las condiciones del termociclador fueron las mismas reportadas por White et al. (1990) con pocas modificaciones. Las condiciones que se establecieron fueron las siguientes: un ciclo de denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 30 segundos, una hibridación a 55°C por 30 segundos y una extensión a 72°C por 30 segundos y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR fueron visualizados mediante una corrida electroforética en gel de agarosa al 2,5%, previamente teñido con 3 μ l *SYBR® SAFE* utilizando luz UV. En cada pocillo del gel se colocó 3 μ l de los amplicones obtenidos, un control positivo que consistió en ADN fúngico, un control negativo que contenía *Master mix* sin ADN y 1,5 μ l del *ladder* (marcador de peso molecular) de 100 pares de bases.

Los productos de PCR obtenidos fueron purificados en la empresa Macrogen de Seúl-Corea del Sur.

3.3.3.3 Secuenciamiento de ADN e identificación de géneros y especies

Los productos de PCR fueron secuenciados en la empresa Macrogen de Seúl-Corea del Sur. Con las secuencias obtenidas se efectuó una edición, limpieza y alineamiento en el programa MEGA 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski y Kumar, 2013). Para el alineamiento de las dos secuencias, *forward* y *reverse*, y obtener la secuencia consenso, se utilizó el software *Clustal W* implementado en el programa MEGA 6. Una vez obtenida la secuencia consenso de cada muestra, se realizó una búsqueda mediante la herramienta BLAST para las identificaciones de géneros y especies de hongos asociados a lesiones foliares en naranjilla. La herramienta BLAST realizó comparaciones entre las secuencias obtenidas con secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). BLAST obtuvo un diagrama de resultados en base al porcentaje de cobertura, al valor E y al porcentaje de identidad. El porcentaje de cobertura es conocido por conseguir secuencias en la base de datos con las mismas longitudes de las secuencias introducidas y obtenidas en el estudio. El valor E es un valor estadístico que establece que, a medida que se acerca más a cero, las identidades de las secuencias obtenidas en el estudio tienen similitud con las que se han encontrado en la base de datos, y el porcentaje de identidad determina cuán idénticos son los pares de bases de las secuencias del estudio con las encontradas en la base de datos (NCBI, 2006).

3.3.4 Cálculo y análisis de índices de diversidad

La matriz de datos de los índices de diversidad de Simpson, Shannon y Pielou modificado (Colwell, 2009; Magurran, 2004; Marcial et al., 2012; Moreno, 2001) fueron procesados mediante el *software* estadístico *PAST*, desarrollado por Hammer, Harper y Ryan (2001), con el propósito de obtener algunos estadísticos para su análisis como: la diversidad o riqueza de especies (número de taxa por localidad), la abundancia o individuos (número de aislados de cada taxa por localidad), el índice de dominancia (D) que permite conocer si existe homogeneidad en la distribución de los taxa dentro de cada localidad o si alguno o algunos de los taxa domina sobre los demás, respecto de su abundancia. Este índice varía de 0 a 1, toma el valor de uno si todos los individuos (aislados) pertenecen a un solo taxa y cero si todos los taxa tienen igual proporción de aislados, puesto que D es igual a la suma de cuadrados de las proporciones de cada taxa.

Por otro lado, el índice de diversidad de Simpson, que no es más que 1-D (dominancia), manifiesta que si la dominancia es 1 no habrá diversidad, y si por el contrario, la dominancia es cero este índice será igual a 1 que es la máxima diversidad, tomada como índice. El índice de diversidad de Shannon-Wiener (H) mismo que se debe utilizar cuando la distribución de los taxa es homogénea, es decir, cuando la dominancia tiende a cero. Este índice varía de 0 a $\ln S$ (logaritmo natural del número de especies o taxa). Para conseguir que el índice de Shannon varíe de 0 a 1 se realiza la transformación de Pielou modificado. Esta transformación se lleva a cabo cuando se quiere comparar índices de diversidad con variaciones de 0 a 1. Normalmente el índice de Simpson se utiliza cuando existe inequidad en la distribución de los taxa, mientras que el de Shannon (Pielou modificado) en condiciones de equidad, dada por la dominancia.

La medida de similitud o disimilitud de las localidades estudiadas fue demostrada a través de un gráfico con puntos obtenidos del análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS, por sus siglas en inglés). De acuerdo a Sánchez (comunicación personal, 2 de febrero de 2016), el análisis de similitud o disimilitud mediante el índice de distancia de Bray Curtis permitirá determinar qué tan diferentes son las localidades monitoreadas de acuerdo a la composición de especies encontradas.

Además, el porcentaje de contribución que tienen las especies o taxa en cuanto a la similitud o disimilitud entre las agrupaciones de muestras, se calculó con el análisis *Simper* (Ríos, Mutschke, & Montiel, 2010). Según Sánchez (comunicación personal, 2 de febrero de 2016), este análisis permitirá establecer cuáles son las especies que están contribuyendo mayormente a diferenciar las localidades monitoreadas. Los datos de frecuencias obtenidos de la diversidad de hongos asociados a lesiones foliares en la naranjilla fueron presentados mediante histogramas y pasteles realizados en MSEXcel.

3.3.5 Análisis filogenético

Para el análisis filogenético, todas las secuencias consenso que fueron identificadas como especies de hongos se alinearon utilizando el programa *Geneious* (Kearse et al., 2012). El método *Neighbor-Joining* se utilizó para agrupar las secuencias similares y poder conformar un árbol con la topología correcta y con el menor número de mutaciones (Peña, 2011). Como grupo externo se utilizó a la secuencia de *Phytium sylvaticum* con número de

acceso AB46877 en el NCBI, debido a que no se relaciona con el *phylum* Ascomycota y es considerado un pseudohongo patógeno de plantas del *phylum* Oomycota (Ho, 2009).

Además, para dar un sustento al análisis filogenético, se obtuvieron secuencias reportadas en el *Genebank* (NCBI) de cada una de las 29 especies aisladas e identificadas en este estudio. El soporte estadístico se evaluó utilizando el análisis *bootstrap* con 1000 repeticiones.

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento de hongos

Se lograron aislar 266 hongos asociados a lesiones de las 40 muestras obtenidas en total de hojas de naranjilla. No obstante, se utilizaron 156 aislados, puesto que los restantes tuvieron problemas de contaminación cruzada con *Aspergillus* sp. Otros no cumplieron con el rango de concentración y pureza de ADN mínimos deseados para la secuenciación genómica.

De los 156 aislamientos de hongos obtenidos en la región Amazónica, 7 pertenecen a la localidad de Cosanga en la provincia de Napo, 4 a Loreto en la vía a Orellana, 120 a Pindo Mirador en la provincia de Pastaza, 14 a Jimbiloma en Morona Santiago y 11 a la vía a Macas (Figura 5).

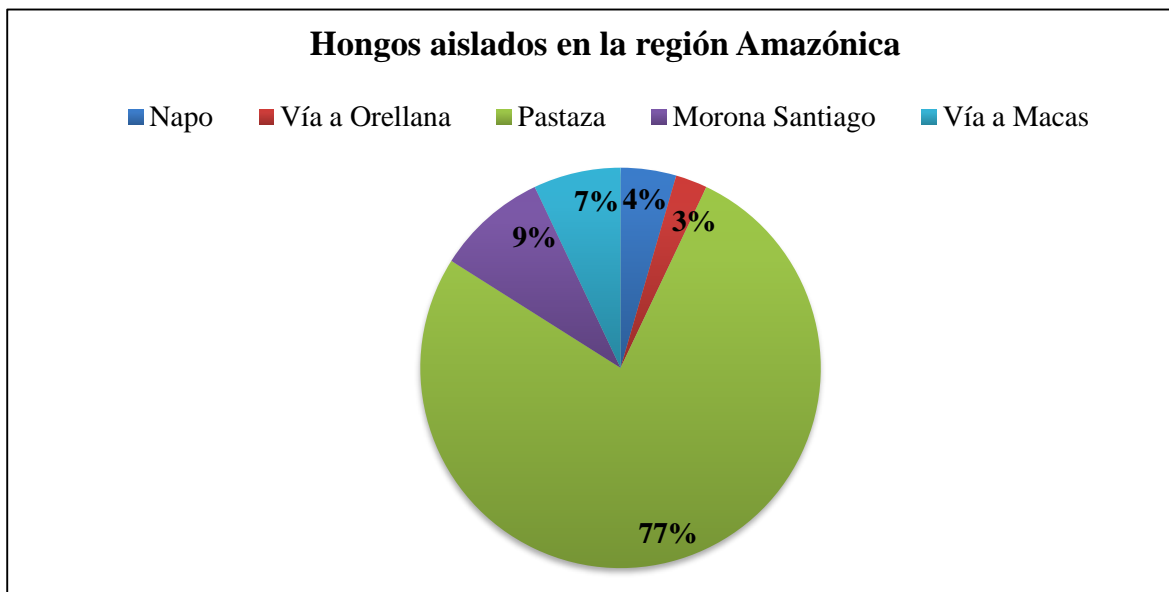


Figura 5. Porcentaje y procedencia de hongos asociados a lesiones de naranjilla utilizados para secuenciación genómica.

4.2 Concentración y pureza de ADN

La concentración de ADN obtenida en este trabajo osciló entre 1 hasta 182,5 ng.µl⁻¹, mientras que la pureza obtenida fue de 1,05 a 4,63 (ver Anexo 3). Las concentraciones que se encontraron por debajo de 50 ng.µl⁻¹, fueron utilizadas directamente para la amplificación; y las concentraciones mayores fueron diluidas con agua libre de nucleasas para alcanzar la

concentración deseada. Por otro lado, se presume que los valores bajos de pureza de ADN pueden corresponder a muestras contaminadas con proteínas y los valores altos por contaminación con fenol (Rada y Taboada, 1998). No obstante, las concentraciones fueron suficientes para que el ADN pueda ser amplificado y la PCR se realizó sin problemas.

4.3 Amplificaciones de las secuencias ITS

La reacción de PCR fue eficaz y la utilización de los *primers* ITS-1 e ITS-4 permitieron la amplificación de ADN de la región ITS de los 156 aislados fúngicos. Los productos de PCR se visualizan en la Figura 6, donde se observan fragmentos entre 500 y 650 pares de bases. El carril 5 corresponde al *ladder* (marcador de peso molecular), los carriles 6 y 7 presentan las muestras amplificadas correctamente, los carriles 8 y 9 corresponden al control positivo y negativo, respectivamente. Las muestras de los carriles 1, 2, 3 y 4 no fueron amplificadas.

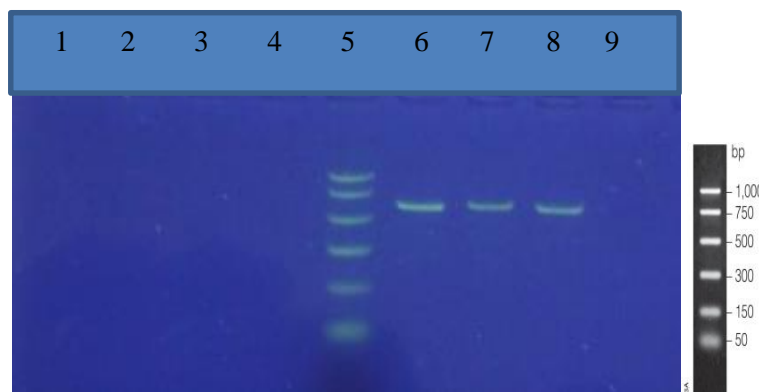


Figura 6. Ejemplo de la visualización de los productos de PCR de la región ITS en gel de agarosa al 2,5%.

4.4 Identificación molecular de los hongos obtenidos

En base a los análisis de similitud y homología de los 156 aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla se identificó un total de 29 hongos a nivel de género y especie en todas las localidades estudiadas (ver Anexo 4).

Los porcentajes de cobertura e identidad de todos los aislados indicados en las Tablas 3, 4, 5, 6 y 7 fueron del 100%, lo cual asegura la identificación apropiada de cada uno de los hongos en cuanto a longitud e identidad de pares de bases de las secuencias analizadas con las proporcionadas en la base de datos del NCBI. Por otro lado, el valor E obtenido de todos

los aislados fue de 0.0, lo que garantiza un alineamiento efectivo entre las secuencias obtenidas en el estudio con las secuencias de las bases de datos del NCBI.

Tabla 3.

Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Cosanga-Napo.

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L2N1	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L2N2	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L2N3	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L2N5	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX010292.1
L2N9	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX010292.1
L2N10	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1

Tabla 4.

Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Loreto-vía a Orellana.

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L3N1	<i>Diaporthe sp.</i>	100%	0.0	100%	FJ799938.1
L3N11	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936295.1
L3N13	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L3N14	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1

Tabla 5.

Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Pindo Mirador-Pastaza.

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L5N2	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX258799.1
L5N4	<i>Colletotrichum sp.</i>	100%	0.0	100%	KC512139.1
L5N6	<i>Colletotrichum nicotianae</i>	100%	0.0	100%	HG798903.1
L5N7	<i>Nigrospora sp.</i>	100%	0.0	100%	JN207356.1
L5N8	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	NR_111861.1
L5N10	<i>Diaporthe sp.</i>	100%	0.0	100%	KC343203.1
L5N11	<i>Diaporthe sp.</i>	100%	0.0	100%	KC343203.1

Tabla 5.

.../... Continuación

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L5N12	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L5N16	<i>Colletotrichum karstii</i>	100%	0.0	100%	KJ813594.1
L5N17	<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	100%	0.0	100%	NR_120138.1
L5N18	<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	100%	0.0	100%	NR_120138.1
L5N21	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936295.1
L5N22	<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	100%	0.0	100%	NR_120138.1
L5N24	<i>Diaporthe melonis</i>	100%	0.0	100%	NR_103700.1
L5N25	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JQ936134.1
L5N27	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936295.1
L5N28	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JN943454.1
L5N29	<i>Colletotrichum</i> sp.	100%	0.0	100%	KC512139.1
L5N32	<i>Diaporthe</i> sp.	100%	0.0	100%	FJ799941.1
L5N33	<i>Colletotrichum karstii</i>	100%	0.0	100%	KJ813594.1
L5N34	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX010292.1
L5N36	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX010292.1
L5N37	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	100%	0.0	100%	KP182395.1
L5N38	<i>Colletotrichum karstii</i>	100%	0.0	100%	KJ813594.1
L5N39	<i>Diaporthe melonis</i>	100%	0.0	100%	KP182391.1
L5N40	<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	100%	0.0	100%	NR_111862.1
L5N41	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	EU002915.1
L5N42	<i>Nigrospora oryzae</i>	100%	0.0	100%	HQ608152.1
L5N44	<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	100%	0.0	100%	EU167573.1

Tabla 5.

.../... Continuación

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L5N45	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N46	<i>Phomopsis asparagi</i>	100%	0.0	100%	JQ614002.1
L5N47	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N48	<i>Neurospora</i> sp.	100%	0.0	100%	JN207303.1
L5N49	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	KP133344.1
L5N50	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX436792.1
L5N53	<i>Colletotrichum fructicola</i>	100%	0.0	100%	KR056303.1
L5N54	<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	100%	0.0	100%	NR_120138.1
L5N56	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JQ936134.1
L5N58	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	KP133344.1
L5N60	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	0.0	100%	KR995116.1
L5N62	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153051.1
L5N63	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L5N67	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N71	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N72	<i>Diaporthe</i> sp.	100%	0.0	100%	JX436799.1
L5N73	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	100%	0.0	100%	KM979859.1
L5N74	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JN943454.1
L5N75	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N76	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N77	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L5N78	<i>Colletotrichum acutatum</i>	100%	0.0	100%	KT215297.1
L5N79	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	EU002915.1

Tabla 5.

.../... Continuación

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L5N80	<i>Colletotrichum</i> sp.	100%	0.0	100%	KC512139.1
L5N84	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N85	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N87	<i>Phomopsis asparagi</i>	100%	0.0	100%	KR812246.1
L5N88	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936295.1
L5N89	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N90	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX436792.1
L5N91	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153055.1
L5N92	<i>Phomopsis asparagi</i>	100%	0.0	100%	KR812246.1
L5N94	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N95	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936295.1
L5N97	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JQ936134.1
L5N99	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	100%	0.0	100%	JQ936148.1
L5N101	<i>Nemania diffusa</i>	100%	0.0	100%	AB625422.1
L5N102	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	EU002915.1
L5N104	<i>Phomopsis asparagi</i>	100%	0.0	100%	KR812246.1
L5N105	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	KP133344.1
L5N106	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	AF102999.1
L5N108	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N110	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JN943454.1
L5N113	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	0.0	100%	KR995118.1
L5N114	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%	AJ301907.1
L5N115	<i>Diaporthe</i> sp.	100%	0.0	100%	FJ799938.1
L5N117	<i>Colletotrichum acutatum</i>	100%	0.0	100%	KT215297.1

Tabla 5.

.../... Continuación

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L5N118	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JN943454.1
L5N119	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153055.1
L5N120	<i>Colletotrichum acutatum</i>	100%	0.0	100%	KT215297.1
L5N122	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N126	<i>Diaporthe melonis</i>	100%	0.0	100%	NR_103700.1
L5N127	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N128	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N130	<i>Nigrospora oryzae</i>	100%	0.0	100%	EU272488.1
L5N131	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N133	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N134	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N135	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N136	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	100%	0.0	100%	AF001020.2
L5N137	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%	AJ301907.1
L5N138	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N139	<i>Epicoccum sorghinum</i>	100%	0.0	100%	KM507776.1
L5N140	<i>Colletotrichum kahawae</i> subsp. <i>ciggaro</i>	100%	0.0	100%	NR_120138.1
L5N142	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N143	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	100%	0.0	100%	JF430489.1
L5N144	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	GU324749.1
L5N145	<i>Nigrospora oryzae</i>	100%	0.0	100%	EU272488.1
L5N146	<i>Phomopsis asparagi</i>	100%	0.0	100%	KR812246.1
L5N147	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L5N148	<i>Trichoderma asperellum</i>	100%	0.0	100%	KF815050.1
L5N150	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N151	<i>Diaporthe melonis</i>	100%	0.0	100%	NR_103700.1

Tabla 5.

.../... Continuación

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a Genbank
L5N152	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX010292.1
L5N153	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX436792.1
L5N154	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%	JX258722.1
L5N155	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JQ936134.1
L5N157	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX258799.1
L5N158	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JN943454.1
L5N159	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	DQ480356.1
L5N161	<i>Colletotrichum nicotianae</i>	100%	0.0	100%	HG798903.1
L5N162	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	100%	0.0	100%	KM979794.1
L5N163	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N165	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L5N171	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	KM979820.1
L5N172	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L5N174	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L5N176	<i>Xylaria</i> sp.	100%	0.0	100%	KP689111.1
L5N177	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936295.1
L5N181	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936295.1
L5N182	<i>Diaporthe paranensis</i>	100%	0.0	100%	NR_111857.1
L5N185	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	EU002915.1

Tabla 66.

Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en Jimbiloma- Morona Santiago.

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a GenBank
L6N3	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153067.1
L6N5	<i>Diaporthe schini</i>	100%	0.0	100%	KR812222.1
L6N7	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L6N8	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153051.1
L6N10	<i>Phomopsis asparagi</i>	100%	0.0	100%	KR812246.1
L6N16	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153051.1

Tabla 6.

.../... Continuación

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a GenBank
L6N17	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153051.1
L6N20	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%	JX258761.1
L6N21	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L6N22	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L6N23	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L6N25	<i>Neurospora tetrasperma</i>	100%	0.0	100%	AY681194.1
L6N26	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	JN153051.1
L6N28	<i>Diaporthe terebinthifolii</i>	100%	0.0	100%	NR_111862.1

Tabla 7.

Hongos aislados de lesiones foliares de la planta de naranjilla en la vía a Macas.

Código del aislado	Hongo identificado	Porcentaje de Cobertura	Valor E	Porcentaje de identidad	Acceso a GenBank
L7N25	<i>Diaporthe citri</i>	100%	0.0	100%	KC343051.1
L7N27	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	100%	0.0	100%	JX258761.1
L7N28	<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	100%	0.0	100%	EU343168.1
L7N33	<i>Xylaria</i> sp.	100%	0.0	100%	JQ341069.1
L7N35	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	DQ872669.1
L7N36	<i>Xylaria berteri</i>	100%	0.0	100%	JQ936294.1
L7N37	<i>Colletotrichum lupini</i>	100%	0.0	100%	JN943454.1
L7N38	<i>Colletotrichum boninense</i>	100%	0.0	100%	JX436792.1
L7N39	<i>Xylaria</i> sp.	100%	0.0	100%	JQ341069.1
L7N40	<i>Diaporthe</i> sp.	100%	0.0	100%	FJ799938.1
L7N41	<i>Phomopsis</i> sp.	100%	0.0	100%	DQ872669.1

Según investigaciones llevadas a cabo, en el Ecuador se identificaron solo morfológicamente hongos que atacan a la naranjilla como *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides*, *Phoma* sp., *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp.,

Sclerotinia sclerotiorum, *Septoria solanicola*, *Botrytis cinerea*, *Gloesporium* sp., *Cladosporium* sp. y *Cercospora* sp. (Angulo, 2006; IICA, 2011; INIAP, 2000; Miranda, 2012; Quinchia y Cabrera, 2006; Revelo et al., 2010; Solagro, 2006; Tipanluisa, 2011).

Los 29 hongos identificados a nivel de especie corresponden al *phylum Ascomycota*, de los cuales son citados en la web por primera vez en el país: *Colletotrichum* sp., *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. kahawae* subsp. *ciggaro*, *C. lupini*, *C. nicotianae*, *Diaporthe* sp., *D. citri*, *D. melonis*, *D. schini*, *D. paranensis*, *D. phaseolorum*, *D. terebinthifolii*, *Epicoccum sorghinum*, *Nemania diffusa*, *Neurospora* sp., *N. tetrasperma*, *Nigrospora* sp., *N. oryzae*, *Phomopsis* sp., *P. asparagi*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Trichoderma asperellum*, *Xylaria* sp. y *X. berteri*.

Los hongos identificados como *Colletotrichum* sp. y *Phoma exigua* var. *exigua* son los únicos que concuerdan con las identificaciones morfológicas anteriormente realizadas en el Ecuador de hongos fitopatógenos asociados a la planta de naranjilla (INIAP, 2000; Miranda, 2012; Tipanluisa, 2011).

Los hongos fitopatógenos del género *Colletotricum* sp. se caracterizan por causar graves enfermedades en las plantas. Sin embargo, son considerados también como endófitos al estar en plantas sanas o como saprófitos, por encontrarse en material vegetal en descomposición (Photita, Taylor, Ford, Hyde y Lumyong, 2005). Por otro lado, *Phoma exigua* var. *exigua* se caracteriza por ser un fitopatógeno oportunista con una amplia gama de huéspedes (Evidente, Andolfi y Cimmino, 2011). Asimismo, varias especies de *Phoma* han sido consideradas como agentes micoherbicidas para el control biológico de malezas, al producir metabolitos con propiedades antibacterianas y antimicóticas (Álvarez et al., 2005; Evidente et al., 2011).

Las especies de *Diaporthe* y *Phomopsis* identificados en este estudio son reportados en la literatura como fitopatógenas, endófitas o saprófitas, se encuentran en un amplio rango de hospederos y ampliamente distribuidos (Gomes et al., 2013; Wang et al., 2013). Las especies reconocidas como hongos endófitos, además de ser reconocidas por producir enzimas de interés, antibióticos o anticancerígenos como metabolitos secundarios, pueden actuar como bioherbicidas y antagonistas (Gomes et al., 2013; Prada et al., 2009).

Las especies del género *Epicoccum* son consideradas como saprófitas dentro de la naturaleza, así como colonizadoras de plantas que permanecen como endófitas en ellas (Nighat et al., 2016). Además, son importantes por la producción de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas (Kaliňák, Barátová, Gallová, Ondrušová y Hudecová, 2013).

Las especies de *Neurospora* se encuentran en vegetación quemada y son identificados como organismos para modelos experimentales por su fácil manipulación, requerimientos nutricionales simples, crecimiento rápido por el desarrollo de su ciclo sexual, entre otros (Borkovich et al., 2004; Priatni, 2014; Raju, 2009). Además, son consideradas como recursos potenciales para la producción de carotenoides necesarios para colorantes de comida y cosméticos (Priatni, 2014).

Las especies de *Nigrospora* se distinguen por ser endófitos frecuentes en plantas y se las ha seleccionado por su fuerte actividad antifúngica (Pawle y Singh, 2014; Zhao, Zhang, Wang, Wang y Zhang, 2012). Por otro lado, *N. oryzae* es identificada como un hongo con potencial biotecnológico por la producción de metabolitos secundarios como nigrosporinas antibacterianas (Tanaka, Fukushima, Tsujino y Fujimori, 1997; Zhao et al., 2012).

Los hongos del género *Nemania* se caracterizan por ser patógenos asociados a plantas y causar enfermedades graves (Narayan et al., 2014). Las especies de *Stagonosporopsis* son reconocidas por ser serios patógenos, que atacan principalmente a las partes aéreas de las plantas (Gruyter et al., 2012).

Trichoderma asperellum es un hongo filamentoso del suelo, usado ampliamente en el mundo como un agente muy eficiente para el control de diversos fitopatógenos (Hoyos, Jaramillo y Orduz, 2008; Liu et al., 2010), además de ayudar a la activación de las defensas de las plantas por medio de moléculas de señalización (Harman, 2006; Liu et al., 2010).

Las especies del género *Xylaria* generalmente son hongos endófitos y saprófitos, ya que viven sin causar daño aparente, pero cuando la planta comienza a envejecer, estos descomponen la celulosa y lignina de la planta (Davis, Franklin, Shaw y Vilgalys, 2003; Rodrigues, Leuchtman y Petrini, 1993). Estudios realizados han determinado que estos hongos son capaces de brindar protección a su hospedador contra ataque de cualquier otro patógeno, así como de producir masivamente metabolitos activos con actividad antifúngica (Mogollón, Moreno, Iturriaga y Taddei, 2013). Por otro lado, este género también se

caracteriza por la producción de griseofulvina como tratamiento de infecciones de la piel o enfermedades malignas e inflamatorias en humanos, así como para tratar enfermedades causadas por fitopatógenos (Park et al., 2005).

Al analizar en conjunto todos los hongos encontrados en este estudio y apoyados en la literatura consultada se determinó que la mayoría de aislados corresponden a hongos endófitos del *phylum Ascomycota*. Davis et al. (2003), en su estudio manifiesta que la mayoría de hongos endófitos que pertenecen al *phylum Ascomycota* poseen gran potencial biotecnológico.

Se habla de endófitos cuando las defensas de la planta junto con los factores de virulencia de los hongos se encuentran en equilibrio. Lo contrario se produce en el caso de que el hospedero se encuentre en un estado de envejecimiento o estrés y las condiciones favorezcan que el hongo se exprese como un patógeno, provocando síntomas en la planta (Sánchez-Fernández et al., 2013). De esta manera, se establece que algunos hongos endófitos pueden ser patógenos latentes. Por esto se recomienda realizar pruebas de patogenicidad para determinar si los hongos aislados representan algún problema para la planta de naranjilla en futuros estudios (Photita, Lumyong, Lymyong, McKenzie y Hyde, 2004).

4.5 Diversidad de hongos asociados a lesiones foliares de naranjilla

Los datos de los 29 hongos identificados fueron ingresados en el programa *PAST*, dependiendo el número de géneros y/o especies presentes o ausentes en cada una de las localidades anteriormente nombradas (Tabla 8), donde cero (0) representa la ausencia del microorganismo en dicha localidad.

Tabla 7.

Hongos identificados organizados por localidad y número de géneros y/o especies encontradas (abundancias), analizados mediante el programa PAST por sitio muestreado.

Hongos identificados	Napo	Vía a Orellana	Pastaza	Morona	Vía a Macas
<i>Colletotrichum sp.</i>	0	0	3	0	0
<i>C.acutatum</i>	0	0	3	0	0
<i>C. boninense</i>	2	1	7	0	1
<i>C. fructicola</i>	0	0	1	0	0
<i>C. gloeosporioides</i>	0	0	3	1	1
<i>C. karstii</i>	0	0	3	0	0

Tabla 8.

.../... Continuación

Hongos identificados	Napo	Vía a Orellana	Pastaza	Morona	Vía a Macas
<i>C. kahawae subsp. ciggaro</i>	0	0	5	0	0
<i>C. lupini</i>	0	0	9	0	1
<i>C. nicotianae</i>	0	0	2	0	0
<i>Diaporthe</i> sp.	1	0	5	0	1
<i>D. citri</i>	1	1	15	4	1
<i>D. melonis</i>	0	0	4	0	0
<i>D. schini</i>	1	0	10	1	0
<i>D. paranensis</i>	0	0	1	0	0
<i>D. phaseolorum</i>	0	0	6	0	0
<i>D. terebinthifolii</i>	0	0	1	1	0
<i>Epicoccum sorghinum</i>	0	0	1	0	0
<i>Nemania diffusa</i>	0	0	1	0	0
<i>Neurospora</i> sp.	0	0	1	0	0
<i>N. tetrasperma</i>	2	1	5	1	0
<i>Nigrospora</i> sp.	0	0	1	0	0
<i>N. oryzae</i>	0	0	3	0	0
<i>Phomopsis</i> sp.	0	0	10	5	2
<i>P. asparagi</i>	0	0	5	1	0
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	0	0	0	0	1
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	0	0	1	0	0
<i>Trichoderma asperellum</i>	0	0	3	0	0
<i>Xylaria</i> sp.	0	0	1	0	2
<i>X. berteri</i>	0	1	10	0	1

Mediante el programa PAST, se calculó la cantidad de taxa e individuos, así como la dominancia y los índices de Shannon, Simpson y Pielou modificado (Tabla 9).

Tabla 9.

Datos de la diversidad obtenidos mediante el programa PAST.

	Napo	Vía a Orellana	Pastaza	Morona	Vía a Macas
Taxa (S)	5	4	28	7	9
Individuos	7	4	120	14	11
Dominancia (D)	0,22	0,25	0,06	0,23	0,12
I. Simpson (1-D)	0,78	0,75	0,93	0,76	0,87
I. Shannon (H)	1,55	1,38	3,02	1,66	2,14
Equidad (e^h H/S)	0,94	1	0,73	0,75	0,95

4.5.1 Distribución de la abundancia de especies y de individuos en las localidades de la región Amazónica.

Con base en la Tabla 9, la Figura 7 presenta el porcentaje de especies o taxas encontradas por localidades en la región Amazónica. Se considera a Pindo Mirador-Pastaza, localidad que agrupa el 97% de especies, como la localidad que posee la mayor abundancia especie-específica, mientras que la localidad de Loreto-vía a Orellana que abarca el 14% de especies, como la localidad de menor abundancia.

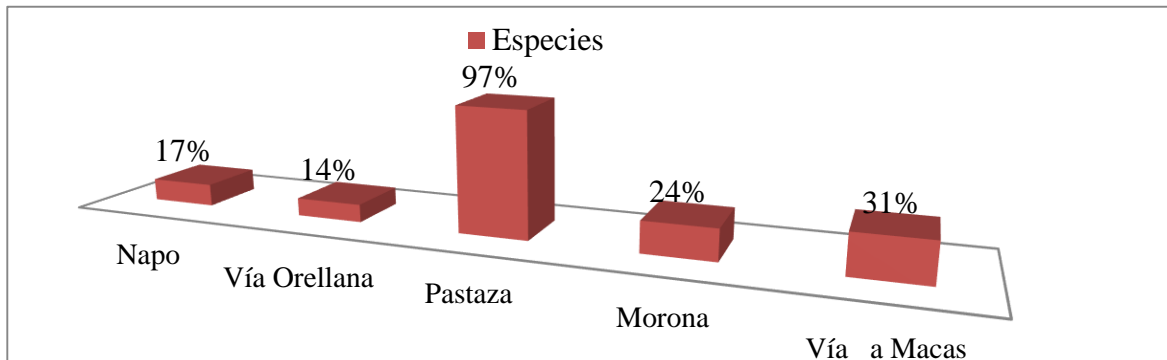


Figura 7. Riqueza de especies por localidades de la región Amazónica, en términos de presencia de especies frente al total de especies identificadas en el estudio.

Así mismo, la Figura 8 indica el porcentaje de la abundancia de individuos (aislados o número de hongos independientemente de su especie) obtenidos por localidades en la región Amazónica, en donde Pindo Mirador-Pastaza con 77% se considera como la localidad que posee la mayor abundancia de individuos de la región, mientras que la localidad de Loreto-vía a Orellana con 3% es la localidad con menor abundancia en términos de número de individuos.

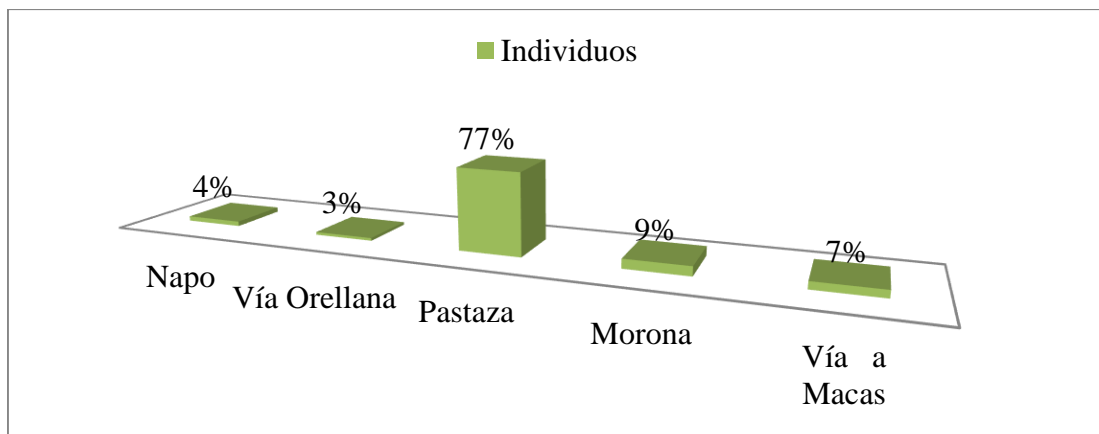


Figura 8. Abundancia de individuos por localidad de la región Amazónica frente al total de individuos encontrados en el estudio.

Según los resultados obtenidos en la Figura 7 y 8, la localidad de Pindo Mirador- Pastaza posee la mayor abundancia de especies e individuos, mientras que la localidad de Loreto- vía a Orellana se muestra como la menos abundante. Sin embargo, es muy importante cuestionar que este resultado no puede ser tomado como una afirmación, debido a que justamente en esta localidad es donde se recolectó el mayor número de muestras (20 hojas) y por ende el mayor número de individuos o aislados (120 hongos) en comparación con las demás localidades. En el caso de que se hubiera hecho el análisis con el mismo tamaño de muestra en todas las localidades estudiadas, y Pindo Mirador- Pastaza hubiera resultado como la más abundante en cuanto a especies e individuos, se podría deducir que posiblemente es porque se encuentra ubicada en un área que permite el desarrollo y la asociación de diversos nichos ecológicos, además de estar en una provincia que se destaca por tener un historial de cultivos de naranjilla (Caicedo, 2014; Revelo et al., 2010).

4.5.2 Distribución de la riqueza de especies y abundancia por localidad muestreada en la región Amazónica

En la Figura 9, se observa que existe un total de cinco especies en siete aislados de la localidad Cosanga-Napo. Las especies más representativas fueron *N. tetrasperma* y *Colletorichum boninse* con un 29%.

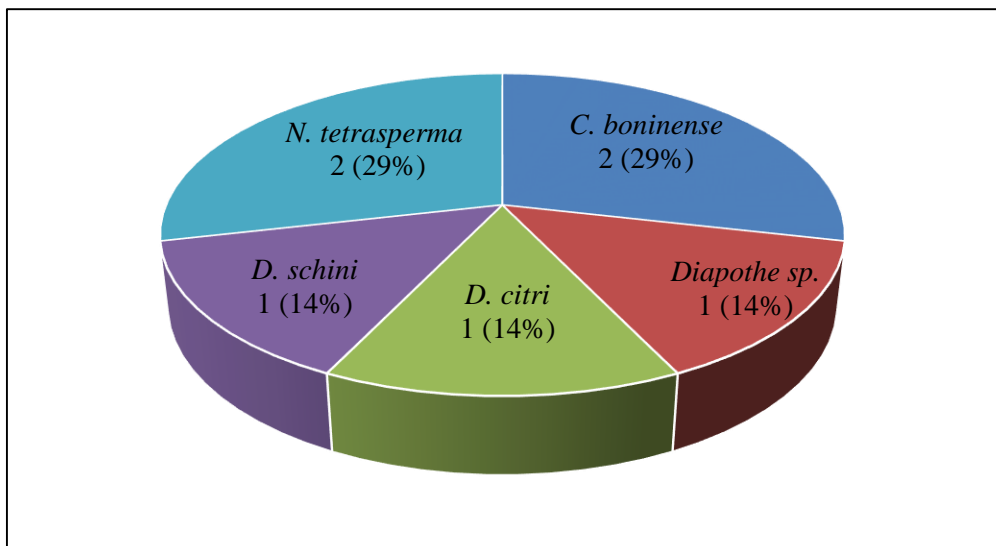


Figura 9. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia en la localidad de Cosanga-Napo.

En la Figura 10, se encontraron cuatro especies en cuatro aislados de la localidad de Loreto-Vía Orellana. Los hongos identificados presentan la misma abundancia, siendo todos representativos para la localidad.

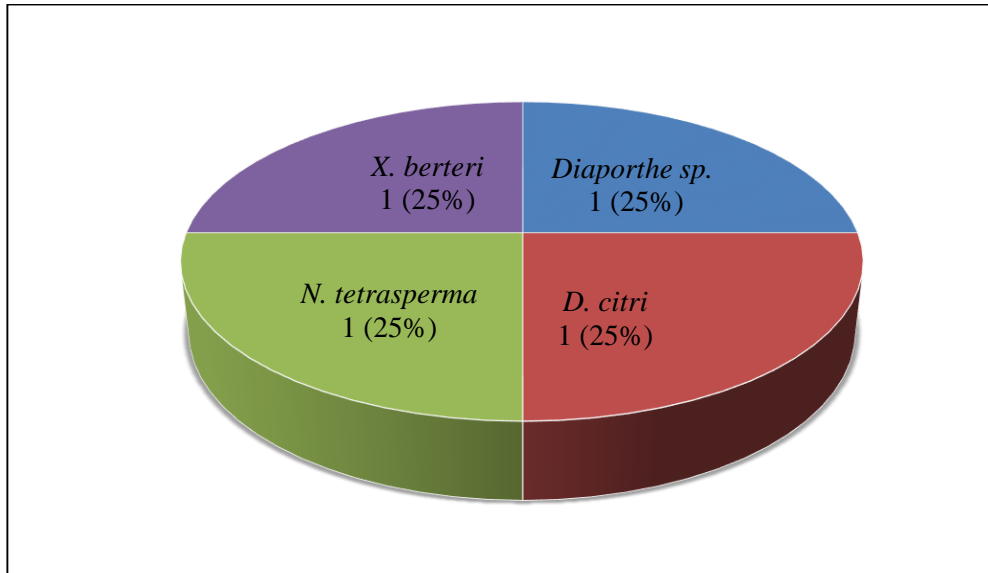


Figura 10. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia de la localidad de Loreto-Vía a Orellana.

En la Figura 11, se obtuvieron veintiocho especies en ciento veinte aislados de la localidad Pindo Mirador-Pastaza, de los cuales las especies más abundantes corresponden a *C. lupini*, *D. schini*, *Phomopsis sp.* y *X. berteri* con 8% cada una y *Diaporthe citri* con 13%.

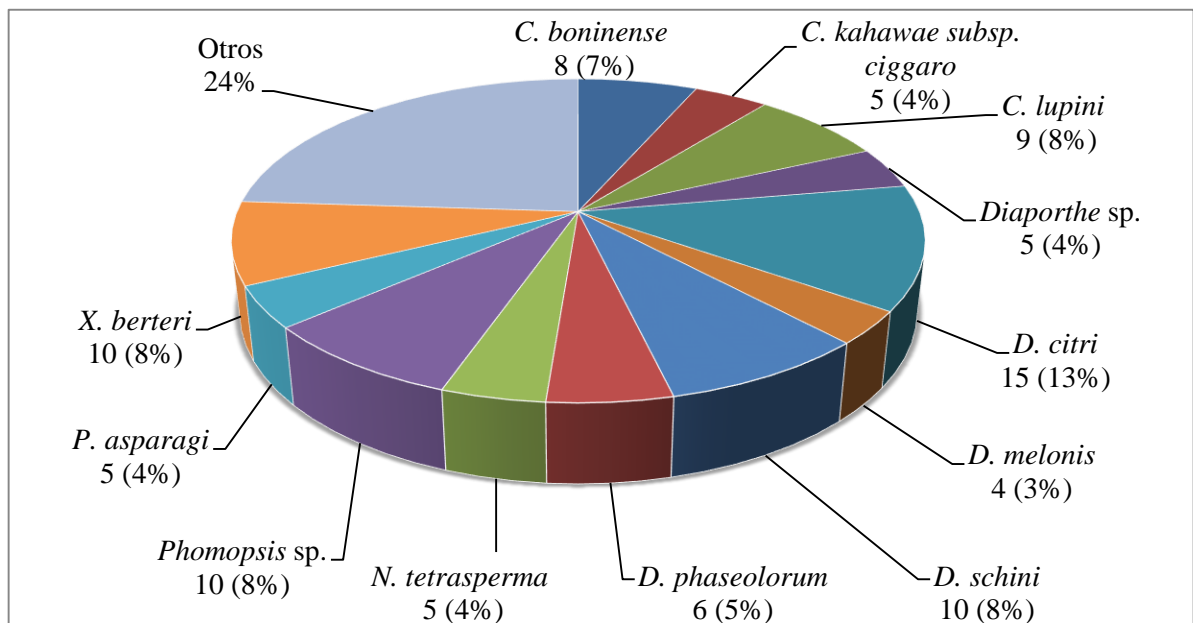


Figura 11. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia de la localidad de Pindo Mirador-Pastaza.

En la Figura 12, se encontraron siete especies en catorce aislados obtenidos en la localidad de Jimbiloma-Morona Santiago, de los cuales los más abundantes y representativos corresponden a *D. citri* con un 29% y *Phomopsis* sp. con un 36%.

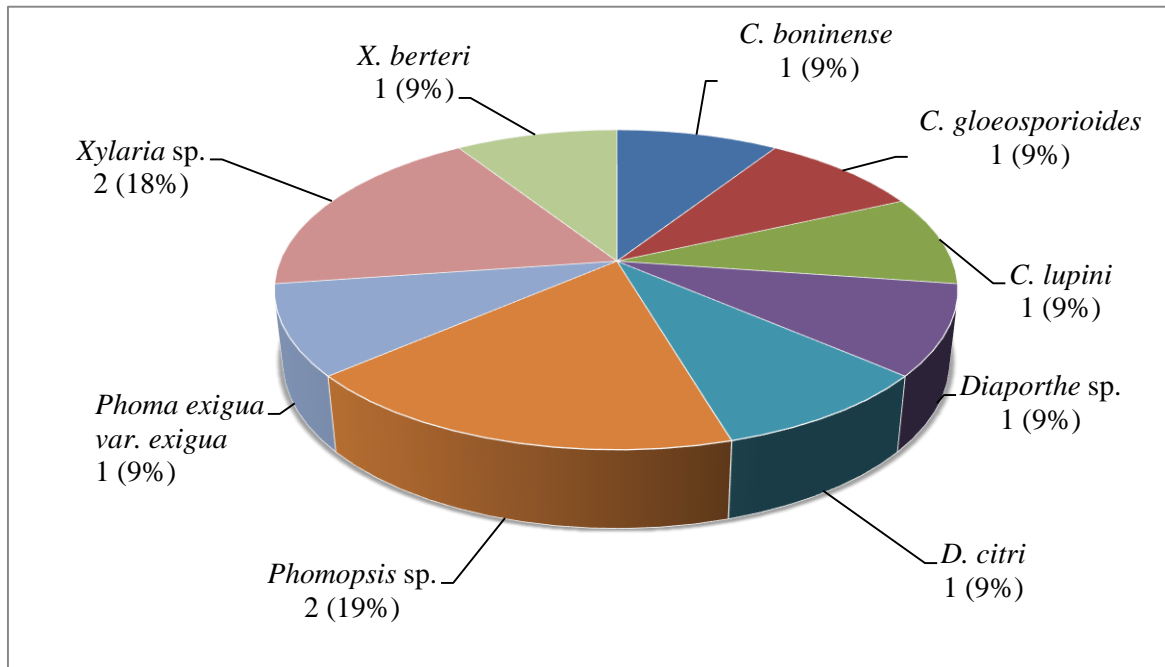


Figura 12. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia de la localidad de Jimbiloma- Morona Santiago.

En la Figura 13, se encontraron nueve especies en once aislados realizados en la localidad vía a Macas, de los cuales las especies más abundantes corresponden a *Xylaria* sp, y a *Phomopsis* sp. con 18 y 19%, respectivamente.

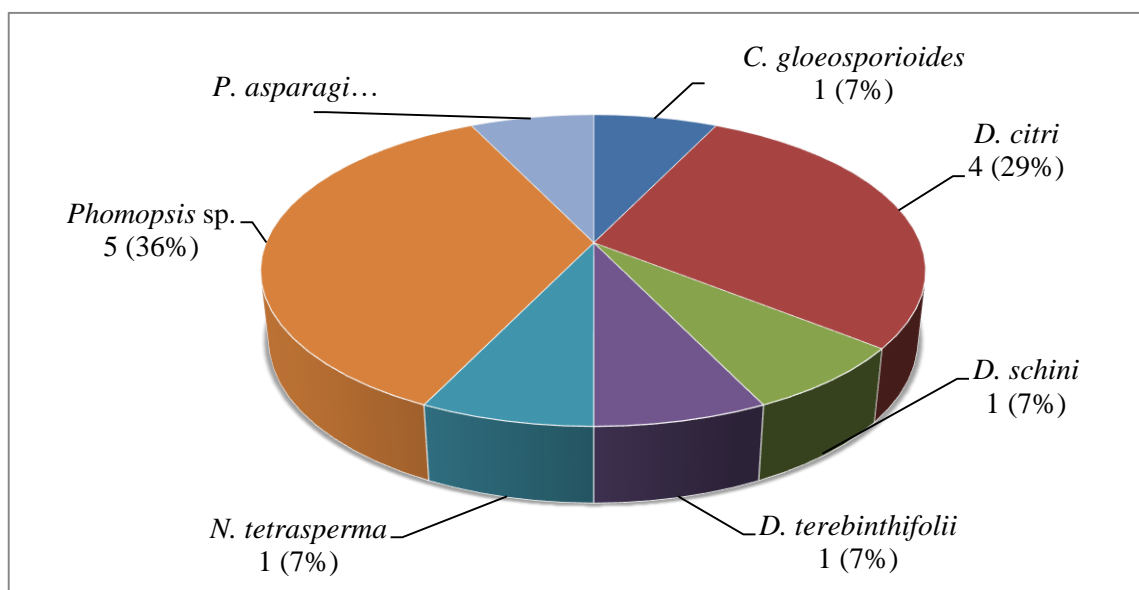


Figura 13. Riqueza de especies, porcentaje y abundancia en la localidad vía a Macas.

En Ecuador, no se han reportado aun estudios específicos acerca de la diversidad de hongos presentes en las hojas de los cultivos de naranjilla. Sin embargo, INIAP (2000); Rogg (2000), Revelo y Sandoval (2003), Contreras (2006), Angulo (2006); Solagro (2006), Quinchia y Cabrera (2006), Revelo et al. (2010), Molina (2010) e IICA (2011), establecen que los hongos fitopatógenos más notables dentro de este cultivo son *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Scletorotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Phoma* sp., *Colletotrichum* spp., *Gloesporium* sp., *Phytophthora* sp. *Alternaria* sp., *Septoria solanicola*, *Cladosporium* sp, *Botrytis* sp. y *Cercospora* sp.

Sin embargo, gracias al análisis molecular se puede reportar la presencia de nuevos géneros y especies de hongos que se encuentran asociados a las plantas de naranjilla como *Neurospora* sp., *Epicoccum sorghinum*, *Nemania diffusa*, *Trichoderma asperellum*, *Xylaria* sp., *Phomopsis* sp. y *Stagonosporopsis cucurbitacearum*.

Dentro del género *Colletotrichum* se han identificado especies como *C. boninense*, *C. lupini*, *C. kahawae subsp. ciggaro*, *C. acutatum*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. fructicola* y *C. nicotianae*. Dentro del género *Diaporthe* se han reconocido *D. schini*, *D. citri*, *D. paranensis*, *D. terebinthifolii* y *D. melonis*. Por otro lado, en este estudio *Diaporthe citri*, es la única especie presente en las cinco localidades monitoreadas.

Este estudio reporta hongos que se encuentran asociados a lesiones foliares de la naranjilla, cuya información servirá de base para futuros estudios que puedan permitir reconocer e investigar el rol que cumplen estos microorganismos en la planta huésped, sintomática o asintomática y determinar los beneficios biotecnológicos que pueden ofrecer.

4.5.3 Índice de dominancia, diversidad y equidad

Los análisis de diversidad obtenidos con el programa *PAST* que se pueden visualizar en la tabla 9, señalan con un valor de 0.06 a Pindo Mirador- Pastaza, como una localidad con una baja homogeneidad en la distribución de taxa dentro de cada localidad debido a que algunos de los taxa dominan sobre los demás, respecto a su abundancia. Por otra parte, la localidad de Loreto- Orellana se caracterizó por una alta dominancia con un valor de 0.25, pero esto se debe a la cantidad de géneros y especies ausentes en dicha localidad. De acuerdo al índice de Simpson, la localidad de Pindo Mirador, con un valor de 0.93, presentó una

mayor diversidad de géneros y especies, ya que no hay una equidad en la distribución de los taxa. En el índice de Shannon, en la localidad de Pindo Mirador no existió una distribución de taxa homogénea y sus valores sobrepasaban a 1; así que el índice de Pielou estableció condiciones de equidad (entre 0 y 1) dada por la dominancia, en la que establece a Loreto-Vía a Orellana como una localidad equitativa por la ausencia de una gran cantidad de géneros y especies, y a la localidad de Pindo Mirador con una localidad muy diversa.

Sin embargo, se debe considerar que los resultados obtenidos en cuanto a la presencia de una mayor diversidad en la localidad de Pindo Mirador, no pueden ser afirmados en su totalidad debido a que el muestreo no fue equiparable con el resto de localidades. Si hubiese sido el caso en el que se aseguraba el tener el mínimo tamaño de muestras en todas las localidades, los resultados encontrados posiblemente hubieran sido similares a esta o, de haber sido diferentes, habría mayor sustento para que este estudio en cuanto a la diversidad pueda ser aseverado.

4.5.4 Análisis de escalamiento multidimensional

Para este análisis se utilizó el índice de distancia de Bray Curtis. La Figura 14 representa la diferencia en cuanto a la distancia a la que se encuentran cada una de las localidades monitoreadas en el plano, en función de la composición de especies o taxa. La composición se encuentra representada por el conjunto de todos los 29 géneros y especies identificados en esta investigación. En la Figura 14, las localidades de Cosanga- Napo y Loreto- vía a Orellana se encuentran muy cercanas, debido a que tienen una composición de géneros y especies similares. Sin embargo, en cuanto a la distancia en el plano, no sucede lo mismo con Jimbiloma- Morona Santiago, Pindo Mirador- Pastaza y la vía a Macas. Pindo Mirador al estar totalmente separada del resto de localidades, se establece como la localidad más diferente en cuanto a la composición de géneros y especies. Sin embargo, este resultado se encuentra sesgado y no puede afirmarse con certeza ya que el mayor esfuerzo de muestreo realizado fue en esta localidad.

Por otro lado, el valor obtenido del *stress* fue de 0, orientado a una perfecta representación de la Figura 14 y catalogado como perfecto por Kruskal (1964).

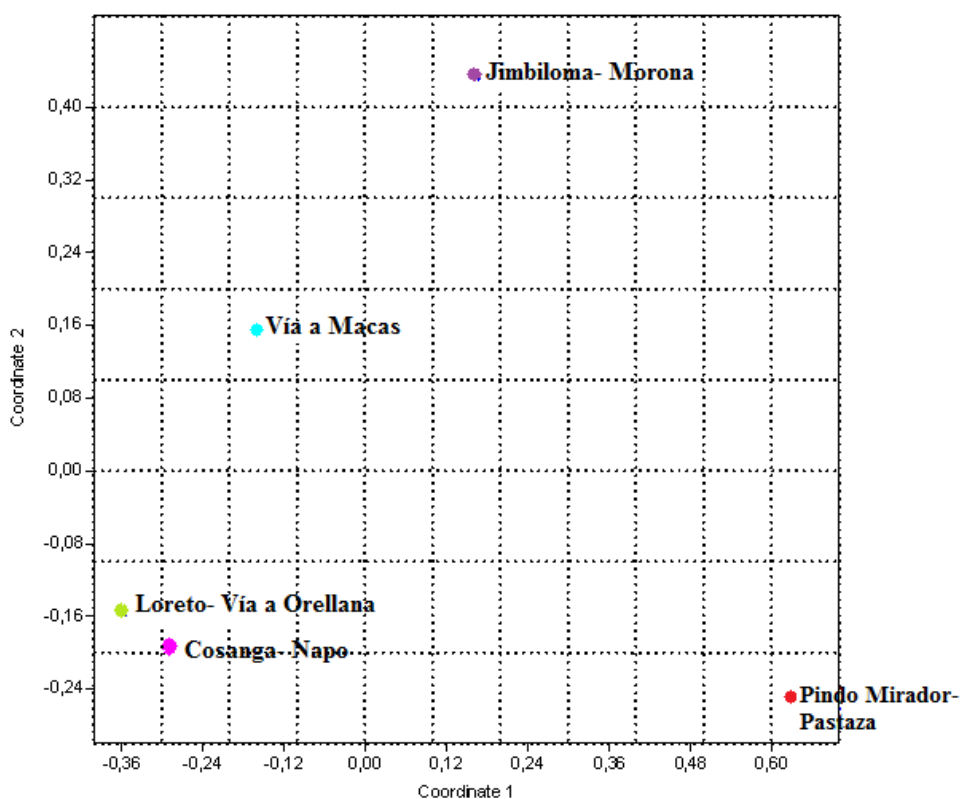


Figura 14. Análisis multivariado (NMDS) por medio del índice de Bray Curtis de los sitios diferenciados en función de la composición de especies encontradas en cada una de las localidades de la región Amazónica.

4.5.5 Análisis *Simper*

Las principales especies que contribuyen a la diferenciación de cada una de las localidades son *Phomopsis* sp. con 15,44% y *Diaporthe citri* con 11,42 %. Les siguen *D. schini* y *X. berteri* con 7,29%, *C. boninense* con 7,09%, *N. tetrasperma* con 6,51%, *C. lupini* con 5,88% y *Diaporthe* sp. con 5,22% (Tabla 10). Las contribuciones que tienen las demás especies son muy bajas, debido a que éstas no se encuentran presentes en todas las localidades. No obstante, no se puede confirmar plenamente este resultado debido al déficit de muestreo del estudio en las localidades de Cosanga- Napo, Loreto- vía a Orellana y Jimbiloma-Morona Santiago.

La tabla 10, ha sido interpretada de tal manera en la que se ha ido determinando el porcentaje de contribución, en cuanto a la presencia o ausencia, que tiene cada género y especie (identificadas en el estudio) en cada una de las localidades monitoreadas. Como se observa en la Tabla 10, *Phomopsis* sp. tiene mayor presencia en la localidad de Pindo

Mirador-Pastaza y poca en la localidad de la vía a Macas; sin embargo, está ausente en Cosanga- Napo y Loreto- vía a Orellana. *Diaporthe citri* se encuentra presente en la localidad de Pindo Mirador-Pastaza y en Jimbiloma-Morona Santiago, pero su presencia es escasa en Cosanga-Napo, Loreto-vía a Orellana y en la vía a Macas. *D. schini* abunda en la localidad de Pindo Mirador-Pastaza, escasea en Cosanga-Napo y Jimbiloma-Morona Santiago; y está ausente en Loreto-vía a Orellana y vía a Macas. *X. berteri* se presenta en la localidad de Pindo Mirador-Pastaza, muy poco en Loreto-vía a Orellana y en la vía a Macas; y se ausenta en Cosanga-Napo y Jimbiloma-Morona Santiago. *C. boninense* es característica de la localidad de Pindo Mirador- Pastaza; sin embargo, también habita en Cosanga- Napo, Loreto-vía a Orellana y en la vía a Macas; y no fue detectada en Jimbiloma- Morona Santiago. *N. tetrasperma* está en la localidad de Pindo Mirador-Pastaza, en menor medida en Cosanga-Napo, Loreto-vía a Orellana y Jimbiloma-Morona Santiago; y se ausenta en la vía a Macas. *C. lupini* se encuentra presente en la localidad de Pindo Mirador-Pastaza, muy poco en la vía a Macas; y no está en Cosanga-Napo, Loreto-vía a Orellana y Jimbiloma-Morona Santiago. *Diaporthe* sp. se encontró en la localidad de Pindo Mirador-Pastaza, fue escasa en Cosanga- Napo y vía a Macas; y no se detectó en Loreto-vía a Orellana y Jimbiloma-Morona Santiago.

No obstante, se debe insistir que los resultados obtenidos en cuanto a las especies que más contribuyen a la diferenciación de las localidades estudiadas no pueden afirmarse debido a que existió un mayor muestreo en la localidad de Pindo Mirador- Pastaza.

Tabla 10.

Análisis Simper de la contribución de las especies o taxa en cada una de las localidades.

Taxon	% Contribución	Napo	Vía Orellana	Pastaza	Morona Santiago	Vía a Macas
<i>Phomopsis</i> sp.	15,44	0	0	10	5	2
<i>D. citri</i>	11,42	1	1	15	4	1
<i>D. schini</i>	7,29	1	0	10	1	0
<i>X. berteri</i>	7,28	0	1	10	0	1
<i>C. boninense</i>	7,09	2	1	7	0	1
<i>N. tetrasperma</i>	6,51	2	1	5	1	0
<i>C. lupini</i>	5,88	0	0	9	0	1
<i>Diaporthe</i> sp.	5,22	1	0	5	0	1

Tabla 11.

.../... Continuación

Taxon	% Contribución	Napo	Vía Orellana	Pastaza	Morona Santiago	Vía a Macas
<i>Xylaria sp.</i>	4,82	0	0	1	0	2
<i>C. gloeosporioides</i>	4,12	0	0	3	1	1
<i>P. asparagi</i>	3,94	0	0	5	1	0
<i>D. phaseolorum</i>	2,53	0	0	6	0	0
<i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>	2,30	0	0	0	0	1
<i>D. terebinthifolii</i>	2,26	0	0	1	1	0
<i>C. kahawae</i> subsp. <i>iggaro</i>	2,11	0	0	5	0	0
<i>D. melonis</i>	1,68	0	0	4	0	0
<i>Trichoderma</i> <i>asperellum</i>	1,26	0	0	3	0	0
<i>C. karstii</i>	1,26	0	0	3	0	0
<i>N. oryzae</i>	1,26	0	0	3	0	0
<i>Colletotrichum sp.</i>	1,26	0	0	3	0	0
<i>C. acutatum</i>	1,26	0	0	3	0	0
<i>C. nicotianae</i>	0,84	0	0	2	0	0
<i>D. paranensis</i>	0,42	0	0	1	0	0
<i>Stagonosporopsis</i> <i>cucurbitacearum</i>	0,42	0	0	1	0	0
<i>Nigrospora sp.</i>	0,42	0	0	1	0	0
<i>Neurospora sp.</i>	0,42	0	0	1	0	0
<i>Nemania diffusa</i>	0,42	0	0	1	0	0
<i>Epicoccum sorghinum</i>	0,42	0	0	1	0	0
<i>C. fruticola</i>	0,42	0	0	1	0	0

4.6 Análisis filogenético de hongos asociados a lesiones foliares de la planta de naranjilla

La topología del árbol filogenético obtenido por el método de *Neighbor-Joining*, en base a la región ITS de los hongos asociados a lesiones foliares de la planta de naranjilla, reveló la formación de tres ramificaciones principales con seis grupos. Además, el árbol demostró ser significativo y robusto, al tener valores de *bootstrap* superiores o iguales a 70 sobre cada una de las ramas obtenidas (Hills y Bull, 1993), además de delimitar siete grupos con un alto soporte estadístico que fueron asociados en base al orden del linaje encontrado en el NCBI (2016) (Figuras 15 y 16).

Las Figuras 15 y 16 presentan la primera ramificación que está constituida por *Pythium sylvaticum*, como grupo externo. En la segunda ramificación se agrupan géneros de la clase de los *Dothideomycetes*, mientras que en la tercera ramificación se agrupan géneros de la clase de los *Sordariomycetes* (NCBI, 2016). La segunda y tercera ramificación presentaron un soporte de 100% y todos sus individuos pertenecen al *phylum Ascomycota*. Esta división de clases en filogenia se encuentra explícita en el estudio de Shenoy, Jeewon, Wu, Bhat y Hyde (2006). La principal diferencia que existe entre estas dos clases es que los *Dothideomycetes* se caracterizan por la formación de un ascostroma o pseudotecio como cuerpo fructífero con ascos bitunicados (Hyde et al., 2013; Jones, Hyde y Pang, 2014), mientras que los *Sordariomycetes* se caracterizan por formar peritecios con ascos unitunicados inoperculados (ver anexo 5) (Zhang et al, 2006; Jones y Pang, 2012).

Como se mencionó anteriormente, siete son los grupos con alto soporte estadístico que se consiguieron mediante el análisis filogenético *Neighbor-Joining*: los tres primeros sustentados en un 100%, el cuarto con 99,9%, el quinto y el sexto con 95,4% y el último con 90,6%. Asimismo, se debe aclarar que el primer grupo pertenece a la clase de los *Dothideomycetes* y el segundo, el tercer, el cuarto, el quinto y el sexto grupo corresponden a la clase de los *Sordariomycetes* (Figuras 15 y 16).

En la Figura 16, el primer grupo establecido se encuentra dentro del orden de los *Pleosporales* y está constituido por las especies *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Phoma exigua* var. *exigua* y *Epicoccum sorghinum*. Sin embargo, se debe señalar que *Phoma* es el estado anamorfo de *Stagonosporopsis* y también el sinónimo de *Epicoccum* (Mycobank, 2016; NCBI, 2016). Las relaciones íntimamente estrechas de estos géneros son reconocidos también en los estudios de Aveskamp, Gruyter, Woudenberg, Verkley y Crous (2010) y Cornejo (2013). El segundo grupo pertenece al orden los *Sordariales* y está representado por *Neurospora* sp. y *Neurospora tetrasperma*. Dentro del tercer grupo está *Tricoderma asperellum* que pertenece al orden de los *Hypocreales*. La cuarta agrupación asoció a los hongos pertenecientes al género *Colletotrichum*: *Colletotrichum* sp., *C. gloesporioides*, *C. acutatum*, *C. lupini*, *C. fructicola*, *C. kahawae* subs. *ciggaro*, *C. boninse*, *C. karstii* y *C. nicotianae* que se ubican en el orden de los *Glomerellales*. El quinto grupo reúne al orden de los *Trichosphaeriales* con *Nigrospora* sp. y *Nigrospora oryzae*; mientras que el sexto grupo de los *Xylariales* incluye a *Xylaria* sp., *Xylaria berteri* y *Nemania diffusa*,

considerando una relación íntima que ha sido identificada en estudios de Jones et al. (2014) y Habibi, Banihashemi y Mostowfizadeh-Ghalamfarsa (2015). Finalmente, el séptimo grupo, relacionó a las especies de *Diaphorte* sp., *D. paranencis*, *D. melonis*, *D. schini*, *D. terebinthifoli*, *D. phaseolorum*, *D. citri*, *Phomopsis* sp. y *P. asparagi*. Estos hongos han demostrado estar íntimamente relacionados, debido a que el género *Phomopsis* es el estado asexual del género *Diaporthe* (Udayanga et al, 2012). Además, esta relación es reportada en estudios como los de Santos, Correia y Phillips (2010) y de Gomes et al. (2013). Cabe destacar que la diferencia de todos los órdenes que se señalan en el árbol radica en sus cuerpos fructíferos y ascos (McLaughlin y Spatafora, 2000).

Es importante determinar que en este árbol se evidenció un nodo sin bifurcación en la segunda ramificación principal (Figuras 15 y 16), conocido como politomía, esto se dio posiblemente a que el número de repeticiones establecidas no pudo otorgar la información necesaria para inferir en la filogenia final (Garlant y Díaz-Uriarte, 1999). Por esta razón, es recomendable para futuros análisis una aplicación conjunta de los métodos de *Neighbor-Joining*, máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana para establecer si las filogenias proporcionan o no los mismos resultados y así poder determinar que es confiable.

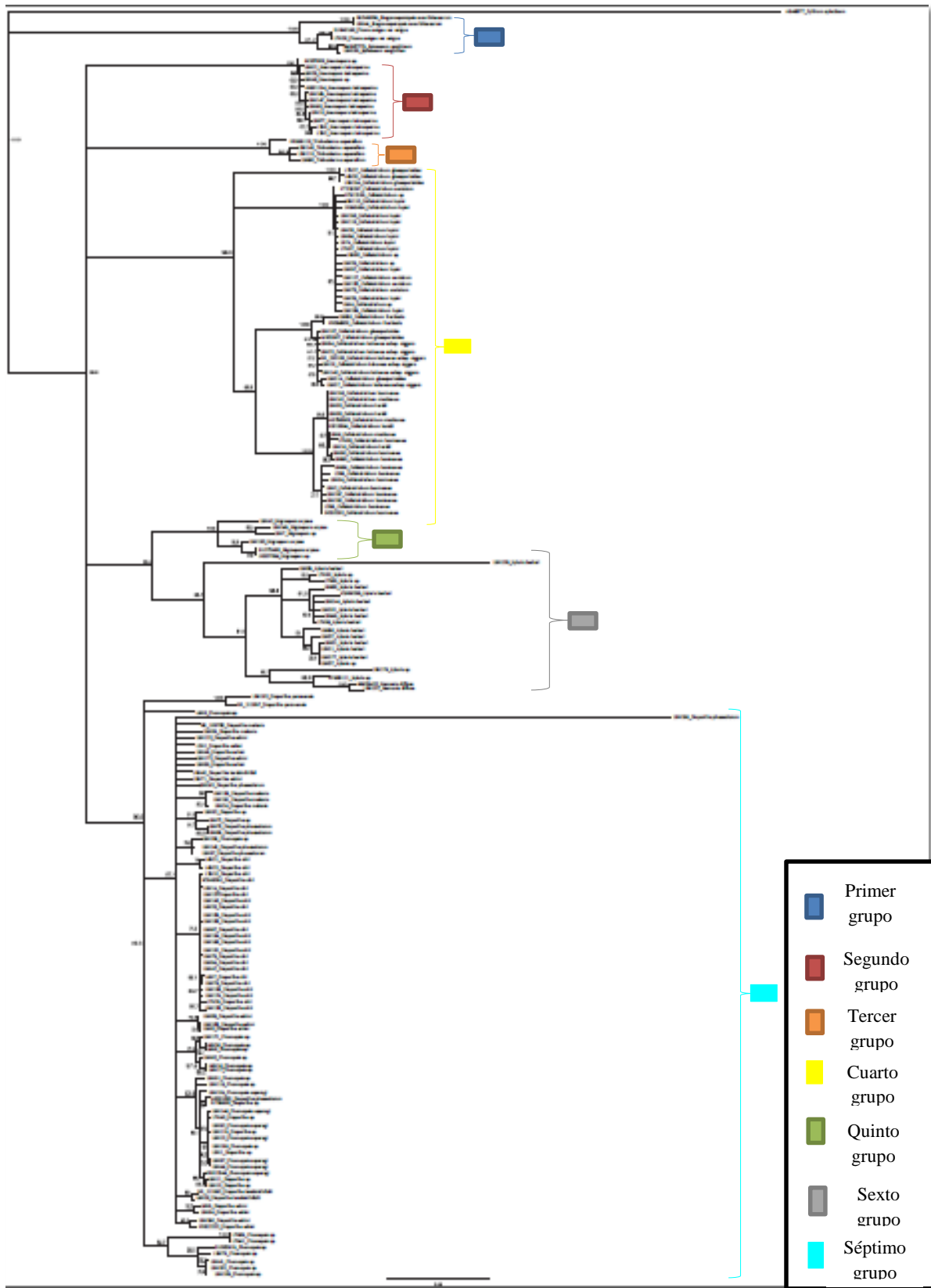


Figura 15. Estructura completa del árbol filogenético de hongos asociados a lesiones foliares de la naranjilla en varias localidades de la Amazonia Ecuatoriana mediante *Neighbor- Joining*.

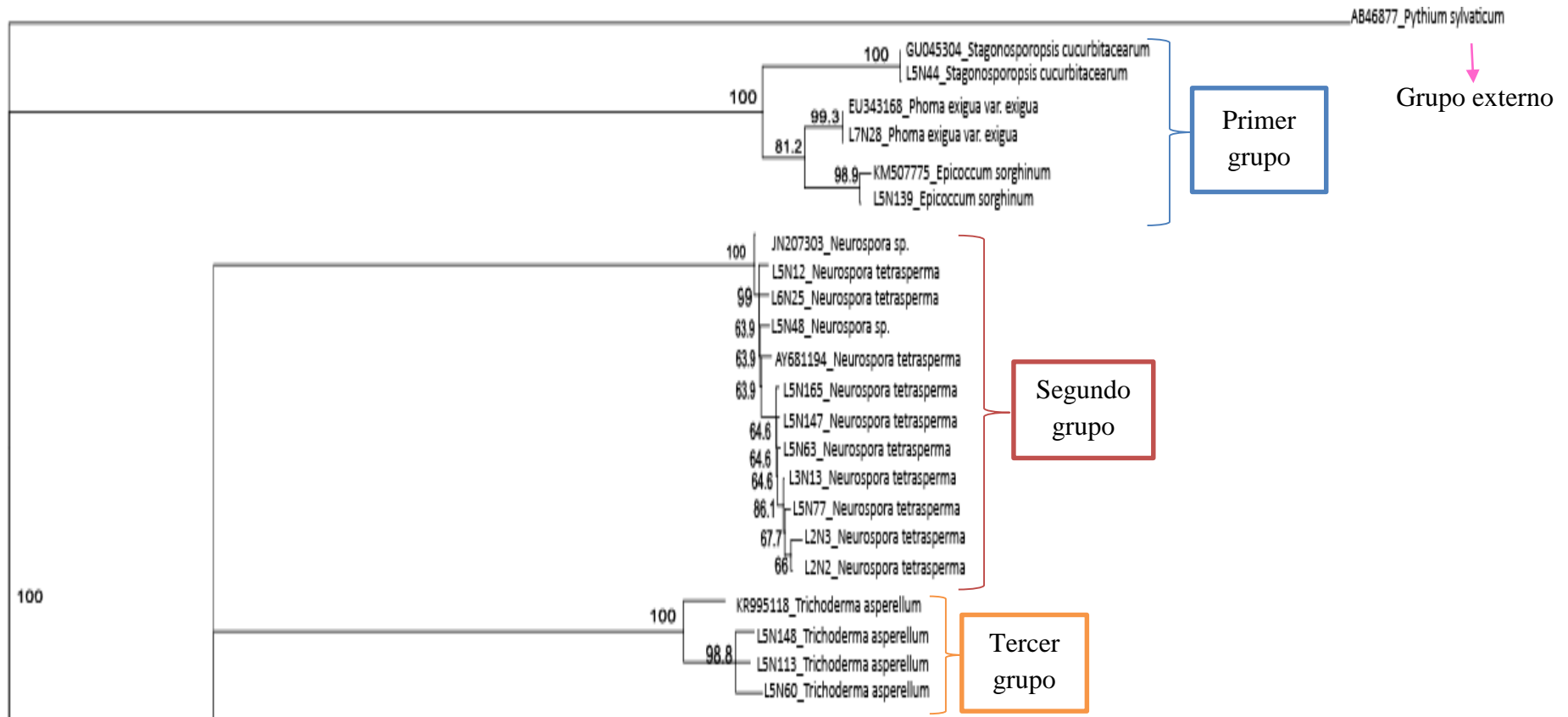


Figura 16. Árbol filogenético obtenido mediante el método *Neighbor-Joining* para hongos asociados a lesiones foliares de la naranjilla en varias localidades de la Amazonia Ecuatoriana.

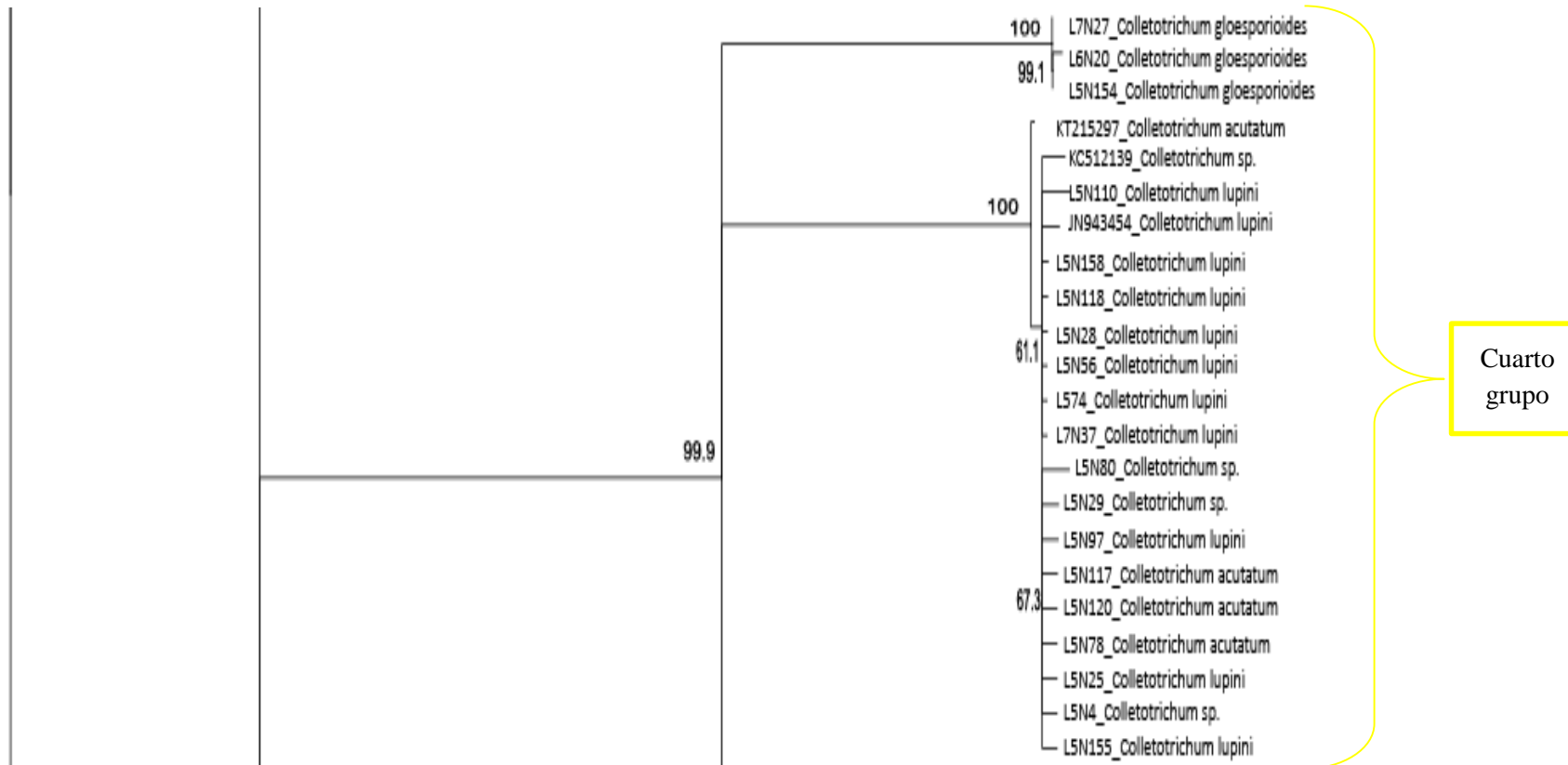


Figura 16. .../... Continuación

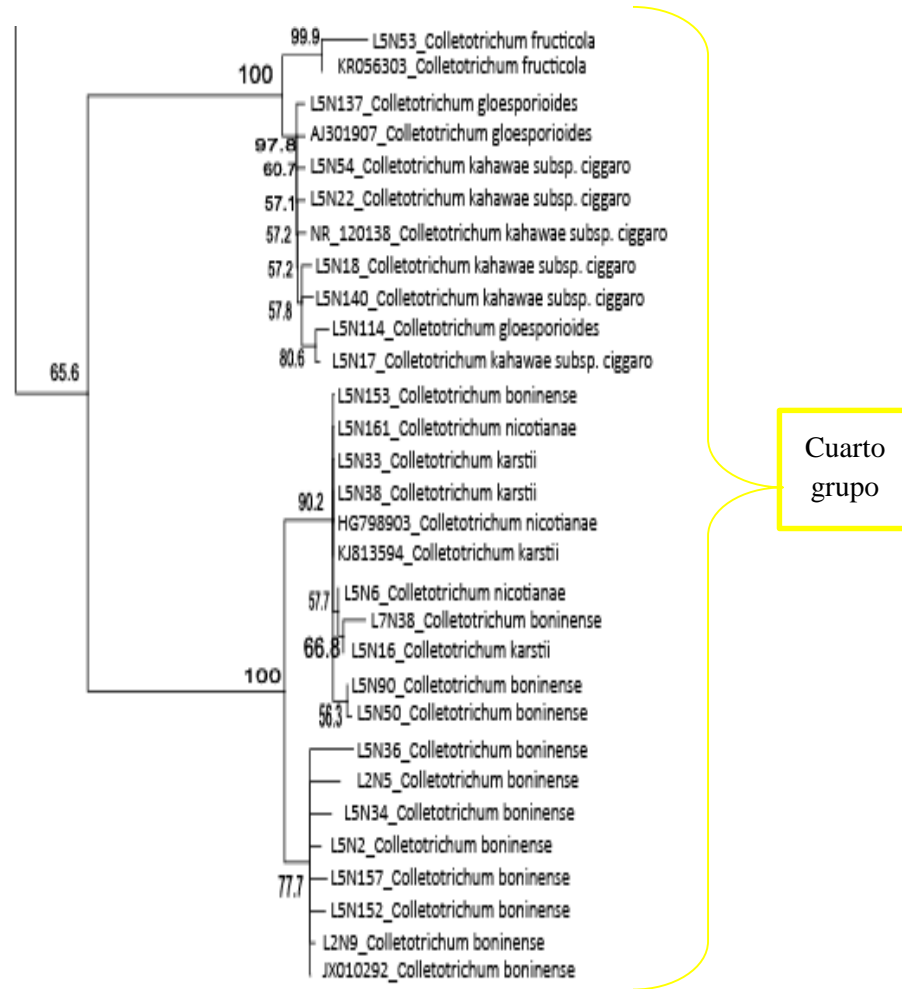
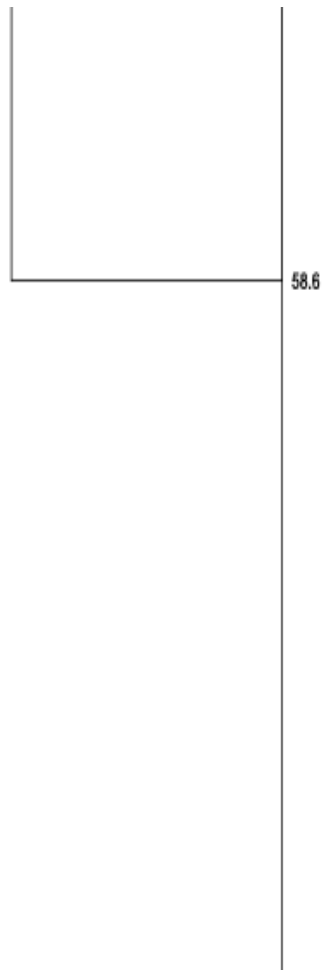


Figura 16. .../... Continuación

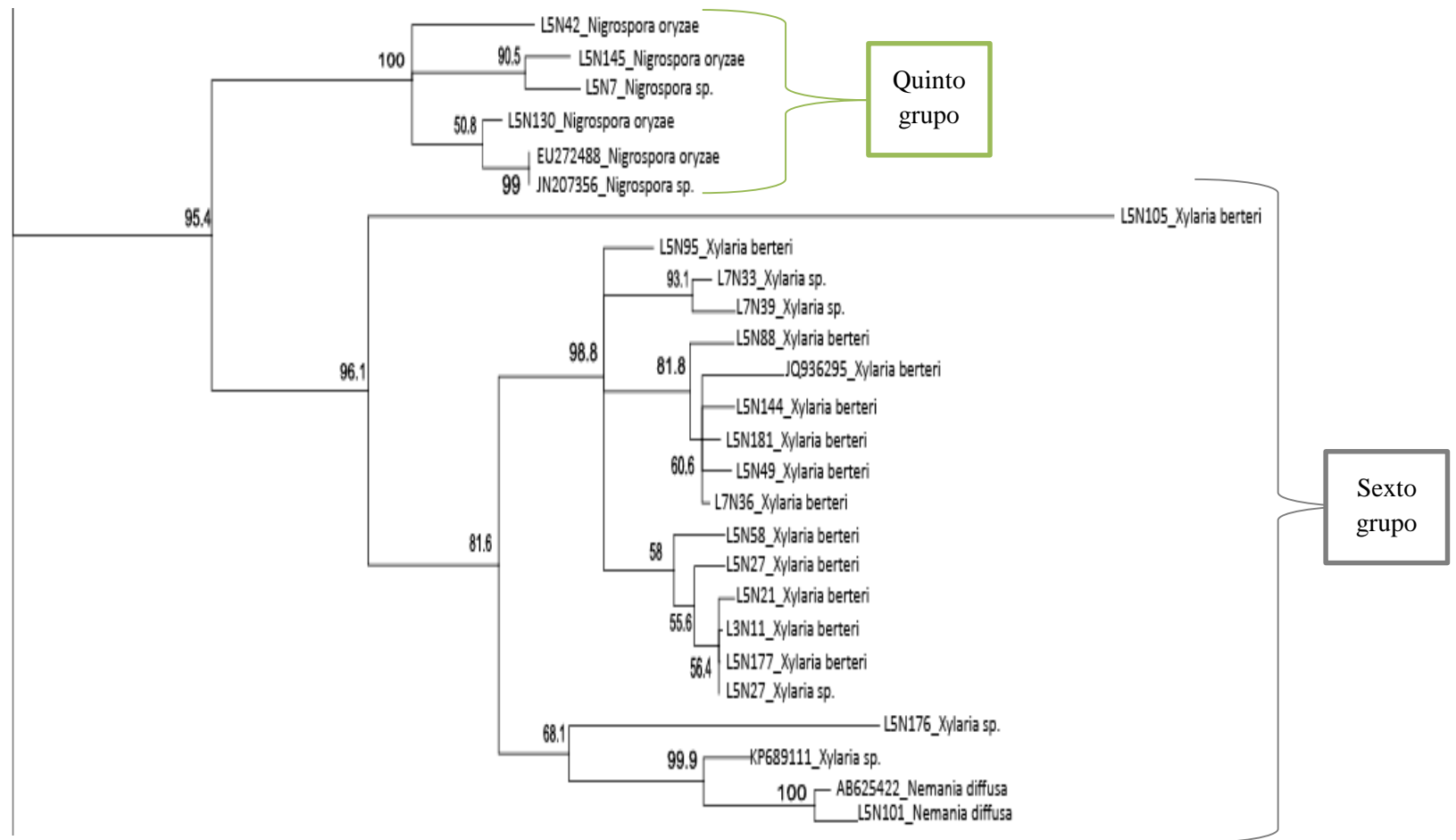


Figura 16. .../... Continuación

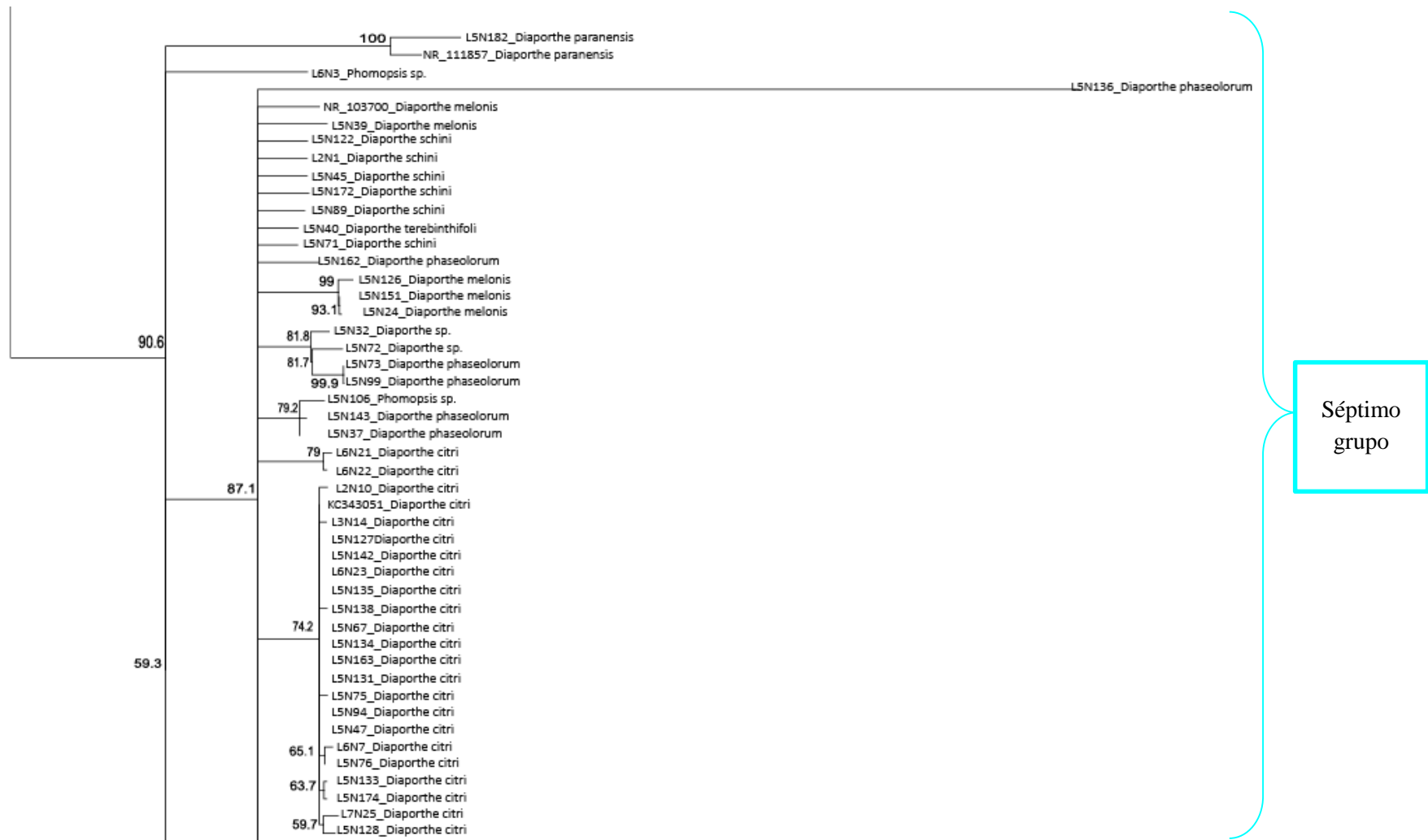


Figura 16. .../... Continuación

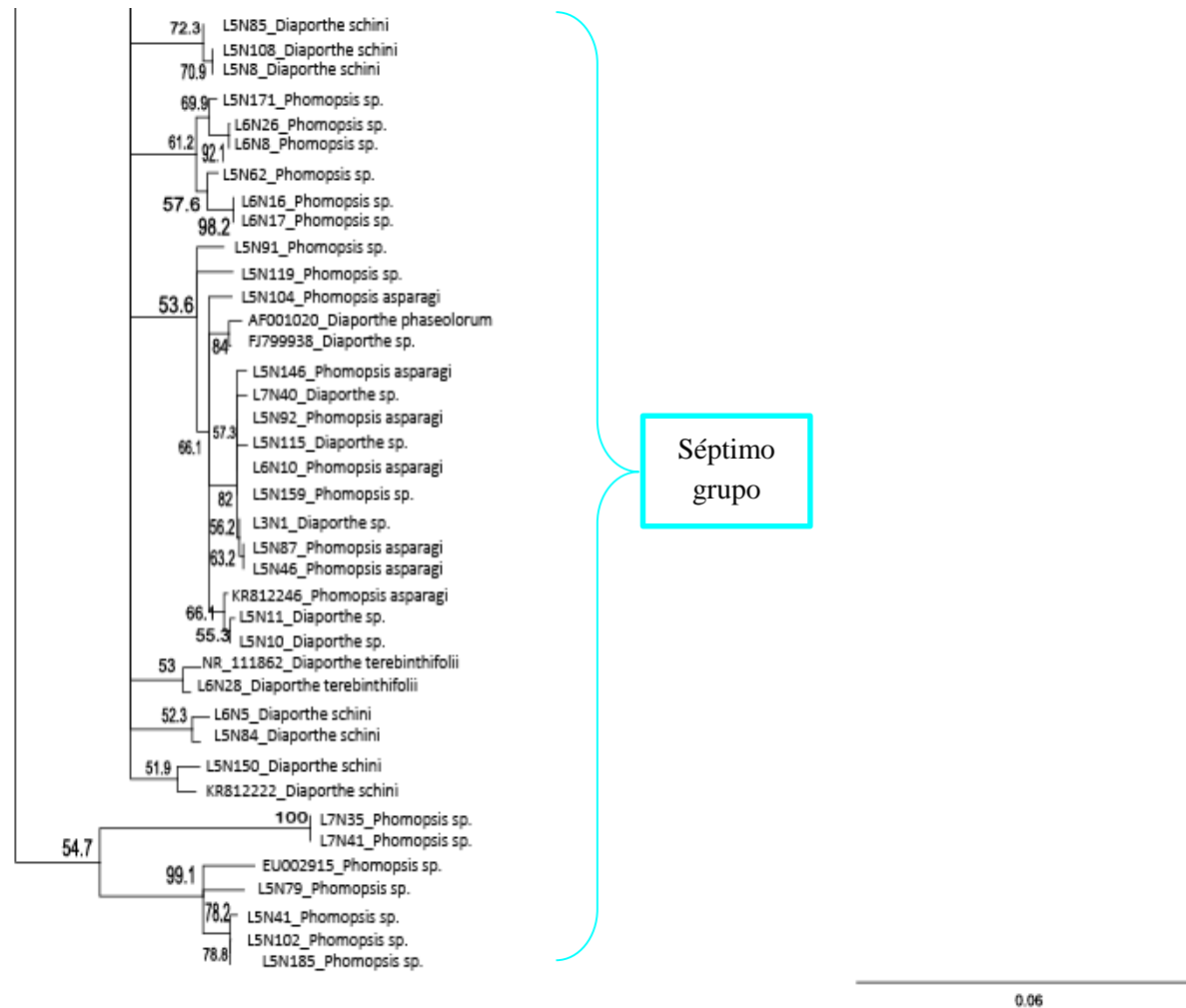


Figura 16. .../... Continuación

CONCLUSIONES

- ❖ Se consiguió un total de cuarenta muestras en la región Amazónica de hojas de naranjilla con lesiones (cuatro de Cosanga- Napo, cinco de Loreto- vía a Orellana, veinte de Pindo Mirador- Pastaza, seis de Jimbiloma- Morona Santiago y cinco de la vía a Macas), de los cuales se aislaron 156 hongos: siete en Cosanga-Provincia de Napo, cuatro en Loreto-vía a Orellana, ciento veinte en Pindo-Mirador-Pastaza, catorce en Jimbiloma-Morona Santiago y once en la vía a Macas. Sin embargo, se debe considerar que debido a que los tamaños de las muestras obtenidas en cada localidad no fueron iguales, los resultados encontrados en lo que respecta al análisis de biodiversidad no pueden ser totalmente confirmados.
- ❖ Mediante la secuenciación del ADN obtenido de los 156 aislados, se logró la identificación de 29 hongos a nivel de género y especie con porcentaje de cobertura e identidad del 100% según el programa *BLAST*.
- ❖ Los 29 hongos identificados pertenecen al *phylum Ascomycota*, y corresponden a *Colletotrichum sp.*, *C. acutatum*, *C. boninense*, *C. fructicola*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, *C. kahawae subsp. ciggaro*, *C. lupini*, *C. nicotianae*, *Diaporthe sp.*, *D. citri*, *D. melonis*, *D. schini*, *D. paranensis*, *D. phaseolorum*, *D. terebinthifolii*, *Epicoccum sorghinum*, *Nemania diffusa*, *Neurospora sp.*, *N. tetrasperma*, *Nigrospora sp.*, *N. oryzae*, *Phomopsis sp.*, *P. asparagi*, *Phoma exigua var. exigua*, *Stagonosporopsis cucurbitacearum*, *Trichoderma asperellum*, *Xylaria sp.* y *X. berteri*. Algunos de éstos han sido citados por primera vez en el país.
- ❖ De los hongos aislados e identificados en este estudio, siete son reportados en la literatura científica como endófitos, considerándolos para potenciales aplicaciones biotecnológicas. Los veinte hongos restantes son reconocidos como saprófitos y patógenos de plantas.
- ❖ De las localidades muestreadas, la localidad de Pindo Mirador-Pastaza, se encuentra representada por una mayor abundancia de individuos y una mayor dominancia de

especies, de acuerdo a los índices de Shannon, Simpson y Pielou. Sin embargo, estos resultados se encuentran sesgados debido a que se trata de la localidad con mayor esfuerzo de muestreo, lo que reduce el impacto de los resultados obtenidos.

- ❖ El escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), medido por el índice de distancia de Bray Curtis, demostró que las localidades de Cosanga- Napo y Loreto- vía a Orellana son zonas muy parecidas en cuanto a la composición de especies. El resto de localidades presentaron una composición especie-específica diferente, principalmente la de Pindo Mirador- Pastaza. Por otro lado, el análisis *Simper* estableció que los géneros y especies como *Phomopsis* sp. y *Diaporthe citri*, contribuyen mayormente a la diferenciación de las localidades monitoreadas. Asimismo, las contribuciones que tienen las demás especies son muy bajas, debido a que no se encuentran presentes en todas las localidades. No obstante, se debe considerar que estos resultados no son totalmente confirmados debido a que no se realizó una toma de muestras equitativa en cada localidad.

- ❖ Si se aseguraba tener el mínimo tamaño de muestras en todas las localidades, los resultados encontrados posiblemente hubieran sido similares a los obtenidos o, de haber sido diferentes, habría mayor sustento para que este estudio en cuanto a la diversidad pueda ser aseverado.

- ❖ La topología del árbol filogenético obtenido por el método de *Neighbor-Joining* reveló la formación de tres ramificaciones principales y siete grupos. Además, se alcanzaron valores de *bootstrap* superiores o iguales a 70 sobre cada una de las ramas obtenidas, determinando de esta forma que el árbol obtenido es significativo y robusto.

RECOMENDACIONES

- ❖ Para futuras investigaciones de diversidad de hongos en este cultivo, es importante que se uniformice el número de muestras tomadas por localidad para que los resultados no se hallen sesgados. Además, sería interesante que se tome en cuenta al resto de la planta (tallo, hojas, Flores y raíces), para conocer de forma más amplia la ubicación y la diversidad de hongos que se encuentran en asociación con el cultivo.
- ❖ Al ser los hongos endófitos patógenos latentes, se recomienda realizar en futuros estudios pruebas de patogenicidad para determinar si los hongos aislados representan algún problema para la planta de naranjilla.
- ❖ Llevar a cabo proyectos que demuestren los beneficios de los hongos identificados en este estudio, en los diferentes campos como: la industria, la agricultura, la farmacéutica, entre otros.
- ❖ Si se desea continuar con la investigación y se necesita de una identificación más precisa de algunos géneros de hongos, se debería utilizar técnicas moleculares como código de barras, otros locus como el LSU (Large subunit) o genes codificadores de proteínas como la β - tubulina.
- ❖ Para futuros análisis filogenéticos, una aplicación conjunta de los métodos *Neighbor-Joining*, máxima parsimonia, máxima verosimilitud e inferencia bayesiana; resultarían ser eficaces para determinar que las topologías de los árboles obtenidos son concordantes y así poder establecer que la filogenia obtenida es robusta y confiable.
- ❖ Se debería continuar con la identificación de los 110 hongos restantes, para determinar las posibles actividades que cumplen en asociación con el cultivo de naranjilla.

REFERENCIAS

- Acosta, O., Pérez, A. y Vaillant, F. (2009). Chemical characterization, antioxidant properties, and volatile constituents of naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) cultivated in Costa Rica. *Sociedad Latinoamericana de Nutrición*, 59(1), 88-94. Recuperado de http://www.alanrevista.org/ediciones/2009-1/pdf/chemical_characterization_antioxidant_volatile_constituents_naranjilla_solanum_quitoense_costa_ri.ca.pdf
- Alexopoulos, C., Mims, C. y Blackwell, M. (1996). *Introductory; Mycology*. Estados Unidos: Jhon Wiley & Sons, Inc.
- Álvarez, L., Armengol, J., Pérez-Sierra, A., León, M., Abad-Campos, P., Vicent, A., Beltrán, C. y García-Jiménez, J. (2005). Detección de *Phoma exigua* var. *heteromorpha* en viveros de adelfa (*Nerium oleander* L.) en España. *Boletín de Sanidad Vegetal Plagas*, 31, 417-423. Recuperado de <http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/plagas/BSVP-31-03-417-423.pdf>
- Angulo, R. (2006). *Lulo: el cultivo*. Colombia: Fundación Universidad de Bogotá. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9589029795>
- Arauz, L. (1998). *Fitopatología; un enfoque agroecológico*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9977675392>
- Aveskamp, M., Gruyter, J., Woudenberg, J., Verkley, G y Crous, P. (2010). Highlights of the *Didymellaceae*: A pollyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*, 65, 1-60. doi: 10.3114/sim.2010.65.01
- Badii, M., Landeros, J. y Cerna, E. (2008). Patrones de asociación de especies y sustentabilidad. *International Journal of Good Conscience*, 3(1), 632-660. Recuperado de [http://www.spentamexico.org/v3-n1/3\(1\)%20632-660.pdf](http://www.spentamexico.org/v3-n1/3(1)%20632-660.pdf)

- Baxevanis, A. y Oullette, F. (2001). *Bioinformatics: A practical guide to the analysis of genes and proteins*. Recuperado de <http://www.bioon.com/book/biology/bioinformatics/chapter-14.pdf>
- Borkovich, K., Alex, L., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G., Read, N., ...y Pratt, R. (2004). Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: Tracing the path from genomic blueprint to multicelular organism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(1), 1-108. doi: 10.1128/MMBR.68.1.1-108.2004
- Buchan, A., Newell, S., Moreta, J. y Morán, M. (2002). Analysis of Internal Transcribed Spacer (ITS) regions of rRNA genes in fungal communities in a Southeastern U.S. Salt Marsh. *Microbial Ecology*, 43, 329-340. doi: 10.1007/s00248-001-1062-0
- Caicedo, L. (2014). *Estudio de la capacidad de carga y límites de cambio aceptable en la estación biológica Pindo Mirador, parroquia y cantón Mera, provincia de Pastaza*. (Tesis de pregrado, Universidad Tecnológica Equinoccial, Quito, Ecuador). Recuperado de repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/13495/1/56942_1.pdf
- Colwell, R. (2009). *Biodiversity: Concepts, Patterns, and Measurement. Communities and Ecosystems*. Recuperado de http://press.princeton.edu/chapters/s3_8879.pdf
- Contreras, C. (2006). *Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de Colletotrichum spp., obtenidos de frutos de Lulo (Solanum quitoense), tomate de árbol (Solanum Betacea), granadilla (Passiflora ligularis), mango (Mangifera indica) y tallos de mora (Rubus glaucus) con síntomas de antracnosis*. (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia). Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis239.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*. (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador). Recuperado de <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/7043/101.B03.000625.pdf?sequence=4>
- Lozano, J., Chamorro, L., Floriano, J., Vera, L. y Dimas, J. (2007). *Enfermedades y plagas del cultivo de lulo (Solanum quitoense) en el departamento de Huila*. Recuperado de Conecta Rural: [http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/Enfermedades y plagas del cultivo de lulo.pdf](http://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/Enfermedades_y_plagas_del_cultivo_de_lulo.pdf)
- Crous, P., Verkley, G., Groenewald, J. y Samson, R. (2010). *Fungal biodiversity*. The Netherlands: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht.
- Cruz-Reyes, A. y Camargo-Camargo, B. (2001). *Glosario de términos en parasitología y ciencias a fines*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9688568783>
- Capote, N., Pastrana, A., Aguado, A. y Sánchez-Torres, P. (2012). *Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance* doi: 10.5772/38011
- Davis, E., Franklin, J., Shaw, A. y Vilgalys, R. (2003). Endophytic *Xylaria* (Xylariaceae) among liverworts and angiosperms: phylogenetics, distribution, and symbiosis. *American Journal of Botany*, 90(11), 1661- 1667. Recuperado de <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/publications/Davis2003.pdf>
- Delgado, E., Vásquez, S. e Icaza, X. (2009). Actividad biológica de hongos endófitos presentes en dos plantas medicinales chuquirahua (*Chuquiragua jussieui* J. F. Gmel) y ñachag (*Bidens andicola* Kunth). *La Granja*, 9(1), 29-43. Recuperado de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/8748/1/Actividad%20biologica%20de%20hongos%20endofitos%20presentes%20en%20dos%20plantas%20medicinales%20chuquirahua.pdf>

- Durán, A., Mora, D. y Ramírez, L. (1998). *Enfermedades y otros problemas de las plantas: reconocimiento de campo*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9977675325>
- Elevitch, C. (2004). *The Overstory Book: Cultivating Connections with Tree*. Recuperado de <https://books.google.de/books?id=SAJQhK1fWDoC&printsec=frontcover&dq=The+Overstory+Book:+Cultivating+Connections+with+Tree>
- Evidente, A., Andolfi, A. y Cimmino, A. (2011). Fungal Phytotoxins for Control of *Cirsium arvense* and *Sonchus arvensis*. *Pest Technology*, 5(1), 1-17. Recuperado de [http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/PT_5\(SI1\)/PT_5\(SI1\)1-17o.pdf](http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2011/PT_5(SI1)/PT_5(SI1)1-17o.pdf)
- Fernández, E. (2008). *Sistemas silvopastoriles establecidos con Pinus radiata D. Don y Betula alba L. en Galicia: productividad, biodiversidad y sumideros de carbono*. (Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España). Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=N7NevZLv eeQC&pg=PA66&dq=indice+de+simpson&hl=es-419&sa=X&ved=0CCkQ6AEwA2oVChMI-fPDvJrRyAIVitQeCh1DTAiT#v=onepage&q=indice%20de%20simpson&f=false>
- Gamboa-Gaitán, M. (2006). Hongos endófitos tropicales: Conocimiento actual y perspectivas. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 3-20. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v11s1/v11s1a01.pdf>
- García, V. y Camargo, S. (1998). *Hongos fitopatógenos del clavel (Dianthus caryophyllus)*. *Tiempo*, 8(92). Recuperado de http://www.difusioncultural.uam.mx/casadeltiempo/92_sep_2006/casa_del_tiempo_num92_57_62.pdf
- Garzón, N. (2013). *Caracterización e identificación molecular de hongos de suelo aislados de los páramos de Guasca y Cruz Verde, Cundinamarca-Colombia*. (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia). Recuperado de <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/14584/1/GarzonGrajalesNatalia2013.pdf>

- Gliessman, S. (2002). *Agroecología: procesos ecológicos en agricultura sostenible*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?isbn=9977573859>
- Gomes, R., Glienke, C., Videira, S., Lombard, L., Groenewald, J. y Crous, P. (2013). *Diaporthe*: a genus of endophytic, saprobic and plant pathogenic fungi. *Persoonia*, 31, 1-41. doi: <http://dx.doi.org/10.3767/003158513X666844>
- González- Espinosa, M., Ramírez- Marcial, N. y Ruiz-Montoya, L. (2005). *Diversidad Biológica en Chiapas*. Recuperado de [https://books.google.com.ec/books? isbn=9707223995](https://books.google.com.ec/books?isbn=9707223995)
- Granados, C., Torrenegra, M., Acevedo, D. y Romero, P. (2013). Evaluación fisicoquímica y microbiológica del aperitivo vínico de lulo (*Solanum quitoense* L.). *Información Tecnológica*, 24(6), 35-40. doi: 10.4067/S0718-07642013000600006
- Gruyter, J., Van Gent-Pelzer, M., Wounderberg, J., Van Rijswick, P., Meekes, E., Crous, P. y Bonants, P. (2012). The development of a validated real-time (TaqMan) PCR for detection of *Stagonosporopsis andigena* and *S. crystalliniformis* in infected leaves of potato and tomato. *European Journal of Plant Pathology*, 134, 301-313. doi: 10.1007/s10658-012-9990-8
- Guayasamín, M. (2015). *Evaluación ex ante del impacto socio-económico del manejo convencional y mejorado del cultivo de naranjilla (Solanum quitoense) en el Ecuador*. (Tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador). Recuperado de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/4551/1/T-UCE-0004-17.pdf>
- Habibi, A., Banihashemi, Z. y Mostowfizadeh-Ghalamfarsa, R. (2015). Phylogenetic analysis of *Polystigma* and its relationship to *Phyllachorales*. *Phytopathologia Mediterranea*, 54 (1), 45-54. doi: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-14738

- Halfpeter, G., Soberón, J., Koleff, P. y Melic, A. (2005). *Sobre Diversidad Biológica: El significado de las Diversidades Alfa, Beta y Gamma*. Recuperado de <http://viceroy.eeb.uconn.edu/estimates/EstimateSPages/EstSUsersGuide/References/ChaoEtAl2005Sp.pdf>
- Hammer, Ø., Harper, D. y Ryan, P. (2001). *Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis*. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 9. Recuperado de http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96, 190-194. doi: 10.1094/PHYTO-96-0190
- Hernández, U. y Siqueiros, D. (2008). Cambios en la estructura de la asociación de diatomeas epifitas de *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. *Acta Botánica Mexicana*, 82, 43- 66. Recuperado <http://www.scielo.org.mx/pdf/abm/n82/n82a5.pdf>
- Heip, C., Herman, P. y Soetaert, K. (1998). Indices of diversity and evenness. *Océanis*, 24(4), 61-87. Recuperado de www.vliz.be/imisdocs/publications/221019.pdf
- Herrera, A. (2000). *La clasificación numérica y su aplicación en la ecología*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9993425125>
- Hibbett, D. y Donoghue, M. (1998). Integrating phylogenetic analysis and classification in fungi. *Mycologia*, 90(3), 347-356. Recuperado de http://donoghuelab.yale.edu/sites/default/files/075_hibbett_mycologia98.pdf
- Hillis, D. y Bull, J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing Confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42(2), 182-192. Recuperado de <http://www.zo.utexas.edu/faculty/antisense/papers/HillisandBull.pdf>
- Ho, H. (2009). The genus *Pythium* in Taiwan, China (1)- a synoptic review. *Frontiers of Biology in China*, 4(1), 15-28. doi: 10.1007/s11515-009-0009-6

- Hoyos, L., Jaramillo, S. y Orduz, S. (2008). Evaluación de *Trichoderma asperellum* como biorregulador de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*. *Revista Facultad Nacional de Agronomía–Medellín*, 61(2), 4496-4502. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179915376003>
- Hyde, K., Jones, E., Liu, J., Ariyawansa, H., Boehm, E, ... y Zhang, J. (2013). Families of Dothideomycetes. *Fungal Diversity*, 63 (1), 1-313. doi: 10.1007/s13225-013-0263-4
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2007). *Guía práctica para la exportación de la naranjilla a los Estados Unidos*. Naranjilla. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=7nqU6ceII8YC>
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. (2011). *Manejo fitosanitario para el cultivo de lulo*. Recuperado de [http://www.ica.gov.co/getattachment/de9f2f66-898a-45b8-848d-0c49a23ca70c/manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-lulo-\(solanum.aspx](http://www.ica.gov.co/getattachment/de9f2f66-898a-45b8-848d-0c49a23ca70c/manejo-fitosanitario-del-cultivo-de-lulo-(solanum.aspx)
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (1993). *Recolección de naranjilla (Solanum quitoense Lam.) en Ecuador*. Recuperado de <https://books.google.com/books?id=IXkzAQAAMAAJ>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2000). *Naranjilla: Híbrido interespecífico de alto rendimiento*. *Boletín divulgativo*, 276. Recuperado de <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Naranjilla%20INIAP%20PALORA.%20H%C3%ADbrido%20interespecifico%20de%20alto%20renimiento.pdf>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2011). Naranjilla (*Solanum quitoense Lam*): Tecnologías para mejorar la productividad y la calidad de la fruta. Recuperado de http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_sobipro&pid=54&sid=371:Naranjilla-Solanum-quitoense-Lam-Tecnologias-para-mejorar-la-productividad-y-la-calidad-de-la-fruta&Itemid=0

- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2012). *Manejo poscosecha, características físicas y nutricionales de la naranjilla para el desarrollo de pulpas y deshidratados*. Recuperado de [http://www.iniap.gob.ec/nsite /images/documentos/Manejo%20naranjilla.pdf](http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Manejo%20naranjilla.pdf)
- Jiang, S., Qian, D., Yang, N., Tao, J. y Duan, J. (2013). Biodiversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Angelica sinensis*. *Chinese Herbal Medicines*, 5(4), 264-271.
- Jones, E., y Pang, K. (2012). *Marine Fungi: and Fungal-like Organisms*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=RcF97cHppPsC&printsec=frontcover&dq=Marine+Fungi>
- Jones, E., Hyde, K. y Pang, K. (2014). *Freshwater Fungi: and Fungal-like Organisms*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=mXfnBQAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=Freshwater+Fungi:+and+Fungal-like+Organisms>.
- Joshi, A., Souframanien, J., Chand, R. y Pawar, S. (2006). Genetic diversity of *Cercospora canescens* (Elis & Martin) isolates, the pathogen of *Cercospora* leaf spot in legumes. *Current Science*, 90 (4), 564-568. Recuperado de http://www.academia.edu/7259486/Genetic_diversity_study_of_Cercospora_canescens_isolates_the_pathogngen_of_Cercospora_leaf_spot_of_legume
- Kaliňák, M., Barátová, V., Gallová, E., Ondrušová, Z. y Hudecová, D. (2013). Secondary metabolite production of *Epicoccum* sp. isolated from lignite. *Acta Chimica Slovaca*, 6 (1), 42-48. Recuperado de http://www.acs.chtf.stuba.sk/papers/acs_0143.pdf
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, M., Sturrock, S., Buxton, S. y 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

- Krebs, C. (1999). *Ecological Methodology*. Recuperado de http://www.zoology.ubc.ca/~krebs/downloads/krebs_chapter_12_2014.pdf
- Kruskal, J. (1964). Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a nonmetric hypothesis. *Psychometrika*, 9(1). Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02289565>
- Lacap, D., Hyde, K. y Liew, E. (2003). An evaluation of the fungal ‘morphotype’ concept based on ribosomal DNA sequences. *Fungal Diversity*, 12, 53-66. Recuperado de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/FD12-53-66.pdf>
- Larena, I. y Melgarejo, P. (2009). Development of a method for detection of the biocontrol agent *Penicillium oxalicum* Strain 212 by combining PCR and a selective medium. *Plant Disease*, 93, 919-928. doi 10.1094/ PDIS-93-9-0919
- Ledesma, R. (2008). Introducción al Bootstrap. Desarrollo de un ejemplo acompañado de software de aplicación. *Tutorials in Quantitative Methods for Psychology*, 4(2), 51-60. Recuperado de <http://www.tqmp.org/RegularArticles/vol04-2/p051/p051.pdf>
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales (3a ed.)*. Costa Rica: Agroamérica
Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?isbn=9290393955>
- Liu, Z., Yang, X., Sun, D., Song, J., Chen, G., Juba, O. y Yung, Q. (2010). Expressed sequence tags-based identification of genes in a biocontrol strain *Trichoderma asperellum*. *Molecular Biology Reports*, 37, 3673-3681. doi: 10.1007/s11033-010-0019-0
- Lizarraga, R., Panta, A., y Dodds, J. (1991). *Tissue culture for elimination of pathogens*,
Recuperado de http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNABJ738.pdf

- López, E. y Pérez, G. (1999). Métodos de análisis en la reconstrucción filogenética. *Boletín S.E.A*, 26, 45-56. Recuperado por http://www.sea-entomologia.org/PDF/BOLETIN_26/B26-006-045.pdf.
- López-Jácome, L., Hernández-Durán, M., Colín-Castro, C., Ortega-Peña, S., Cerón-González, G., y Franco-Cendejas, R. (2014). Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. *Investigación en discapacidad*, 3(1), 10-18. Recuperado de <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2014/ir141b.pdf>
- Marcial, M., Magalhães, K., Silva, C., Dias, D., Duarte, W. y Schwan, R. (2012). Culturable bacteria from soils of the Brazilian Cerrado in Minas Gerais state. *Prime Journal of Microbiology Research (PJMR)*, 2(6), 153-164. Recuperado de <http://www.primejournal.org/PJMR/pdf/2012/nov/Martin%20et%20al.pdf>
- Magno, E. (2009). Hongos. Recuperado de <http://puceftp.puce.edu.ec:2057/lib/pucesp/reader.action?docID=10312347>
- Magurran, A. (2004). Measuring biological diversity. Recuperado de http://www2.ib.unicamp.br/profs/thomas/NE002_2011/mayo10/Magurran%202004%20c2-4.pdf
- McLaughlin, D. y Spatafora, J. (2000). *Systematics and evolution. Part A*. Alemania: Springer Science & Business Media. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=tpnBqSZzw0kC&printsec>
- Mendelu, F. (2016). Phythopatholy practice. Recuperado de http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=155&typ=html
- Miranda, S. (2012). *Evaluación de componentes tecnológicos para el manejo integrado de plagas en naranjilla (Solanum quitoense Lam. Var. Iniap Quitoense) en Río Negro, provincia de Tungurahua*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador). Recuperado de <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/2215/1/Tesis-020agr.pdf>

- Mogollón, I., Moreno, S., Iturriaga, T. y Taddei, A. (2013). Análisis químico preliminar y actividad antimicrobiana de los extractos obtenidos de cuatro especies del género *Xylaria* genus. *Avances en Ciencias e Ingeniería*, 4(1), 75-83.
- Mohini, J. y Deshpande, J. (2010). Polymerase Chain Reaction: Methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research*, 1(5), 81-97. Recuperado de <http://www.ssjournals.com/index.php/ijbr/article/view/640>
- Molina, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de hongos patógenos presentes en lulo, tomate de árbol y mora de castilla potencialmente patógenos para los cultivos de gulupa (Pasiflora edulis var. Edulis sims.)* (Tesis de pregrado, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia). Recuperado de <http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8661/1/tesis614.pdf>
- Moreno, C. (2001). *Métodos para medir la biodiversidad*. Recuperado de <http://entomologia.rediris.es/sea/manytes/metodos.pdf>
- Narayan, P., Hyang, L., Ji, L., Kyu, S., Tae, R., Hye, K., Yeong, K., Young, Y. y Seung, Y. (2014). Endophytic fungi from *Lycium chinense* Mill and characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 15272-15286. doi: 10.3390/ijms150915272
- National Center Biotechnology Information. (2006). View Options for Nucleotide BLAST Services. *NCBI News*. 15(2). Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Web/Newsltr/V15N2/BLView.html>
- National Center Biotechnology Information. (2016). *Taxonomy*. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/taxonomyhome.html/>
- Nighat, F., Tariq, I., Syed, A., Muniba., J., Safia, A., Azhar. S. y Amara, M. (2016). *Epicoccum* sp., an emerging source of unique bioactive metabolites. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 73(1), 13-21. Recuperado de [http:// www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2016/013.pdf](http://www.ptfarm.pl/pub/File/Acta_Poloniae/2016/013.pdf)

- Olalde, V. y Aguilera, L. (1998). Microorganismos y biodiversidad. *Terra*, 16 (3). Recuperado de <http://chapingo.mx/terra/contenido/16/3/art289-292.pdf>
- Oliver, R. y Schweizer, M. (1999). *Molecular fungal biology*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?id=qBIOsAoSJLIC&printsec=frontcover&dq=molecular+fungal+biologym>
- Orellana, J. (2009). *Determinación de índices de diversidad florística arbórea en las parcelas permanentes de muestreo del Valle de Sacta*. (Tesis técnica, Cochabamba, Bolivia). Recuperado de <http://www.posgradosfor.umss.edu.bo/boletin/umss/05%20PASANTIAS/6%20pasantia.pdf>
- Park, J., Choi, G., Lee, H., Kim, K., Jung, H., Lee, S., Jang, J., Cho, K. y Kim, J. (2005). Griseofulvin from *Xylaria* sp. Strain F0010, an endophytic fungus of *Abiesholophylla* and its antifungal activity against plant pathogenic fungi. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15(1), 112-117. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/266277414_Griseofulvin_from_Xylaria_sp_Strain_F0010_an_Endophytic_Fungus_of_Abies_holophylla_and_its_Antifungal_Activity_Against_Plant_Pathogenic_Fungi
- Pawle, G. y Singh, S. (2014). Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of *Nigrospora* isolated from living fossil *Ginkgobiloba*. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 4(1), 1–9. doi:10.5943/cream/4/1/1
- Peay, K., Kennedy, P. y Bruns, T. (2008). Fungal community ecology: A hybrid beast with a molecular master. *BioScience*, 58(9), 799-810. Recuperado de http://web.stanford.edu/~kpeay/papers/Peay_BioSci_2008.pdf
- Pelaez, D. y Jiménez, A. (2001). Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos que afectan algunos cultivos de importancia económica en Bolivia. *Biofarbo*, 9(9) 21-26. Recuperado de <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rmbiofa20010903.pdf>

- Peña, C. (2011). Métodos de inferencia filogenética. *Revista peruana de biología*, 18(2), 265-267. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195022433023>
- Pérez, C. (2012). *Aislamiento de Trichoderma spp., nativos de Venezuela, promisorios para el control de Rhizoctonia solani (Kühn) en maíz (Zea mays L.)*. (Tesis de maestría, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela). Recuperado de http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/3243/1/T026800002592-0-Trabajofinal_CeciliaPerez-000.pdf
- Pérez-Vera, O., Yáñez-Morales, M., Alvarado-Rosales, D., Cibrián-Tovar, D. y García-Díaz, S. (2005). Hongos asociados a eucalipto, *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia*, 39, 311-318. Recuperado de <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2005/may-jun/art-8.pdf>
- Photita, W., Lumyong, S., Lyomyong, P., McKenzie, E. y Hyde, K. (2004). Are some endophytes of *Musa acuminata* latent pathogens?. *Fungal Diversity*, 16, 131-140. Recuperado de <http://www.fungaldiversity.org/fdp/sfdp/16-4.pdf>
- Photita, W., Taylor, P, Ford, R., Hyde, K. y Lumyong, S. (2005). Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. *Fungal Diversity*, 18, 117-133. Recuperado de <http://fungaldiversity.org/fdp/sfdp/18-9.pdf>
- Prada, H., Ávila, L., Sierra, R., Bernal, A. y Restrepo, S. (2009). Caracterización morfológica y molecular del antagonismo entre el endofito *Diaporthe* sp. aislado de frailejón (*Espeletia* sp.) y el fitopatógeno *Phytophthora infestans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 26(3), 198-201. doi:10.1016/j.riam.2009.01.002
- Prasetya, H., Saefuddin, A. y Muladno. (2011). Performance comparison between Kimura 2- parameters and Jukes- Cantor model in constructing phylogenetic tree of Neighbour Joining. *Forum Statistika dan Komputasi*, 16(1), 8-16. Recuperado de jagb.journal.ipb.ac.id

- Priatni, S. (2014). Review: Potential production of carotenoids from *Neurospora*. *Nusantara BIOSCIENCE*, 6(1), 63-68. Recuperado de <http://biosains.mipa.uns.ac.id/N/N0601/N060111.pdf>
- Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2010, febrero). *What is Biodiversity?. Come with us on a journey*. Recuperado de http://www.unep.org/wed/2010/english/PDF/BIODIVERSITY_FACTSHEET.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*. Recuperado de <https://www.promega.com/~media/Files/Resources/Protocols/Technical%20Manuals/0/Wizard%20Genomic%20DNA%20Purification%20Kit%20Protocol.pdf>
- Puerta, C. (2007). *Parásito, genoma y biología*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9587160010>
- Puerta, C. y Ureña, C. (2005). *Prácticas de Biología Molecular. Colección Biblioteca del Profesional*. Recuperado de <https://books.google.com.ec/books?isbn=9586837645>
- Quiroga, M. y Peniche, R. (1992). *Características generales de organismos pluricelulares*. Recuperado de http://www.conevyt.org.mx/bachillerato/material_bachilleres/cb6/5sempdf/biologia2/bio2_fasc1.pdf
- Quinchia, F. y Cabrera, A. (2006). *Manual Técnico del Cultivo de Lulo (Solanum quitoense L.) en el departamento del Huila*. Recuperado de <https://www.google.com.ec/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBwQFjAAahUKEwiLv4Wi9prIAhVGPT4KHQxAB6c&url=http%3A%2F%2Fwww.caminoalagro.com%2Fapp%2Fdownload%2F5688840519%2Fmanual%2Btecnico%2Bdel%2Blulo%2Ben%2Bel%2BHUILA-1.pdf%3Ft%3D1413813079&usq=AFQjCNGsX20OfjLHPCQOKoG2gaxTZFTQrQ&sig2=rCtOW3znSZ0gGDu8AE9nkw>

- Rada, A. y Taboada, G. (1998). Método de obtención y purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. *BIOFARBO*, 6(6), 63-67. Recuperado de <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa98060610.pdf>
- Ramírez, A. (2005). *Ecología aplicada: diseño y análisis estadístico*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9589029191>
- Reguero, M. (2014). La secuenciación del ADN: consideraciones históricas y técnicas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 16(1), 5-8. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/biote/v16n1/v16n1a01.pdf>
- Rehman, S., Shawl, A., Kour, A., Andrabi, R., Sudan, P., Verma, V. y Qazi, G. (2008). An endophytic *Neurospora* sp. from *Nothapodytes foetida* producing camptothecin. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44(2), 203-209. doi: 10.1134/S0003683808020130
- Raju, N. (2009). *Neurospora* as a model fungus for studies in cytogenetics and sexual biology at Stanford. *Journal of Biosciences*, 34(1), 139-159. Recuperado de <http://search.proquest.com/docview/236251610/5CD1C7F2BF6A4722PQ/1?accountid=13357>
- Revelo, J. y Sandoval, P. (2003). Factores que afectan la Producción y Productividad de la Naranjilla en la Región Amazónica del Ecuador. *FONTAGRO*, 5(28), 1-177. Recuperado de <http://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/2434/1/iniapsci281.pdf>
- Revelo, J., Viteri, P., Vásquez, W., Valverde, F., León, J. y Gallegos, P. (2010). *Manual del Cultivo Ecológico de la Naranjilla*. Ecuador: INIAP Recuperado de <https://books.google.com/books?id=KqUzAQAAMAAJ>

- Reyes, P. y Torres- Florez, J. (2009). Diversidad, distribución, riqueza y abundancia de condictios de aguas profundas a través del archipiélago patagónico austral, Cabo de Hornos, Islas Diego Ramírez y el sector norte del paso Drake. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 44(1), 243-251. Recuperado de http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0718-19572009000100025&script=sci_arttext
- Riveros, F., Muñoz, G., González, L., Rojas, L., Alvarez, M. & Hinrichsen, P. (2001). Comparación entre análisis morfológicos y de ADN para la identificación de especies de *Fusarium* aislados de melón (*Cucumis melo* L.). *Agricultura Técnica*, 61(3). Recuperado de http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-28072001000300004#Mcl
- Rodrigues, K., Leuchtman, A. y Petrini, O. (1993). Endophytic species of *Xylaria*: cultural and isozymic studies. *Sydowia*, 45(1), 116-138. Recuperado de http://www.zobodat.at/pdf/Sydowia_45_0116-0138.pdf
- Rogg, H. (2000). *Manejo integrado de plagas en cultivos de la Amazonía Ecuatoriana*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=9978416285>
- Rojas, C., Muñoz, L., Terán, V., Prado, F. y Quiñónez, M. (2010). *Evaluación de patógenos en clones de lulo (Solanum quitoense Lam.)*. *Acta Agronómica*, 59(2), 144-154. Recuperado de <http://www.scielo.org.co/pdf/acag/v59n2/v59n2a03.pdf>
- Ruiz, J. (2013). *Viaje al asombroso mundo de los hongos*. Recuperado de <http://puceftp.puce.edu.ec:2057/lib/pucesp/reader.action?docID=10418361>
- Saitou, N. y Nei, M. (1987). The *Neighbor-Joining* Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 945-967. Recuperado de <http://www.montefiore.ulg.ac.be/~lwh/IBIOINFO/Saitou-Nei-NJM-87.pdf>

- Saltos, N. (2012). Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino *Lulworthia grandispora*. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20gen%C3%B3mico%20y%20amplificaci%C3%B3n%20de%20la%20regi%C3%B3n%20ITS%20por%20PCR%20en%20el%20ascomicete%20marino%20Lulwo...Saltos,%20Nancy.pdf>
- Sánchez, J. (2011). *Introducción a la estadística no paramétrica y al análisis multivariado*. En (Eds). Ecuador.
- Sánchez- Fernández, R., Sánchez-Ortiz, B., Sandoval-Espinoza, Y., Ulloa, Benítez, A., Armendáriz-Guillén, B., García-Méndez, M. y Macías-Rubalcava, M. (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>
- Sánchez, S., Bills, G., García, B. y Zabalgogezcoa, I. (2004). Hongos asociados a gramíneas silvestres de pastos naturales. *Pastos y Ganadería*. 163-166. Recuperado de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/89944/1/Hongos%20asociados%20a%20gram%C3%ADneas%20silvestres%20de%20pastos%20naturales.pdf>
- Santos, J., Correia, V. y Phillips, A. (2010). Primers for mating- type diagnosis in *Diaporthe* and *Phomopsis*: their use in teleomorph induction in vitro and biological species definition. *Fungal Biology*, 114, 255-270. doi:10.1016/j.funbio.2010.01.007
- Scotch, C., Seifert, K., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J., Levesque, A., Chen, W., y Fungal Barcoding Consortium. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS*, 109, 6241-6246. Recuperado de <http://www.pnas.org/content/109/16/6241.full.pdf>

- Shenoy, B., Jeewon, R., Wu, W., Bhat, D. y Hyde, K. (2006). Ribosomal and RPB2 DNA sequence analyses suggest that *Sporidesmium* and morphologically similar genera are polyphyletic. *Mycological Research*, 110, 916-928. doi: 10.1016/j.mycres.2006.06.004
- Selliers, J. (2010). *Biodiversidad-el Consenso Científico*. Recuperado de <http://www.greenfacts.org/es/biodiversidad/biodiversidad-foldout.pdf>
- Solagro. (2006). *Naranjilla*. Recuperado de <http://www.solagro.com.ec/web/cultdet.php?vcultivo=Naranjilla>
- Somarriba, E. (1999). Diversidad de Shannon. *Agroforestería en las Américas*, 6 (23), 7274. Recuperado de <http://orton.catie.ac.cr/REPDO/A3377E/A3377E.PDF>
- Suaad, A. (2013). Molecular identification of isolated fungi from stored apples in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 20, 311–317. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1319562X13000491>
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S.(2013). *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*. Recuperado de http://kumarlab.net/pdf_new/TamuraStecher13.pdf
- Tanaka, M., Fukushima, T., Tsujino, Y. y Fujimori, T. (1997). Nigrosporins A and B, new phytotoxic and antibacterial metabolites produced by a fungus *Nigrospora oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61(11), 1848-1852. doi: 10.1271/bbb.61.1848
- Thermo Fisher Scientific. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer*. Recuperado de http://www.mlz-garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf

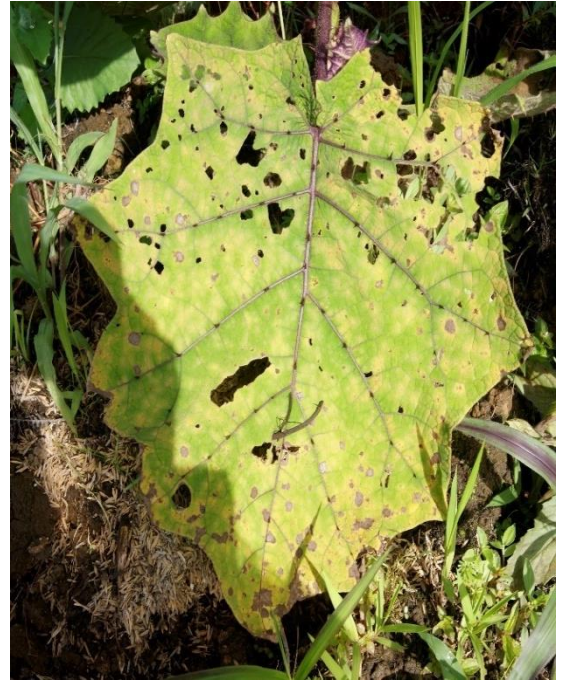
- Tipanluisa, S. (2011). *Evaluación de dos métodos de control (Práctica cultural y Microorganismos) contra Fusarium oxysporum en el cultivo de naranjilla (Solanum quitoense). Chaco- Napo*. (Tesis de pregrado, Universidad Técnica de Cotopaxi, Latacunga, Ecuador). Recuperado de <http://repositorio.utc.edu.ec/bitstream/27000/960/1/T-UTC-1256.pdf>
- Turrialba, C. (2006). *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza Nuestros Logros: Highlights2005*. Recuperado de <https://books.google.com/books?id=xxkO AQAAIAAJ>
- Udayanga, D., Liu, X., Crous, P., McKenzie, E., Chukeatirote, E. y Hyde, K. (2012). A multi- locus phylogenetic evaluation of *Diaporthe (Phomopsis)*. *Fungal Diversity*, 56, 157-171. doi: 10.1007/s13225-012-0190-9
- Valverde, F., Espinosa, J. y Bastidas, F. (2010). Manejo de la nutrición del cultivo de naranjilla (*Solanum quitoense* Lam.) en las zonas de producción de la región Amazónica y noroccidente de Pichincha. *Informaciones Agronómicas*, 79, 8-14. Recuperado de [http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/6C9D3ECA60CFE41D852579A0006A054B/\\$FILE/Inf-Agro%2079%20web.pdf](http://www.ipni.net/publication/ia-lahp.nsf/0/6C9D3ECA60CFE41D852579A0006A054B/$FILE/Inf-Agro%2079%20web.pdf)
- Varma, A. y Kharkwal, A. (2009). *Symbiotic Fungi: Principles and Practice*. Recuperado De <https://books.google.de/books?id=hPq2--5wiQYC&printsec=frontcover&dq=symbiotic+fungi:+principles+and+Practice>
- Villalba, S. (2005). *Plagas y enfermedades de jardines*. Recuperado de <https://books.google.com/books?isbn=8484764397>
- Wang, J., Xu, X., Mao, L., Lao, J., Lin, F., Yuan, Z. y Zhang, C. (2013). Endophytic *Diaporthe* from Southeast China are genetically diverse based on multi-locus phylogeny analyses. *World J Microbiol Biotechnol*, 30, 237-243. doi: 10.1007/s11274-013-1446-6

- White, T., Bruns, T., Lee, S., y Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. Innis, D. Gelfand, J. White, J. & White, T. *PCR protocols a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Recuperado de <http://nature.berkeley.edu/brunslab/papers/white1990.pdf>
- Zhang, N., Castlebury, L., Miller, A., Huhndorf, S., Schoch, C, ... y Sung, G. (2006). An overview of the systematics of the *Sordariomycetes* based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, 98(6), 1076-1087. Recuperado de <http://www.mycologia.org/content/98/6/1076.full.pdf+html>
- Zhao, J., Zhang, Y., Wang, L., Wang, J. y Zhang, C. (2012). Bioactive secondary metabolites from *Nigrospora* sp. LLGLM003, an endophytic fungus of the medicinal plant *Moringa oleifera* Lam. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 2107-2112. doi: 10.1007/s11274-012-1015-4
- Zhou, W., White, J., Soares, M., Torres, M., Zhou, Z. y Li, H. (2015). Diversity of fungi associated with plants growing in geothermal ecosystems and evaluation of their capacities to enhance thermotolerance of host plants. *Journal of Plant Interactions*, 10 (1), 305-314. Recuperado de <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/17429145.2015.1101495>

ANEXOS

Anexo 1.

Fotografías de hojas y plantas de naranjilla muestreadas.



Anexo 1.

.../... Continuación



Anexo 1.

.../... Continuación



Anexo 1.

.../... Continuación



Anexo 2.

Protocolo para extracción de ADN

El protocolo utilizado fue el recomendado por el fabricante para tejido vegetal (Promega, 2014). Así:

- Se raspó alrededor de 40 mg del micelio de los hongos aislados utilizando un bisturí estéril y se rompió el tejido con ayuda de un pistilo.
- Se añadió 600 µl de la solución de lisis nuclear, se mezcló en un vórtex y se incubó a 65°C por quince minutos.
- Se añadió 3 µl de solución de ARNasa, se mezcló por inversión de cinco minutos y se procedió a incubar a 37°C por quince minutos. Luego se dejó a cada una de las muestras por cinco minutos más a temperatura ambiente.
- Se colocó una solución de precipitación proteica y se mezcló rápidamente en el vórtex por veinte segundos. Luego se centrifugó a 13.000–16.000 gravedad (revoluciones por minuto) por 3 minutos. La solución formó un pellet.
- Con mucho cuidado, se removió el sobrenadante con el ADN y se lo transfirió a un tubo de 1,5 ml con 600 µl de etanol absoluto a temperatura ambiente. Se mezcló suavemente por inversión hasta que se verificó la formación de una masa de hebras de ADN.
- Se centrifugó a 13.000–16.000 gravedad por un minuto y se decantó el sobrenadante.
- Para lavar el ADN, se agregó 600 µl de etanol 70 %, se invirtieron los tubos varias veces y se centrifugó a 13.000-16.000 gravedad por un minuto.
- Se aspiró el etanol cuidadosamente con ayuda de una pipeta automática y se invirtieron los tubos sobre un papel absorbente donde se dejó secar el pellet por quince minutos.
- Se añadió 100 µl de solución de rehidratación de ADN a 65°C por una hora.

Finalmente, el ADN obtenido se cuantificó, colocando 0,5 µl de agua como blanco y 0,5 µl de cada muestra, por medio del fluoroespectrómetro *Nanodrop* (Thermo Fisher Scientific, 2009). El ADN fue mantenido a -20°C hasta el momento de la amplificación.

Anexo 3.

Pureza y concentración de ADN de los 156 aislamientos de hongos obtenidos de lesiones foliares de la naranjilla.

Muestra	Concentración (ng// μ l)	Pureza	Muestra	Concentración (ng// μ l)	Pureza	Muestra	Concentración (ng// μ l)	Pureza
1	2,9	1,4	25	4	5,43	49	11,2	2,03
2	13,2	1,77	26	1,8	4,41	50	3,4	4,63
3	20,8	1,61	27	3,7	4,57	51	34,2	2,02
4	1,9	1,88	28	1,5	1,49	52	9,6	2,06
5	1,8	1,5	29	8,3	2,7	53	43,4	1,84
6	5,9	2,05	30	37	1,9	54	9,3	2,29
7	22,6	1,9	31	182,5	1,24	55	3,5	7,55
8	3,5	3,75	32	39,2	1,6	56	21,9	2,1
9	2,9	2,47	33	3	1,77	57	6,7	3,21
10	6,4	2,24	34	7,4	1,28	58	22,4	1,91
11	1,7	3,36	35	9,8	2,7	59	16,2	1,98
12	13,7	2,37	36	8,6	2,65	60	44,2	1,86
13	3,5	4,47	37	19,3	2,21	61	20,8	2,05
14	4	4,31	38	34,1	2,1	62	3,7	4,02
15	51	1,88	39	2,9	2,3	63	22,6	2,5
16	23,9	1,99	40	18,5	1,9	64	9,1	2,43
17	9,8	2,63	41	29	1,88	65	14,8	2,39
18	66,4	1,8	42	18	1,94	66	6,8	2,45
19	2,7	1,94	43	20,1	1,91	67	4,1	2,92
20	39,8	1,77	44	6,1	3,71	68	13,3	2,16
21	26	1,78	45	102,3	1,34	69	19,4	1,63
22	9,3	2,64	46	18,2	2,14	70	5,2	3,5
23	15,3	1,9	47	34,4	1,74	71	5,3	2,28
24	5,5	3,32	48	6,9	2,08	72	10,5	2,1

Anexo 3.*.../... Continuación*

Muestra	Concentración (ng//µl)	Pureza	Muestra	Concentración (ng//µl)	Pureza	Muestra	Concentración (ng//µl)	Pureza
73	3,7	4,17	96	4,7	1,83	119	37,2	1,81
74	12,7	1,88	97	1,5	1,29	120	11,7	1,39
75	33,2	1,94	98	16,8	2,23	121	35,3	1,69
76	7	1,65	99	41,2	1,68	122	18	1,74
77	3,4	2,43	100	44,3	1,8	123	32,5	1,58
78	24,7	1,65	101	16,3	2,06	124	7,7	1,68
79	23,9	1,8	102	14,1	2,13	125	10,4	1,8
80	3,5	1,66	103	50,9	1,62	126	34,4	1,8
81	12,1	1,71	104	19,4	1,57	127	7,5	1,15
82	28,6	1,63	105	21,1	1,85	128	2,3	1,62
83	18,3	1,92	106	9,6	1,53	129	1,5	1,7
84	23	1,6	107	5	1,45	130	3,7	1,26
85	7,4	1,55	108	14,3	1,75	131	5,5	1,39
86	22,2	1,69	109	10,8	1,53	132	12,8	1,6
87	1	1,05	110	3,3	1,79	133	19,4	1,82
88	8,7	1,49	111	43	1,42	134	7,3	1,37
89	9,8	1,64	112	36	1,71	135	2,3	1,09
90	51,7	1,75	113	29,5	1,6	136	9,8	1,6
91	2,8	1,3	114	1,2	1,19	137	11,7	1,39
92	4,5	1,42	115	8	1,4	138	44,4	1,84
93	4,6	1,5	116	3,3	1,32	139	6	1,57
94	2,8	1,54	117	12,8	1,6	140	12,6	1,84
95	7,1	2,52	118	10	1,62	141	13,3	1,62

Anexo 3.

.../... Continuación

Muestra	Concentración (ng/ μ l)	Pureza
142	13,4	1,64
143	5,6	1,26
144	40,3	1,6
145	22,7	1,63
146	20,2	1,62
147	30,6	1,68
148	32,4	1,78
149	23	1,84
150	48	1,74
151	48,8	1,65
152	10,1	1,74
153	16	1,2
154	17,5	1,81
155	28,6	1,76
156	134,9	1,56

Anexo 4.

Géneros y especies obtenidas de 156 aislados de hongos de todas las localidades estudiadas.

Géneros y especies de hongos
<i>Colletotrichum sp.</i>
<i>C.acutatum</i>
<i>C. boninense</i>
<i>C. fructicola</i>
<i>C. gloeosporioides</i>
<i>C. karstii</i>
<i>C. kahawae subsp. ciggaro</i>
<i>C. lupini</i>
<i>C. nicotianae</i>
Diaporthe sp.

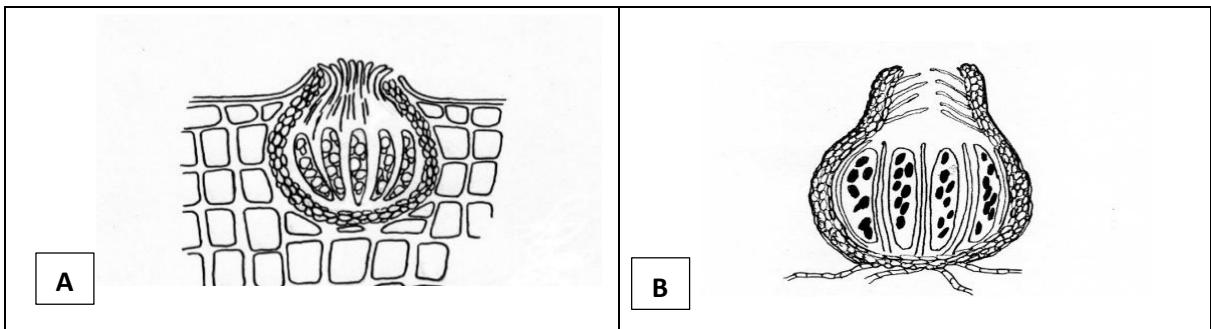
Anexo 4.

.../... Continuación

Géneros y especies de hongos
<i>D. citri</i>
<i>D. melonis</i>
<i>D. schini</i>
<i>D. paranensis</i>
<i>D. phaseolorum</i>
<i>D. terebinthifolii</i>
<i>Epicoccum sorghinum</i>
<i>Nemania diffusa</i>
<i>Neurospora sp.</i>
<i>N. tetrasperma</i>
<i>Nigrospora sp.</i>
<i>N. oryzae</i>
<i>Phomopsis sp.</i>
<i>P. asparagi</i>
<i>Phoma exigua var. exigua</i>
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>
<i>Trichoderma asperellum</i>
<i>Xylaria sp.</i>
<i>X. berteri</i>

Anexo 5.

Cuerpos fructíferos. A) Pseudotecio B) Peritecio.



Anexo 6.

Ejemplo de la secuencia y cromatograma obtenido del hongo L5N25_Colletotrichum lupini_JQ936134.1

GTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACTGAGTTACCGC
TCTATAACCCTTTGTGAACATACCTAGCCGTTGCTTCGGCGGGCAGGGGAAGC
CTCTCGCGGGCCTCCCCTCCCGGCCCGCCCCACCACGGGGACGGGGCGCC
CGCCGGAGGAAACCAAACCTCTATTTACACGACGTCTCTTCTGAGTGGCACAAG
CAAATAATTA AAACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGA
ACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA
ATCTTTGAACGCACATTGCGCTCGCCAGCATTCTGGCGAGCATGCCTGTTTCGAG
CGTCATTTCAACCCTCAAGCACCGCTTGGTTTTGGGGCCCCACGGCACACGTG
GGCCCTTAAAGGTAGTGGCGGACCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGTAGTAACTA
ACGTCTCGCACTGGGATCCGGAGGGACTCTTGCCGTA AAACCCCAAATTCTTT
ACAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCA

