

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Identificación del hongo fitopatógeno *Phoma* spp. aislado a partir de plantas de uvilla
(*Physalis peruviana* L.) en localidades de zona norte y centro-norte de la serranía
ecuatoriana.**

Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo

JAIME SEBASTIÁN AGUILAR ARMIJOS

Quito, 2020

Certifico que la Disertación de Licenciatura en Microbiología del Sr. Jaime Sebastián Aguilar Armijos ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna

Directora de la Disertación

Quito, 7 de enero de 2020

DEDICATORIA

Dedicado a mis padres Jaime Aguilar e Irene Armijos por el apoyo incondicional a lo largo de los años y por guiarme hacia la persona que soy en la actualidad.

A mis hermanas y sobrina por motivarme a ser un ejemplo y salir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por siempre ser una guía y apoyo incondicional a lo largo de toda mi carrera universitaria.

Gracias a mi directora de tesis Mtr. Jeniffer Yáñez por ser guía y apoyo durante esta investigación y por la confianza depositada en mí para colaborar en su proyecto.

A mis compañeros de laboratorio durante la tesis: Lucía Delgado, Ana Almeida y especialmente a Melany Paredes por ser quien estuvo conmigo en los momentos buenos y sobre todo en los difíciles.

Un especial agradecimiento a investigadores que apoyaron esta tesis como Claudia Terán, Nicole Coronel, Jairo Guevara, Martín Marcial, Juliana Checa y Nicolás Molina.

Finalmente, agradecer a todos mis profesores y amigos que conocí durante la carrera por las enseñanzas, conocimiento y buenos momentos que vivimos a lo largo de estos años.

El apoyo y enseñanzas de todas las personas mencionadas, principalmente familia y amigos, me convirtió en una mejor persona y profesional de la Patria.

Infinitas gracias.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

cm: Centímetros

g: Gramos

ITS: Espaciador interno transcrito (por sus siglas en inglés)

kg: Kilogramos

MEA: Agar extracto de malta (por sus siglas en inglés)

mg: Miligramos

ml: Mililitros

OMA: Agar harina de avena (por sus siglas en inglés)

PCR: Reacción en cadena de polimerasa (por sus siglas en inglés)

PDA: Agar papa dextrosa (por sus siglas en inglés)

μL: Microlitros

TABLA DE CONTENIDOS

1. RESUMEN. –.....	1
2. ABSTRACT. –.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIALES Y MÉTODOS	5
4.1. Muestreo y área de investigación.	5
4.2. Aislamiento del hongo fitopatógeno.....	5
4.3. Descripción macroscópica y microscópica.....	6
4.4. Caracterización bioquímica.	6
4.5. Identificación molecular del hongo.	7
4.6. Postulados de Koch.	8
5. RESULTADOS	9
5.1. Obtención de aislados fúngicos.	9
5.2. Caracterización fenotípica.	9
5.3. Caracterización bioquímica.	10
5.4. Caracterización genética.....	10
5.5. Postulados de Koch.	11
6. DISCUSIÓN	11
7. CONCLUSIONES	15
8. AGRADECIMIENTOS	16
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
10. FIGURAS	23
11. TABLAS	30
12. ANEXOS	35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesión característica de <i>Phoma</i> spp en órganos de plantas de uvilla	23
Figura 2. Crecimiento del aislado TR3 cultivado en agar harina de avena a 23° C.....	25
Figura 3. Crecimiento del aislado SH5 cultivado en agar papa dextrosa a 23° C.....	25
Figura 4. Observación microscópica del desarrollo de picnidios de cepa SH5 en agar harina de avena (21 días) a 23° C.....	26
Figura 5. Observación microscópica de clamidosporas en agar harina de avena (21 días) a 23° C.....	26
Figura 6. Observación microscópica de conidias de la cepa NJC2(1) en agar harina de avena (21 días) a 23° C.	27
Figura 7. Electroforesis de gel de agarosa 2% para PCR de regiones ITS y β - tubulina. 27	
Figura 8. Árbol filogenético para la región del gen ITS	28
Figura 9. Árbol filogenético para la región del gen β - tubulina.....	28
Figura 10. Lesiones producidas por <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i> , cepa NJC2(1), en hojas de uvilla.	29

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Localidades muestreadas.....	30
Tabla 2. Tamaño promedio de estructuras microscópicas después de 21 días de crecimiento.....	30
Tabla 3. Identificación molecular de las cepas en base a la comparación de las secuencias de los amplicones de ITS con aquellas secuencias depositadas en BLAST.	31
Tabla 4. Identificación molecular de las cepas en base a la comparación de las secuencias de los amplicones de β - tubulina con aquellas secuencias depositadas en BLAST.....	32
Tabla 5. Determinación semicualitativa del desarrollo de picnidios en las cepas	33
Tabla 6. Presencia de sintomatología en las plantas de uvilla después de 10 días de infección.....	33
Tabla 7. Identificación molecular de las cepas en base a la comparación de las secuencias de los amplicones de ITS con aquellas secuencias depositadas en BLAST	34

LISTA DE ANEXOS

Figura 11. Observación macroscópica del crecimiento de los aislados fúngicos en OMA (7 días).....	35
Figura 12. Observación macroscópica del crecimiento de los aislados fúngicos en OMA (15 días).....	36
Figura 13. Observación macroscópica del crecimiento de los aislados fúngicos en OMA (21 días).....	36
Figura 14. Observación macroscópica del crecimiento de los aislados fúngicos en PDA (7 días).....	37
Figura 15. Observación macroscópica del crecimiento de los aislados fúngicos en PDA (15 días).....	38
Figura 16. Observación macroscópica del crecimiento de los aislados fúngicos en PDA (21 días).....	39

Identificación del hongo fitopatógeno *Phoma* spp. aislado a partir de plantas de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en localidades de zona norte y centro-norte de la serranía ecuatoriana.

Sebastián Aguilar¹,

¹Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador.

1. RESUMEN. – La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una fruta endémica de países andinos, cuyo consumo se asocia con varios beneficios para la salud humana. Su cultivo es afectado por una diversidad de patógenos, siendo *Phoma* spp. uno de los que mayor impacto económico causa. Este estudio pretendió reportar por primera vez la presencia del patógeno *Phoma* spp. en cultivos de uvilla en Ecuador y esperamos contribuya al establecimiento de un protocolo para su adecuada detección. Para esta investigación se realizaron muestreos en las provincias de Pichincha, Imbabura y Cotopaxi. Los aislados fúngicos obtenidos a partir de partes de plantas afectadas fueron caracterizados fenotípica y molecularmente. Esto incluyó la descripción macroscópica y microscópica de la colonia en plato Petri, la prueba de mancha con hidróxido de sodio (NaOH), la amplificación y secuenciación de los genes ITS y β -tubulina. Las secuencias nucleotídicas fueron comparadas con la base de datos del NCBI y se identificaron 10 cepas del hongo *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*). Finalmente, se realizó Postulados de Koch, procedimiento que confirmó que las cepas aisladas son agentes causales de muerte descendente en plantas de uvilla sanas.

PALABRAS CLAVES: *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Physalis peruviana* L., muerte descendente, hongo fitopatógeno.

2. **ABSTRACT.** – Uvilla (*Physalis peruviana* L.) is an endemic fruit of Andean countries, whose consumption is associated with several benefits for human health. Its culture is affected by a variety of pathogens, being *Phoma* spp. one of the greatest economic impact causes. This study aimed to report for the first time the presence of the pathogen *Phoma* spp. in uvilla crops in Ecuador and we hope it contributes to the establishment of a protocol for its adequate detection. For this investigation samples were analyzed in the provinces of Pichincha, Imbabura and Cotopaxi. Fungal isolates obtained from parts of affected plants were characterized phenotypically and molecularly. This included the macroscopic and microscopic description of the Petri dish colony, the spot test with sodium hydroxide (NaOH), the amplification and sequencing of the ITS and β -tubulin genes. The nucleotide sequences were compared with the NCBI databases and 10 strains of the fungus *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*). Finally, Koch Postulates were performed, a procedure that confirmed that the determined strains are causative agents of descending death in healthy uvilla plants.

KEYWORDS: *Boeremia exigua* var. *exigua*, *Phoma exigua* var. *exigua*, *Physalis peruviana* L., descending death, phytopathogenic fungus.

3. INTRODUCCIÓN

La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una planta endémica de países andinos (García y Brito 2015). Se caracteriza por ser perenne, arbustiva y ramificada con procesos continuos de desarrollo y crecimiento que le proporcionan, junto con el ambiente específico en el que se desarrolla, las características morfológicas de la especie (Gardner et al. 1985). *Physalis peruviana* produce frutos redondos, amarillos, en forma de bayas de 1,25 - 2,5 cm de diámetro y 4 – 10 g de peso aproximadamente, en muchos países europeos es considerado como un alimento altamente apetecible por su sabor azucarado (Ligarreto et al. 2005). Además de poseer un valor nutricional excepcional con un elevado contenido de vitaminas A y C, vitaminas del complejo B, hierro y fósforo (Hermann 1994). Dentro de este género, la uvilla es considerada como una fruta beneficiosa para la salud humana, por poseer propiedades inmunoestimulantes, anticancerígenas, antibacterianas, antivirales y diuréticas (Ligarreto et al. 2005). El cultivo de uvilla requiere un buen manejo de condiciones agronómicas como fertilización, poda, calidad fitosanitaria y suministro de agua para controlar y mantener su productividad (Calvo 2009; Fischer et al. 2014).

En Ecuador, la producción de uvilla, destinada a la exportación del fruto fresco y elaboración de productos deshidratados y mermeladas, se concentra principalmente en provincias de la sierra como Imbabura, Tungurahua y Pichincha (Altamirano 2010). Las condiciones agroecológicas en estas provincias, como periodos constantes de luminosidad y temperatura estable la mayor parte del año, son idóneas para el buen crecimiento de la planta, lo que resulta en mejor coloración del fruto, alto contenido de azúcares y almidones, características sumamente apetecidas en el mercado internacional (Nieto 2010). Por este motivo, a partir del año 2012, se ha incrementado, en estas zonas, la producción de uvilla para exportación, constituyendo una alternativa económica para el Ecuador. En el año 2019, el país exportó, a

Europa, América y Asia, aproximadamente 14 000 kilogramos con un precio de USD 2,70/kg, lo que representa un ingreso de USD 37 800 (Estadísticas económicas 2018; Tapia 2019).

La mayoría de los agricultores dedicados al cultivo de uvilla en Ecuador, son pequeños y medianos productores que utilizan sistemas agrícolas semitecnificados con una fertilización deficiente y en algunos casos utilización de agroquímicos para el control de plagas y enfermedades. Estos sistemas presentan una serie de deficiencias como producción en monocultivo, ausencia de métodos adecuados de poda y suministro de riego, que promueven la susceptibilidad del cultivo de uvilla a una diversidad de patógenos, tanto bacterianos como fúngicos, reflejándose en pérdidas de entre 15 y 20% de la cosecha total (Altamirano 2010).

Por lo general, los agentes patógenos presentes en esta planta son los hongos: *Fusarium oxysporum* (Yáñez et al. 2019), *Alternaria alternata* (Zapata et al. 2002; Bósquez 2018), *Botrytis* sp. y *Phoma* sp (Chicaiza 2008). Éste último es uno de los patógenos infecciosos más importantes de la uvilla, reportado únicamente en Colombia como agente causal de la enfermedad conocida como “muerte descendente o “secamiento terminal de brotes y tallos de plantas de uvilla” (Góngora y Rojas 2006). En efecto, *Phoma* spp. es un hongo fitopatógeno picnidial, generalmente presente en suelo o tejido vegetal muerto, perteneciente a la familia Didymellaceae (Aveskamp et al. 2010). Cuando éste afecta a plantas de uvilla puede causar necrosis o pudriciones en tallos, ramas, hojas, peciolo y capachos de los frutos (García et al. 2015). Según el estudio realizado por Aveskamp et al. (2010) sobre la caracterización de *Phoma* y géneros pleoporaleanos relacionados, con base en códigos de barras de ADN, se estableció el nuevo género *Boeremia* para representar especies que son estrechamente relacionadas y morfológicamente similares a lo que hasta en ese entonces se conocía como *Phoma exigua*.

El correcto diagnóstico de enfermedades en uvilla es muy limitado o casi nulo en el país, por lo que una investigación sobre este patógeno, su prevalencia y distribución geográfica, es de

vital importancia. Así, el objetivo de este estudio fue generar un primer reporte de la presencia de *Phoma* spp. como agente causal de muerte descendente en cultivos de uvilla en la serranía ecuatoriana.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Muestreo y área de investigación.

El área de estudio comprendió la zona centro- norte de la serranía ecuatoriana y se limitó a cuatro localidades pertenecientes a las provincias de Pichincha (Tabacundo, cantón Pedro Moncayo), Imbabura (Niño Jesús y San Luis de Ichisí, cantón Otavalo) y Cotopaxi (cantón Sigchos). El muestreo aleatorio estratificado fue dirigido únicamente a plantas presuntamente enfermas con muerte descendente en cultivos de uvilla, en base a la sintomatología presentada (J. Miño, comunicación personal, 13 marzo de 2019). Se recolectaron hojas, capachos y frutos que presentaron manchas necróticas, las cuales fueron colectadas en fundas estériles de cerrado hermético, etiquetadas y georeferenciadas. Posteriormente fueron transportadas y almacenadas en el laboratorio en cadena de frío a cuatro grados centígrados para su posterior análisis, después de máximo 24 horas.

4.2. Aislamiento del hongo fitopatógeno

Las partes recolectadas de plantas enfermas se lavaron con agua potable, con el fin de quitar restos de tierra o detritos vegetales. Luego, se diseccionaron segmentos, de aproximadamente un cm², de las lesiones presentes en los órganos sintomáticos. Para desinfectar dichas secciones se colocaron por un minuto en hipoclorito de sodio al 2% y se realizaron tres enjuagues con agua estéril (Agrios 2005). Después, se sembraron cortes de estas secciones en cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) suplementado con gentamicina a una concentración de 2 mg/ml. Éstas se incubaron a 23 ± 2 °C por siete a 14 días (Curvelo y Rojas 2010). Finalmente, aquellos aislados que presentaron características macroscópicas similares a

Phoma spp. se purificaron en medios PDA y agar harina de avena (OMA por sus siglas en inglés) (bajo las mismas condiciones de incubación previamente descritas) hasta conseguir un cultivo axénico (Curvelo et al. 2010).

4.3. Descripción macroscópica y microscópica.

Para la descripción macroscópica se registraron las características morfológicas de las colonias (color, textura, bordes y presencia de exudados) a partir de los cultivos axénicos obtenidos en PDA y OMA cada siete, 15 y 21 días a 23 ± 2 °C de incubación. Al final del periodo de incubación, estos fueron utilizados para la observación de estructuras microscópicas características de *Phoma* spp. como picnidios, clamidosporas y esporas, mediante el método de placa en fresco y cinta adhesiva con azul de lactofenol (Larone 1976). Adicionalmente, se determinó el promedio del tamaño de cada una de las estructuras mencionadas ($n = 5$) para cada uno de los aislados obtenidos, mediante la herramienta informática Dino Lite Digital Microscope (AnMo Electronics Corporation 2016).

Para identificar los aislamientos fenotípicamente, se compararon las características obtenidas con literatura de referencia sobre la identificación del género *Phoma* spp. (Domsch et al. 2007; Aveskamp et al. 2009).

4.4. Caracterización bioquímica.

Se realizó la prueba de mancha con NaOH que sirve para diferenciar entre especies de *Phoma*. Esto consiste en aplicar una gota del reactivo (NaOH 1N) sobre el margen de la colonia creciente de siete días de incubación en agar extracto de malta (MEA, por sus siglas en inglés) a temperatura ambiente (23° C) y después de 10 minutos se observa la formación de una mancha o anillo verdoso, esta reacción colorimétrica es característica de la especie *Phoma exigua* principalmente, aunque existen especies que resultan ser negativas para la prueba como *Phoma exigua* var. *inoxydabilis* (Boerema y Howeler 1967; Domsch et al. 2007).

4.5. Identificación molecular del hongo.

El ADN de los aislados se extrajo utilizando el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA), siguiendo el protocolo para tejidos de plantas y levaduras que sugiere el fabricante. La concentración del ADN fue analizada por espectrofotometría (α 260 nm) usando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

Mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se amplificó la región ITS comprendida entre los genes 18S ARNr y 28S ARNr, utilizando los cebadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'), mediante el protocolo descrito por White et al. (1990). Además, se amplificó el gen β - tubulina (tub1), utilizando los cebadores T1 (5' AACATGCGTGAGATTGTAAGT 3') y T2 (5' TAGTGACCCTTGGCCCAGTTG 3') descritos por Glass y Donaldson (1995). Para esto, se utilizó el kit comercial GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) con un volumen final de 25 μ L y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los productos de PCR obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 2% (60 minutos/95 voltios), con su respectiva escalera molecular 100 bp DNA Ladder (Promega, Madison, WI, USA) y controles negativos. Estos fueron purificados y secuenciados mediante el método de Sanger por Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon mediante el programa MEGA X 10.1 (Kumar et al. 2016). Finalmente, las secuencias consenso obtenidas se compararon con bases de datos disponibles en el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) mediante la herramienta informática básica de búsqueda de alineación local (BLAST, por sus siglas en inglés) (Altschul et al. 1990).

Adicionalmente, se determinó la relación filogenética mediante la herramienta informática RAxML, utilizando el método de máxima verosimilitud con un *Bootstrap* de 1000 réplicas

(NCBI 1987) y con los grupos externos *Didymella vitalbina* para ITS y *Boeremia trachelospermi* para el gen β - tubulina (Aveskamp et al. 2010).

Para la identificación y confirmación de la identidad del hongo fitopatógeno, los ensayos moleculares se llevarán a cabo, antes y después de la realización de los postulados de Koch.

4.6. Postulados de Koch.

Se utilizaron plántulas de uvilla sanas, de 17 días de edad, obtenidas de la empresa Terrafertil, ubicada en Tabacundo, Pichincha. Estas fueron sembradas en macetas con sustrato estéril de vermiculita PRO-MIX® (PGX, Quebec, Canadá). Éstas se distribuyeron de acuerdo a un diseño completo al azar (Sánchez 2011), en invernadero con una temperatura aproximada de 28 °C y 34 % de humedad, ubicado en las instalaciones de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – AGROCALIDAD, Tumbaco.

La preparación del inóculo consistió en tomar pedazos de agar con micelio de 0,5 cm de diámetro de seis diferentes cepas de 21 días de crecimiento, seleccionadas por presentar una mejor producción de estructuras microscópicas (picnidios) en OMA, e inocularlos en matraces con un medio líquido enriquecido con dextrosa, extracto de levadura y peptona con un pH de 5,6. Los matraces se incubaron a 23 grados centígrados durante cinco días en obscuridad y constante agitación para incrementar la producción de clamidosporas y esporas (Castellanos 2011a). El inóculo se estandarizó a una concentración de 1×10^6 conidios ml, mediante recuento en cámara de Neubauer según el protocolo de Cañedo y Ames (2004), independientemente de la concentración de otras estructuras fúngicas también presentes en las suspensiones.

La inoculación se realizó por triplicado con dos tratamientos independientes, uno con laceración de las hojas, mediante el uso de agujas hipodérmicas, y otro sin laceración. Las suspensiones se asperjaron en las plantas humedeciendo toda la superficie de las hojas tanto al haz como el envés. Después de 10 días, se evaluó el desarrollo de la sintomatología característica que

produce *Phoma* en las plántulas inoculadas (Castellanos et al. 2011b) y finalmente se recuperó el hongo fitopatógeno mediante la metodología referida anteriormente.

5. RESULTADOS

5.1. Obtención de aislados fúngicos.

A partir de los órganos de plantas de uvilla (hojas y capachos) con síntomas característicos como manchas necróticas de color café o verde claro y presencia de puntos pequeños de color negro en el centro de la lesión (picnidios) (Figura 1), se obtuvieron varios aislamientos fúngicos con diferentes características morfológicas. De éstas, se seleccionaron 10 cepas compatibles (Tabla1) con las características macroscópicas típicas de *Phoma* spp. descritas en la siguiente sección.

5.2. Caracterización fenotípica.

En medio OMA, se observó un crecimiento óptimo del hongo con características morfológicas más desarrolladas y bibliográficamente relacionadas al género. Las colonias presentaron una tonalidad oscura en el centro y crema o verde oliva en la periferia, bordes irregulares y textura aterciopelada. En algunos casos asemejando halos (cepas SH5, SLH13 y SH6) en los primeros siete días. Además, del desarrollo de picnidios que macroscópicamente se visualizan como puntos de color negro en la colonia verde oliva o grisácea oscura, a partir de los 15 hasta los 21 días de incubación (Figura 2).

Por otro lado, en medio PDA se observó un crecimiento colonial lento de la mayoría de los aislados fúngicos obtenidos hasta los 21 días y se caracterizó por presentar bordes irregulares, textura aterciopelada, superficie plana, colonia de color crema o verde oliva con halos concéntricos de ligeras tonalidades oscuras en el anverso y reverso como se observa en la (Figura 3).

Para la descripción microscópica se utilizó los aislados obtenidos en OMA por un mejor desarrollo del hongo. Esta caracterización se basó en la observación y medición de estructuras microscópicas después de 21 días de incubación (Tabla 2).

En el caso de la observación de estructuras microscópicas, los picnidios, en donde se encuentran almacenadas las esporas, se observaron cómo aglomeraciones pigmentadas de color negro o café oscuro, globosas, de forma irregular desarrolladas en todo el micelio (Figura 4). Los rangos de tamaño que presentaron oscilaron entre 104,9 μm y 223,4 μm de diámetro (Tabla 2).

Por otro lado, se evidenció una mejor producción de clamidosporas del hongo cuando se cultivó en OMA. Aunque esta no fue abundante, las estructuras se observaron como cadenas simples, cortas y compactas muy parecidas a *Alternaria* (Figura 5), entre 11,4 – 15,9 μm de largo y 11,2 – 14,6 μm de ancho (Tabla 2).

Finalmente, se observaron conidias binucleadas, alargadas y ovaladas (Figura 6), con un tamaño promedio de 4,5 – 7,6 μm de largo y 2,3 – 3,9 μm de ancho (Tabla 2).

5.3. Caracterización bioquímica.

Los aislados SH6, TH7, NJH14, SLH13 dieron positivos para la prueba de mancha con NaOH al presentar un cambio de tonalidad a verde claro en los bordes de la colonia.

5.4. Caracterización genética.

Nueve de los 10 aislados fueron amplificados por los cebadores ITS1 e ITS4, obteniendo amplicones de 500pb, evidenciados tras la electroforesis en gel de agarosa 2%. Mientras que a partir de la región β - tubulina, amplificada con los cebadores T1 y T2, se generaron amplicones de 560 pb aproximadamente para ocho aislados y amplicones de 800 pb aproximadamente para las cepas TH7 y NJC2(1) (Figura 7).

Las secuencias nucleotídicas consenso (ITS y β -Tub), de cada uno de los aislados, fueron analizadas mediante la herramienta informática BLAST y presentaron un porcentaje de identidad $\geq 97\%$ con el hongo fitopatógeno *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*) (Tabla 3 y 4).

A partir de las secuencias nucleotídicas obtenidas para la región del gen ITS y β tubulina se realizaron árboles filogenéticos con su respectivo grupo externo, mostrando una relación filogenética entre las secuencias de las cepas identificadas en este estudio y las secuencias curadas obtenidas de los estudios de Aveskamp et al. (2010) y Vu et al. (2019), depositadas en el GenBank (Figura 8 y 9).

5.5. Postulados de Koch.

Después de 10 días post-infección en las plántulas de uvilla sanas, con las seis cepas seleccionadas (Tabla 5), se determinó la presencia de sintomatología característica de la enfermedad “muerte descendente” (Tabla 6). Finalmente se recuperó e identificó molecularmente cinco de las seis cepas obtenidas del tejido vegetal infectado (Tabla 7). La cepa NJC2(1) fue la que mayor patogenicidad presentó afectando al 100% de las plantas inoculadas (Figura 10).

La sintomatología producida por la infección de las cepas del hongo *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*) se caracterizó por presentar lesiones en los extremos de las hojas, principalmente. Estas se desarrollaron como manchas necróticas de color amarillento y café claro, de bordes y formas irregulares con poca presencia de picnidios en el centro de la lesión (Figura 14).

6. DISCUSIÓN

La correcta y rápida identificación de agentes causales de enfermedades en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) es clave para evitar pérdidas económicas, debido a la disminución de

su rendimiento y, por tanto, la baja en las exportaciones a países europeos, además de proporcionar información para el desarrollo de tratamientos adecuados y eficaces. Según datos proporcionados por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario (Agrocalidad), una de las enfermedades más común en *Physalis peruviana* L. es la “muerte descendente” causada por el hongo fitopatógeno *Phoma* spp. que puede causar una necrosis progresiva de la planta en poco tiempo (J. Guevara, comunicación personal, 9 noviembre 2019). En esta investigación se evidenciaron los síntomas en hojas y capachos de plantas enfermas en campo, de donde se obtuvieron los aislados del hongo fitopatógeno *Phoma* spp. Estos se caracterizaron por presentarse como manchas necróticas, poco definidas de color verde claro o café claro y en su zona central se observó puntos pequeños de color café oscuro a negro, donde se concentran los picnidios. Catarina (2014), reporta que, además de los órganos anteriormente mencionados, *Phoma* spp. puede atacar también a tallos y ramas de uvilla, presentando lesiones necróticas alargadas sin bordes definidos y con abundante presencia de picnidios.

Los aislamientos fúngicos obtenidos a partir de los órganos de las plantas recolectadas se caracterizaron por un crecimiento retardado con formación lenta o casi nula de estructuras de reproducción en medios como PDA. Por otro lado, el crecimiento del hongo en OMA fue más rápido, y la producción de estructuras como picnidios, clamidosporas y conidias se desarrollaron aproximadamente a los 15 días de incubación. Bibliográficamente, este hongo fitopatógeno se caracteriza por tener un crecimiento óptimo en medios OMA y MEA a una temperatura de 20-22 grados centígrados con periodos alternantes de luminosidad y oscuridad por 14 días, mientras una adecuada germinación de conidias ocurre entre 25- 28 grados centígrados (Domsch et al. 2007).

La correcta identificación de especies de *Phoma* spp. requiere de un enfoque polifásico que incluya técnicas de cultivo adecuadamente estandarizadas, un minucioso análisis de características como morfología colonial y estructuras microscópicas, complementado por un

preciso análisis molecular para una caracterización adecuada del hongo. Dentro de las claves fenotípicas para realizar una diferenciación inicial entre especies se encuentran la comparación de tamaño de las conidias, y la prueba de mancha con NaOH en MEA (Boerema 1997); en el presente estudio la mayoría de aislados presentó conidias oblongadas u ovaladas, biceluladas, con un rango de tamaño promedio de 4,5 – 7,6 μm de largo y 2,3 – 3,9 μm de ancho. Mientras tanto, los resultados obtenidos en la prueba de NaOH resaltan cuatro cepas positivas para la misma (SH6, TH7, NJH14, SLH13) y el resto de las cepas resultaron negativas por no presentar un cambio de tonalidad después de aplicar el reactivo. Basándose en las características previamente mencionadas se infiere que los aislados fenotípicamente caracterizada se trata de *Phoma exigua*, dado que esta especie se caracteriza por poseer conidias, oblongadas, biceluladas y con un tamaño entre 4 – 8,5 μm x 2 – 3 μm aproximadamente. Además de, generalmente, presentar una reacción de cambio de color a verde en presencia del reactivo NaOH, aunque existe una variedad que no manifiesta ninguna reacción en presencia del reactivo (*Phoma exigua* var. *inoxydabilis*) (Domsch et al. 2007). Sin embargo, este fenómeno se explicaría en base a la variabilidad genética dentro de la especie *Phoma exigua* (Abeln et al. 2002).

Por otro lado, el análisis molecular realizado mediante PCR con dos pares de cebadores específicos, ITS y β - tubulina, mostraron amplicones de tamaños adecuados en ambos casos 500 y 560 pb, respectivamente, en la mayoría de aislados fúngicos obtenidos excepto en dos aislados de β - tubulina obteniendo amplicones de 800 pb aproximadamente, aunque las longitudes de las secuencias nucleotídicas reportadas presentaron tamaños de 550 pb aproximadamente. Este resultado pudo producirse debido a una posible contaminación de las muestras con nucleasas, una inapropiada concentración de magnesio o posiblemente los cebadores utilizados (β -tubulina) contenían regiones complementarias adicionales dentro del molde de ADN (New England Biolabs 2019). Los nueve aislados que resultaron positivos para

la amplificación de la región del gen ITS pudieron ser identificados como *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*). En el caso del gen β - tubulina se obtuvo resultados positivos en los 10 aislados fúngicos obtenidos en este estudio, dando como resultado la identificación y confirmación molecular del aislamiento del hongo fitopatógeno *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*). Las secuencias nucleotídicas de las cepas obtenidas en este estudio están relacionadas filogenéticamente entre sí y con las secuencias comparadas depositadas en el GenBank. El árbol filogenético realizado para el gen β - tubulina proporcionó una mayor fiabilidad y robustez, presentando medidas de soporte cercanas a 100 en la mayoría de sus ramificaciones. Por otro lado, la información obtenida en el árbol para ITS mostró valores de soporte muy bajos o nulos en casi todas las ramas de las especies analizadas. Sin embargo, se presume que existe relación filogenética con un ancestro común al presentar una medida de soporte de 100 en un punto de ramificación que abarca a la mayor parte de las especies.

El género *Boeremia* fue introducido a la taxonomía fúngica debido a la gran cantidad de especies y alta complejidad para clasificar miembros de la familia Didymellaceae. Debido a que, Aveskamp y colaboradores (2010) realizaron una caracterización genética de *Phoma* y sus géneros relacionados mediante el uso de códigos de barras de ADN, esta técnica permite dilucidar la clasificación taxonómica entre especies (Hebert et al. 2003). El resultado obtenido fue la designación de este nuevo género en el cual se incluyeron especies que son morfológica y genéticamente similares entre sí, incluyendo a la especie conocida hasta ese entonces como *Phoma exigua* (Aveskamp et al. 2009). Debido a esta reclasificación, surge la importancia de denominar y reportar correctamente este hongo fitopatógeno como *Boeremia exigua*, que además resulta ser la especie tipo del género (Marin-Felix et al. 2017). Por este motivo, este estudio presenta la identificación y el reporte de *Boeremia exigua* var. *exigua* en lugar de el basionimio *Phoma exigua* var. *exigua*. No obstante, el nombre *Phoma* ha sido conservado

actualmente como sinónimo por ser la nomenclatura que aún se maneja entre laboratorios de diagnóstico fitopatológico y agricultores para identificar al microorganismo causante de la enfermedad “muerte descendente” en plantas de uvilla (J. Guevara, comunicación personal, 9 noviembre 2019).

Finalmente, se confirmó la identidad y patogenicidad de cinco de las cepas obtenidas como agente causal de la enfermedad “muerte descendente” mediante la realización de postulados de Koch en plántulas de uvilla sanas. El ensayo con la cepa SLH15 no fue positivo, se presume que fue debido a un error en la inoculación. Los síntomas que presentaron las plantas inoculadas con las cepas de *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*) son iguales a los bibliográficamente descritos por Catarina (2014), quien menciona que, en las hojas de uchuva, la sintomatología característica de *Phoma* se evidencia como un añublo foliar o mancha necrótica en forma de “V” de color marrón oscuro, tanto por el haz como por el envés del órgano, con presencia de picnidios.

7. CONCLUSIONES

Se reportó por primera vez en el país la presencia del hongo fitopatógeno *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*). en cultivos de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en las provincias de Pichincha, Cotopaxi e Imbabura pertenecientes a región Sierra del Ecuador. Las cepas del hongo fitopatógeno obtenidas fueron identificadas, caracterizadas y confirmadas como agente causal de “muerte descendente” en plántulas de uvilla sanas mediante la realización de postulados de Koch. Finalmente, la información proporcionada en este estudio permitirá estandarizar un protocolo adecuado para la detección y prevención eficaz de este patógeno en cultivos de uvilla, además, establecer lineamientos para futuras investigaciones sobre el control biológico de este patógeno.

8. AGRADECIMIENTOS

Esta investigación es resultado de la colaboración y apoyo financiero del proyecto “Diagnóstico de las enfermedades y de plagas en cultivos comerciales de uvilla (*Physalis peruviana*) en el Ecuador” perteneciente al laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador.

Adicionalmente un especial agradecimiento al laboratorio de fitopatología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – AGROCALIDAD por permitir el uso de sus invernaderos e instalaciones en el desarrollo de esta investigación y a la empresa Terrafertil por facilitar los muestreos realizados y proporcionar las plántulas de uvilla para el desarrollo de los postulados de Koch.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abeln E, Stax A, De Gruyter J, Van der Aa H. 2002. Genetic differentiation of *Phoma exigua* varieties by means of AFLP fingerprints. *Mycological Research*. 106 (4): 419–427.
- Agrios G. 2005. *Plant Pathology* (5ta Ed.): Florida (Estados Unidos): Elsevier Academic Press.
- Altamirano M. 2010. Estudio de la cadena productiva de uvilla (*Physalis peruviana* L.) en la Sierra Norte del Ecuador [Tesis de pregrado]. [Quito (Ecuador)]: Universidad San Francisco de Quito.
- Altschul S, Gish W, Miller E, Myers E, Lipman D. 1990. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Elsevier [Internet]. [citado 2019 Jun 20]; 215(Art. 3). Disponible en: [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- Aveskamp M, de Gruyter J, Woudenberg J, Verkley G, Crous P. 2010. Highlights of the Didymellaceae: A polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology*. 65: 1–60.

- Aveskamp M, Verkley G, de Gruyter J, Murace M, Perelló A, Woudenberg J, Groenewald J, Crous P. 2009. DNA phylogeny reveals polyphyly of *Phoma* section *Peyronellaea* and multiple taxonomic novelties. *Mycologia* [Internet]. [citado 2019 Nov 13]; 101(Art. 3). Disponible en: <https://doi.org/10.3852/08-199>.
- Boerema G, Howeler, L. 1967. *Phoma exigua* Desm. and its varieties. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 5(1): 15-28.
- Boerema G. 1997. Contribution towards a monograph of *Phoma* (Coelomycetes) - V. Subdivision of the genus in sections. *Mycotaxon*. 64: 321- 333.
- Bósquez C. 2018. Caracterización morfológica y molecular de *Alternaria alternata* hongo fitopatógeno causante del secamiento descendente del cáliz, en frutos de *Physalis peruviana* en la Sierra centro-norte del Ecuador [Tesis de pregrado]. [Quito (Ecuador)]: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Calvo I. 2009. El cultivo de la uchuva (*Physalis peruviana*) Área: Manejo integrado de cultivos/ frutales de altura [Internet]. San José (Costa Rica): Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria; [citado 2019 Ene 4]. Disponible en: <http://www.platicar.go.cr/images/buscador/documents/pdf/09/00229-plantonpacayascultivouchuva.pdf>
- Cañedo V, Ames T. 2004. Manual de laboratorio para manejo de hongos entomopatógenos. Lima (Perú): Centro Internacional de la Papa.
- Castellanos G, Jara C, Mosquera G. 2011a. Producción de micelio en medio líquido para extracción de ADN. En: Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Cali (Colombia): CIAT. p. 29-35.

- Castellanos G, Jara C, Mosquera G. 2011b. *Phoma exigua* var. *diversispora* Enfermedad: Ascoquita. En: Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Cali (Colombia): CIAT. p. 1-25
- Catarina, P. 2014. Uchuva (*Physalis peruviana*) fruta andina para el mundo. Murcia (España): Cebas- CSIC. p. 56-59.
- Chicaiza G. 2008. Inventario de enfermedades fungosas de la uvilla (*Physalis peruviana*) en las parroquias de Yaruquí y Amaguaña del cantón Quito, Provincia de Pichincha [Tesis de grado]. [Guaranda (Ecuador)]: Universidad Estatal de Bolívar.
- Curvelo L, Rojas L. 2010. Revisión preliminar de medios de cultivo empleados en estudios de microorganismos de los phylums Ascomycetes, Deuteromycetes y Oomycetes como agentes causantes de enfermedades en plantas [Tesis de pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana.
- Dino Lite Digital Microscope [Internet]. 2016. AnMo Electronics Corporation; [citado 2019 Mar 22]. Disponible en: <https://www.dino-lite.com/>
- Domsch K, Gams W, Anderson T. 2007. Compendium of Soil Fungi (2da Ed.). Koenigstein (Alemania): IHV-Verlag Eching.
- Estadísticas económicas [Internet]. 2018. Estadísticas Macroeconómicas. Quito (Ecuador): Banco Central del Ecuador; [citado 2019 Feb 17]. Disponible en: <https://www.bce.fin.ec/index.php/estadisticas-economicas>
- Fischer G, Almanza P, Merchán S, Miranda D. 2014. Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). Revista Brasileña de Fruticultura [Internet]. [citado 2019 Ene 09]; 36(Art. 1). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1590/0100-2945-441/13>.

- García M, Brito B. 2015. Uchuva (*Physalis peruviana*) fruta andina para el mundo. Murcia (España): Cebas- CSIC.
- Gardner F, Pearce R, Mitchell R. 1985. *Physiology of Crop Plants* (2da Ed.). Iowa (Estados Unidos): Elsevier Science.
- Glass N, Donaldson G. 1995. Development of primer sets designed for use with PCR to amplify conserved genes from filamentous. *American Society Microbiology*. 61(4): 1323-1330.
- Góngora A, Rojas P. 2006. Incidencia de las enfermedades en uchuva *Physalis peruviana*, por estado fenológico y de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de Cundinamarca. [Tesis de pregrado]. [Bogotá (Colombia)]: Pontificia Universidad Javeriana.
- Grinbergs D, France A, Varrelmann M. 2016. First Report of *Boeremia exigua* var. *exigua* (syn. *Phoma exigua* var. *exigua*) Causing Black Root Rot on Industrial Chicory (*Cichorium intybus* var. *sativum*) in Chile. *The American Phytopathological Society* [Internet]. [citado 2019 Nov 30]; 100 (Art. 11). Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0591-PDN>
- Harman D. 2004. Radicales libres, envejecimiento y enfermedad. *Revista Argentina sobre Antioxidantes*. 45(6): 122-130.
- Hebert P, Cywinska A, Ball S, DeWaard J. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London*. 270: 313- 321.
- Hermann K. 1994. About the ingredients and the use of important exotic fruits. *Solanaceae Friichte. The industrial fruit and vegetable recycling Ling*. 6(2): 202- 206.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* [Internet]. [citado 2019 mar 22]; 33(Art. 7). Disponible en: <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Larone D. 1976. *Medically Important Fungi a Guide to Identification*. Nueva York (Estados Unidos): Harper and Row Publishers.
- Ligarreto G, Lobo M, Correa A. 2005. Recursos genéticos del género *Physalis* en Colombia. En: Fischer G, Miranda D, Piedrahita W, Romero J. *Avances en cultivo, poscosecha y exportación de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) en Colombia*. Bogotá (Colombia): Universidad Nacional de Colombia, Unibiblos. p. 9-27.
- Macrogen Inc. [Internet]. 2018. Seúl (Corea): Macrogen Inc.; [citado 2019 jun 20]. Disponible en: <https://dna.macrogen.com/esp/>
- Martin- Felix Y, Groenewald L, Cai Q, Chen S, Marincowitz I, Barnes K, Bensch U, Braun E, Camporesi U, Damm Z, et al. 2017. Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies in Mycology*. 86: 99–216.
- National Center for Biotechnology Information. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*. 4(4): 406-25.
- New England Biolabs. 2019. *PCR Troubleshooting Guide* [Internet]. Évry (Francia): New England Biolabs; [citado 2019 Dic 9]. Disponible en: <https://international.neb.com/tools-and-resources/troubleshooting-guides/pcr-troubleshooting-guide>
- Nieto V. 2010. Estudio sobre el comportamiento poscosecha del fruto de uvilla (*Physalis peruviana*), en el Cantón Cevallos de la Provincia de Tungurahua. [Tesis de pregrado] [Ambato (Ecuador)]: Universidad Técnica de Ambato.

- Premier Tech Horticulture. 2005. PRO-MIX PGX [Internet]. Quebec (Canadá): Premier Tech; [citado 2019 Dic 10]. Disponible en: https://www.pthorticulture.com/media/3272/sds_pth_pro-mix-pgx-family_en_180604.pdf
- Promega. 2018. GoTaq® Green Master Mix [Internet]. Wisconsin (Estados Unidos): Worldwide Promega; [citado 2019 Mar 14]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix-protocol.pdf?la=en>
- Promega. 2019. Technical manual: Wizard® Genomic DNA Purification: Isolation Genomic DNA from Plant Tissue [Internet]. Wisconsin (Estados Unidos): Worldwide Promega; [citado 2019 Mar 14]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?la=en>
- Promega. 2019. 100bp DNA Ladder [Internet]. Wisconsin (Estados Unidos): Worldwide Promega; [citado 2019 Mar 14]. Disponible en: <https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/white-papers/quality-and-stability-of-dna-ladders-shipped-at-ambient-temperature.pdf>
- Sánchez J. 2016. Introducción a la estadística en las ciencias biológicas. Quito (Ecuador): Qualityprint.
- Tapia E. 2019. Ecuador realiza su primer envío de uvillas a EE.UU. El Comercio [Internet]. [citado 2019 dic 10]. Disponible en: <https://www.elcomercio.com/actualidad/ecuador-uvilla-exportacion-eeuu-comercio.html>

- ThermoScientific. 2015. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometers [Internet]. Wilmington (Estados Unidos): Thermo Fischer; [citado 2019 ene 14]. Disponible en: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND2000CLAPTOP?SID=srch-hj-ND2000CLAPTOP>
- Vu D, Groenewald M, De Vries M, Gehrman T, Stielow B, Eberhard U, Al-Hatmi A.M, Groenewald J.Z, Cardinali G, Boekhout T, et al. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology*. 92: 135-154.
- White T, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Nueva York (Estados Unidos):Academic Press.
- Yáñez J, Arellano M, Silva A, Garzón D. 2019. First Report of Fusarium Wilt by *Fusarium oxysporum* in *Physalis peruviana* in Ecuador. *The American Phytopathological Society* [Internet]. [citado 2019 Ago 12]; 103 (Art. 10). Disponible en: <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1807-PDN>
- Zapata J, Saldarriaga C, Londoño M, Díaz C. 2002. Manejo del cultivo de la Uchuva en Colombia [Internet]. Antioquia (Colombia): Programa Regional de Investigación Agrícola; [citado 2019 Nov 15]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/5bd2/26113197df44f1998f81d7d97570a7e9a440.pdf>

10. FIGURAS



Figura 1. Lesión característica de *Phoma* spp en órganos de plantas de uvilla. a) sintomatología en capacho; b) sintomatología en hoja.

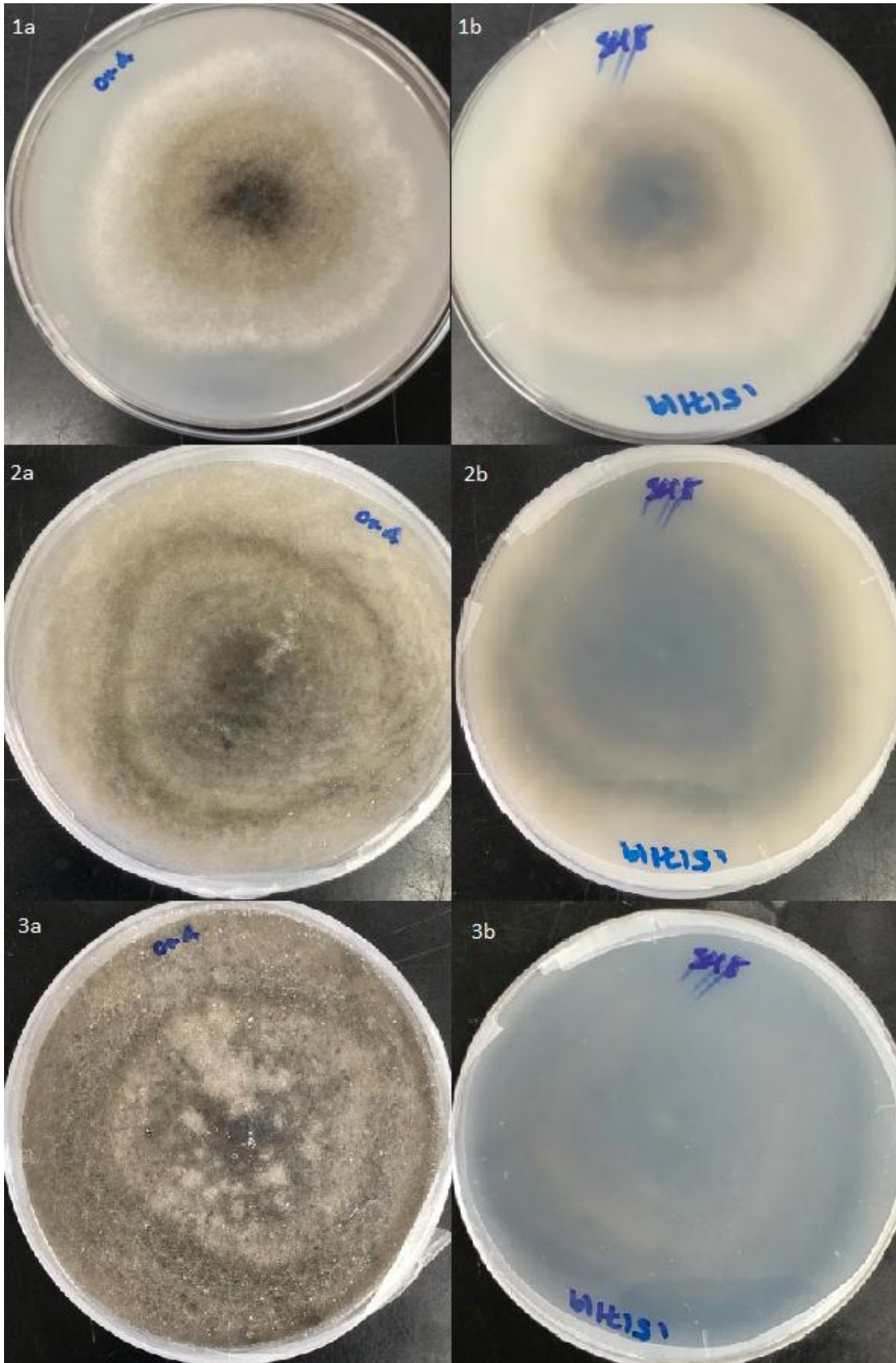


Figura 2. Crecimiento del aislado TR3 cultivado en agar harina de avena (OMA, por sus siglas en inglés) a 23°
C. a) anverso; b) reverso; 1) 7 días de incubación; 2) 15 días de incubación; 3) 21 días de incubación.

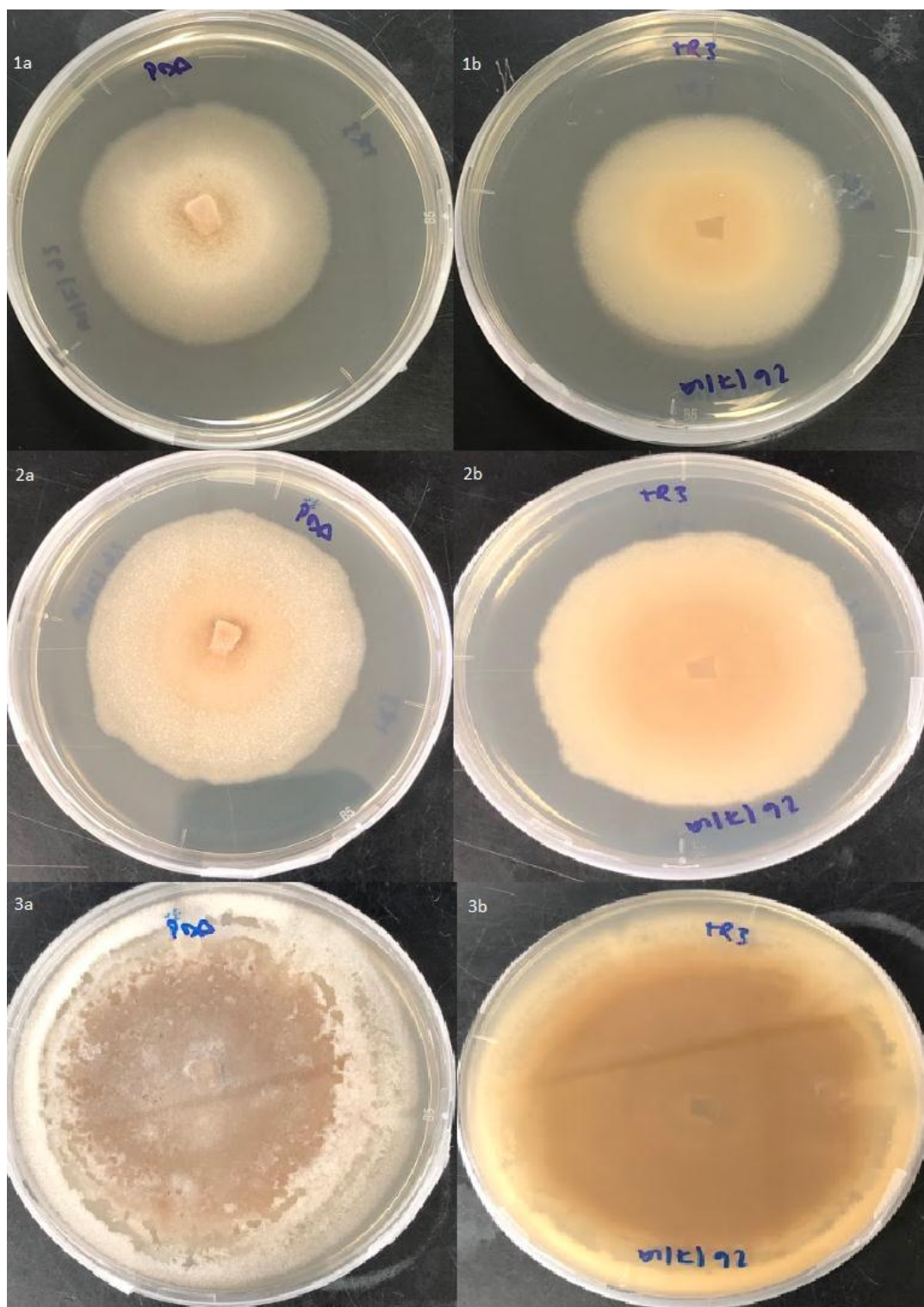


Figura 3. Crecimiento del aislado SH5 cultivado en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) a 23° C.
a) anverso; b) reverso; 1) 7 días de incubación; 2) 15 días de incubación; 3) 21 días de incubación

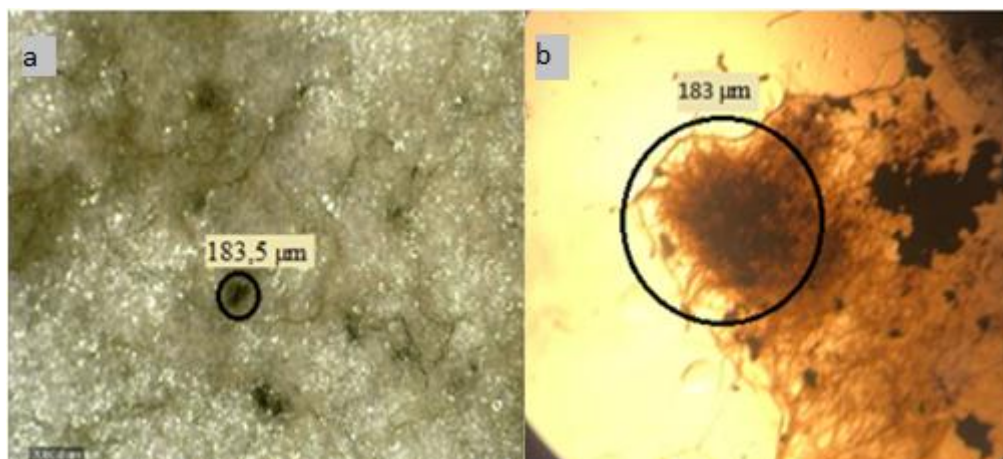


Figura 4. Observación microscópica del desarrollo de picnidios de cepa SH5 en agar harina de avena (OMA, por sus siglas en inglés) (21 días) a 23° C. μm : micrómetro; a) observación en estereomicroscopio (183,5 μm aproximadamente) (aumento total: 40x); b) observación en microscopio (183 μm aproximadamente) (aumento total: 100x).

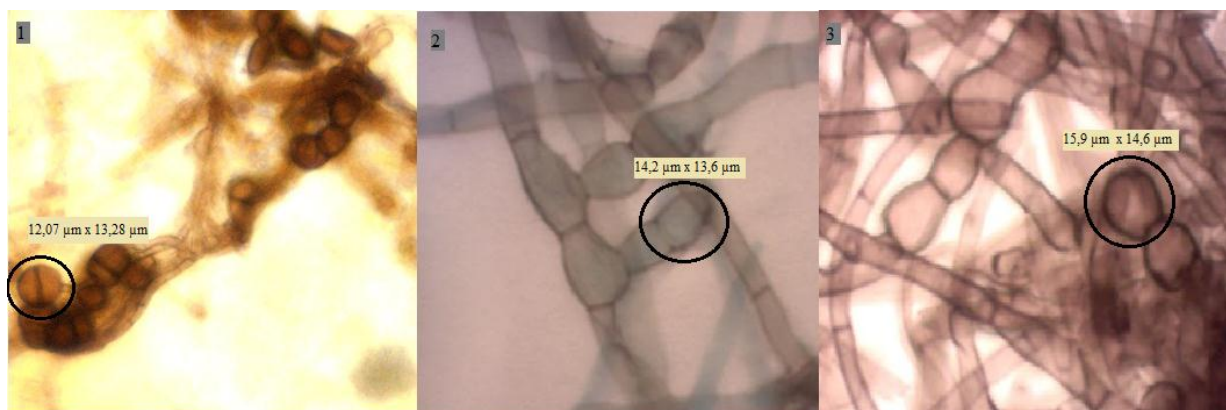


Figura 5. Observación microscópica de clamidosporas en agar harina de avena (OMA, por sus siglas en inglés) (21 días) a 23° C. μm : micrómetro; 1) cepa NJC2(1) (12,07 μm x 13,28 μm); 2) cepa SLH15 (14,2 μm x 13,6 μm); 3) cepa TH6 (15,9 μm x 14,6 μm); amplificación total 400x.

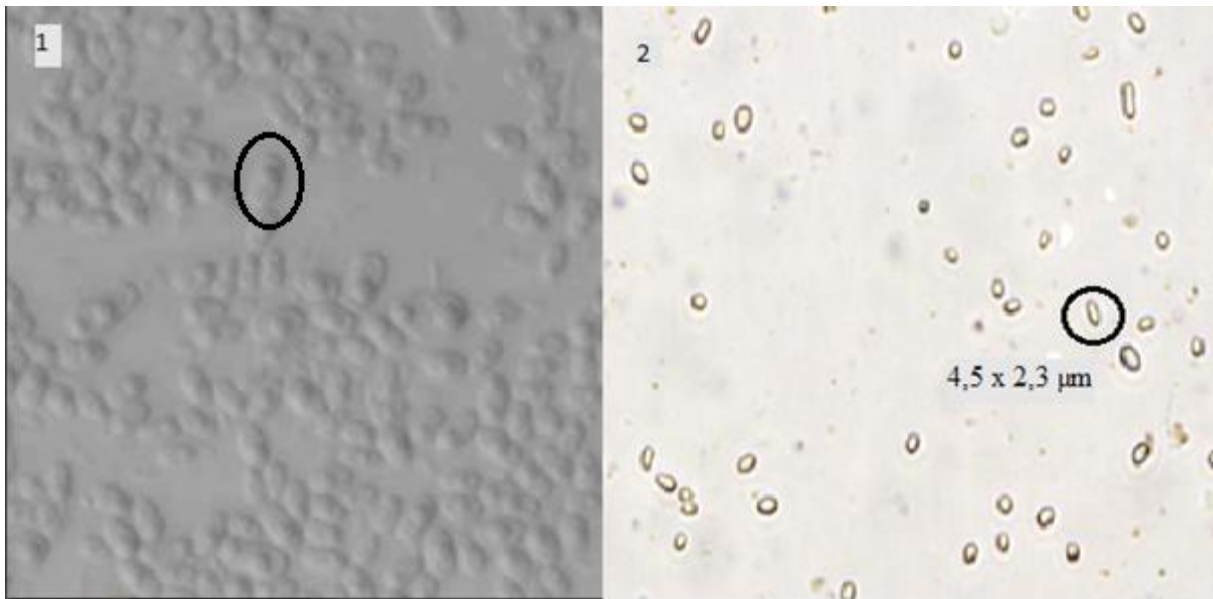


Figura 6. Observación microscópica de conidias de la cepa NJC2(1) en agar harina de avena (OMA, por sus siglas en inglés) (21 días) a 23° C. μm : micrómetro; 1) observación en microscopía confocal de conidia ovalada y binucleada; 2) observación en microscopio óptico de conidia alargada y oblongada 400x (4,5 μm x 2,3 μm).

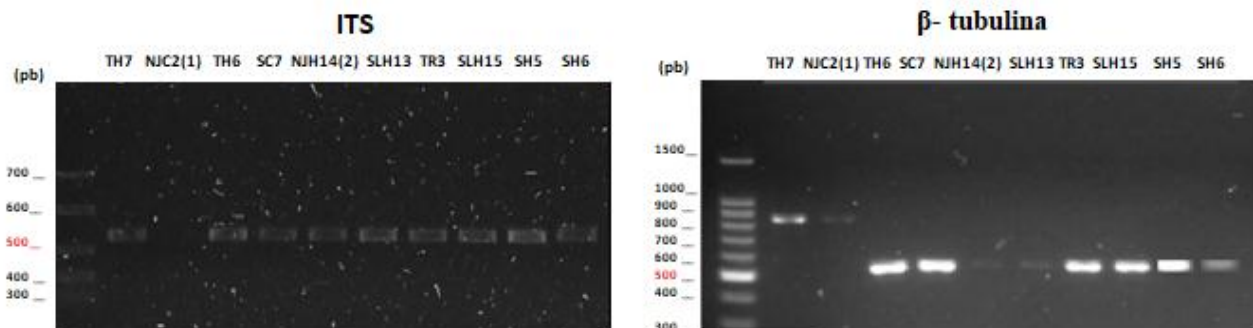


Figura 7. Electroforesis de gel de agarosa 2% para PCR de regiones ITS y β -tubulina.

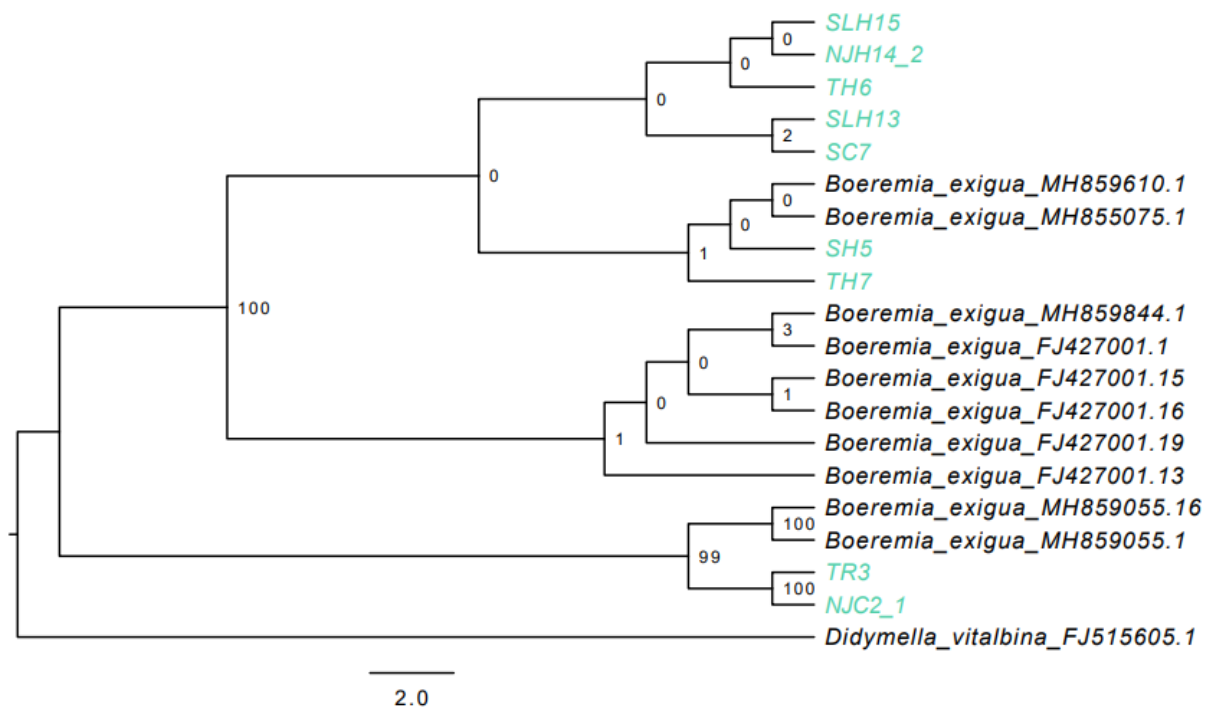


Figura 8. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas de *Boeremia exigua* var. *exigua* comparadas con las secuencias presentes en Aveskamp et al. (2010) y Vu et al. (2019) para la región del gen ITS, con su respectivo grupo externo (*Didymella vitalbina*_ FJ512605.1)

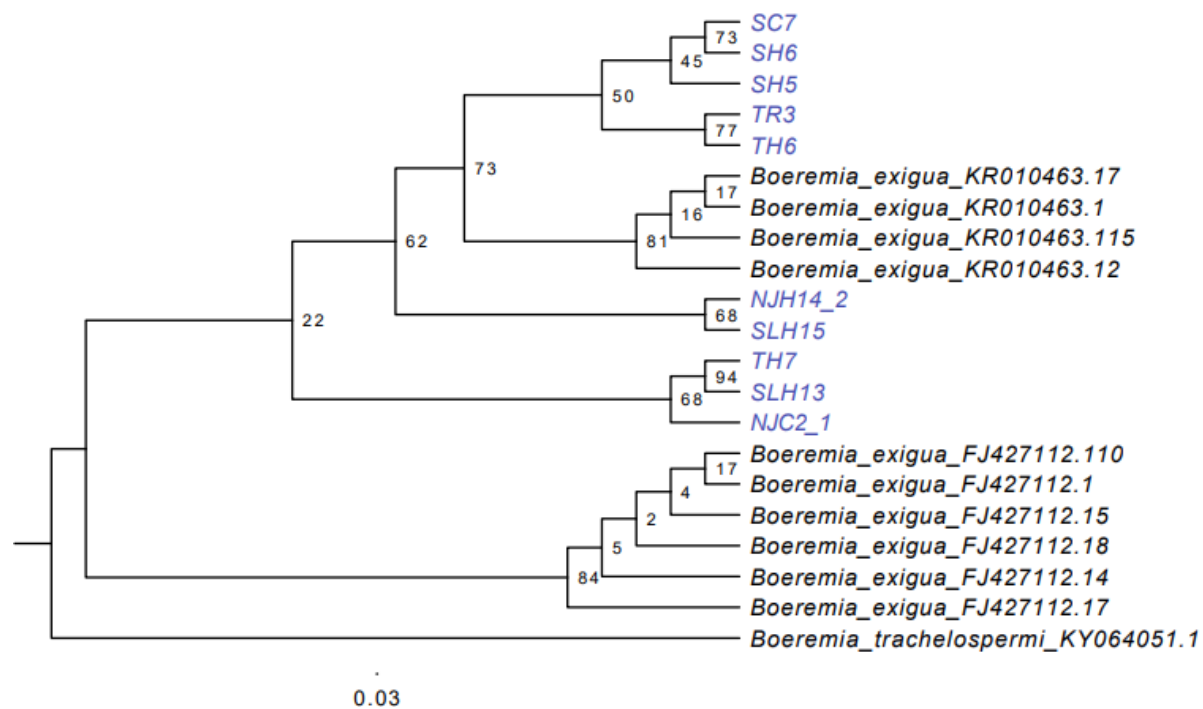


Figura 9. Árbol filogenético de las secuencias obtenidas de *Boeremia exigua* var. *exigua* comparadas con las secuencias presentes en Aveskamp et al. (2010) y Vu et al. (2019) para la región del gen β - tubulina, con su respectivo grupo externo (*Boeremia trachelospermi*_ KY064051.1)



Figura 10. Lesiones producidas por *Boeremia exigua* var. *exigua*, cepa NJC2(1), en hojas de uvilla. a) Presencia de picnidios y mancha necrótica en el haz de la hoja; b) Lesión en forma de “V” en el haz de la hoja; c) mancha necrótica en el envés de la hoja. Postulados de Koch.

11. TABLAS

Tabla 1. Localidades muestreadas entre los meses marzo- mayo 2019.

PROVINCIA	CIUDAD	LOCALIDAD	COORDENADAS	CEPA OBTENIDA
Pichincha	Cayambe	Tabacundo	0°03'26.5"N 78°13'54.5"W	TH7, TH6, TR3
	Otavaló	Niño Jesús	00°13'33.2" N 78°15'44.7"W	NJC2(1), NJH14 (2)
Imbabura	Otavaló	San Luis de	00°01'52.8" N 78°15'44.7"W	SLH13, SLH15
		Ichisí		
Cotopaxi	Sigchos	Sigchos	0°41'54.4"S 78°53'12.1"W	SC7, SH5, SH6

Los códigos representados en la última columna de izquierda a derecha corresponden a la codificación interna del laboratorio para cada cepa aislada.

Tabla 2. Tamaño promedio de estructuras microscópicas de cada cepa después de 21 días de crecimiento.

CEPA	PICNIDIOS (μm)	CLAMIDOSPORAS (μm)		CONIDIAS (μm)	
		Largo	Ancho	Largo	Ancho
NJC2(1)	104,9 \pm 7,9	12,1 \pm 0,7	13,3 \pm 1,5	4,5 \pm 0,7	2,3 \pm 0,5
NJH14(2)	144,3 \pm 17,4	13 \pm 1,1	11,2 \pm 0,8	5,6 \pm 1,5	2,3 \pm 0,5
SC7	110,2 \pm 2,7	12,8 \pm 1,0	14,5 \pm 0,9	4,7 \pm 1,2	2,4 \pm 0,6
SH5	188 \pm 24,8	12,2 \pm 1,5	13,6 \pm 1,4	6,5 \pm 1,8	3,1 \pm 0,4
SLH13	192,3 \pm 5,9	11,4 \pm 1,2	12,7 \pm 0,8	7,6 \pm 1,4	3,8 \pm 0,6
SLH15	180,5 \pm 23,8	14,2 \pm 1,3	13,6 \pm 1,5	6,1 \pm 0,8	3 \pm 0,3
TH6	223,3 \pm 21,8	15,9 \pm 0,7	14,6 \pm 1,5	5,5 \pm 0,9	2,3 \pm 0,5
TH7	168,4 \pm 41,8	14,1 \pm 0,8	11,5 \pm 0,9	6,7 \pm 1,1	3,4 \pm 0,7
TR3	157,2 \pm 25,7	12,3 \pm 2,5	13,7 \pm 1,3	7,6 \pm 1,7	3,9 \pm 0,9
SH6	186,5 \pm 20,7	12,1 \pm 1,9	13,5 \pm 1,6	6,2 \pm 1,5	3,5 \pm 0,7

Cada valor numérico representa el promedio de las dimensiones \pm desviación estándar (n=5), de las estructuras microscópicas características de *Phoma* spp. μm : micrómetros.

Tabla 3. Identificación molecular de las cepas en base a la comparación de las secuencias de los amplicones de ITS con aquellas secuencias depositadas en BLAST.

CEPA AISLADA	NÚMERO DE ACCESO DE REFERENCIA	PORCENTAJE DE COBERTURA (%)	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)
TH7	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	KR653200.1 <i>Boeremia exigua</i>	73	100
	MH859059.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
NJC2 (1)	MH859055.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	99
	MN540289.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	97
	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	97
TH6	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	95	100
	KR653200.1 <i>Boeremia exigua</i>	100	100
	MH859059.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
SC7	MK584540.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	MH859844.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	MH651564.1 <i>Boeremia exigua</i>	99	100
NJH14(2)	MH859059.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	94	100
	KR653199.1 <i>Boeremia exigua</i>	100	100
SLH13	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	93	100
	MK584540.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MH714547.1 <i>Boeremia exigua</i>	100	100
TR3	MH859055.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	95	97
	MN540289.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	97
SLH15	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	93	100
	MH859610.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	KP746412.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
SH5	MH859059.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	100

	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MH464281.1 <i>Boeremia exigua</i>	100	99
SH6	MH855075.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MH859844.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	91	100

Tabla 4. Identificación molecular de las cepas en base a la comparación de las secuencias de los amplicones de β - tubulina con aquellas secuencias depositadas en BLAST.

CEPA AISLADA	NÚMERO DE ACCESO DE REFERENCIA	PORCENTAJE DE COBERTURA (%)	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)
TH7	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
NJC2 (1)	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	99	99
	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	75	99
	MH732951.1 <i>Boeremia exigua</i>	99	99
TH6	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	MK514090.1 <i>Boeremia exigua</i>	100	98
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	88	98
SC7	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	85	100
	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	90	99
NJH14(2)	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	95	100
	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	78	100
SLH13	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	82	100
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	78	100
TR3	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	93	98
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	79	99
SLH15	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100

	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	95	100
	MK514090.1 <i>Boeremia exigua</i>	100	100
SH5	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	99
	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	95	99
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	80	100
SH6	KR010463.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	FJ427112.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	94	99
	MG970365.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	85	100

Tabla 5. Determinación semicualitativa del desarrollo de picnidios en las cepas aisladas.

CEPA	DESARROLLO DE PICNIDIOS
TH7	+
NJC2 (1)	+++
TH6	+++
SC7	+
NJH14(2)	+++
SLH13	+++
TR3	++
SLH15	++
SH5	+
SH6	+

+) poca presencia de picnidios; ++) moderada presencia de picnidios; +++)) alta presencia de picnidios.

Tabla 6. Presencia de sintomatología en las plantas de uvilla después de 10 días de infección.

CEPA	REPETICIÓN 1		REPETICIÓN 2		REPETICIÓN 3	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2
NJH14(2)	-	-	+	+	+	+
SLH13	+	+	+	-	-	-
TH6	+	+	+	-	+	+
NJC2(1)	+	+	+	+	+	+
TR3	-	+	+	+	+	-
SLH15	-	-	-	-	-	-

T1) Inoculación sin laceración; T2) Inoculación con laceración; +) presencia de sintomatología; -) ausencia de sintomatología.

Tabla 7. Identificación molecular de las cepas, después de la realización de los postulados de Koch, en base a la comparación de las secuencias de los amplicones de ITS con aquellas secuencias depositadas en BLAST.

CEPA AISLADA	NÚMERO DE ACCESO DE REFERENCIA	PORCENTAJE DE COBERTURA (%)	PORCENTAJE DE IDENTIDAD (%)
NJC2 (1)	MH859059.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MK584540.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	94	100
TH6	MK584540.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MH859059.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	KR653200.1 <i>Boeremia exigua</i>	100	100
NJH14(2)	MH855075.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MK584540.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	93	100
SLH13	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MK584540.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MH855075.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
TR3	FJ427001.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MH859844.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100
	MK584540.1 <i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i>	100	100

12. ANEXOS

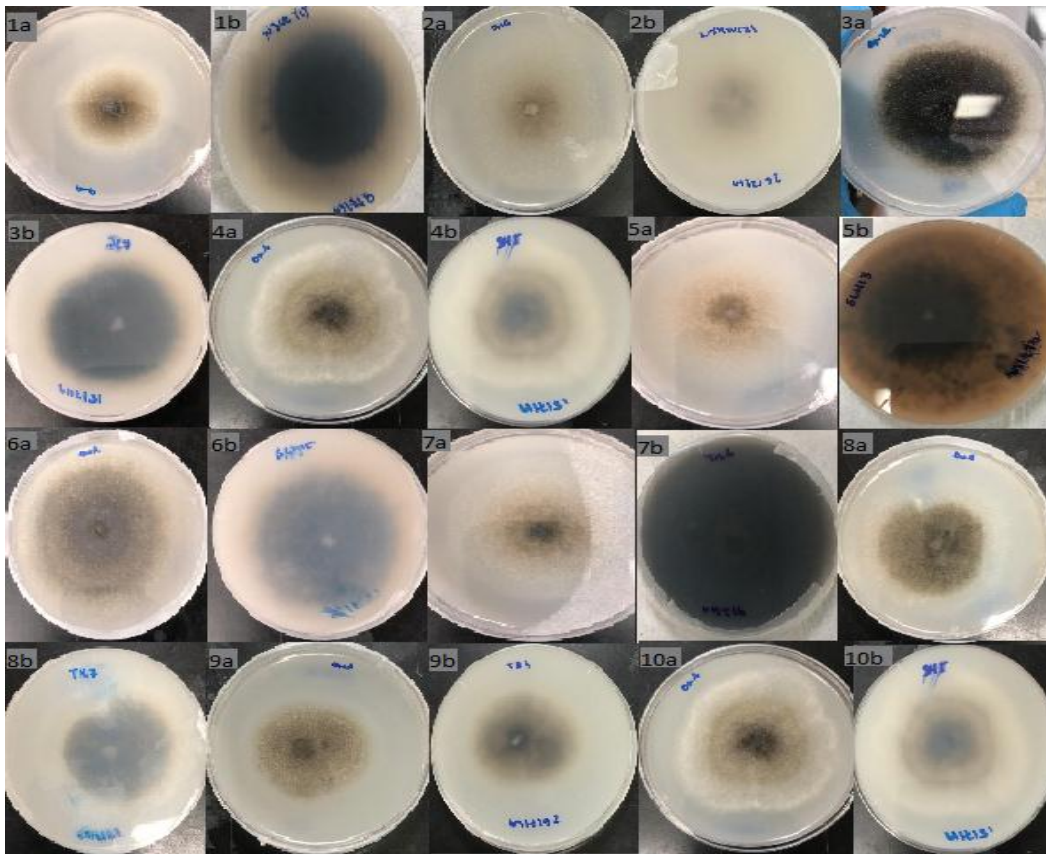


Figura 11. Crecimiento de los aislados fúngicos cultivados en agar harina de avena (OMA, por sus siglas en inglés) (7 días) a 23° C. a) anverso; b) reverso; 1) NJC2(1); 2) NJH14(2); 3) SC7; 4) SH5; 5) SLH13; 6) SLH15; 7) TH6; 8) TH7; 9) TR3; 10) SH6.

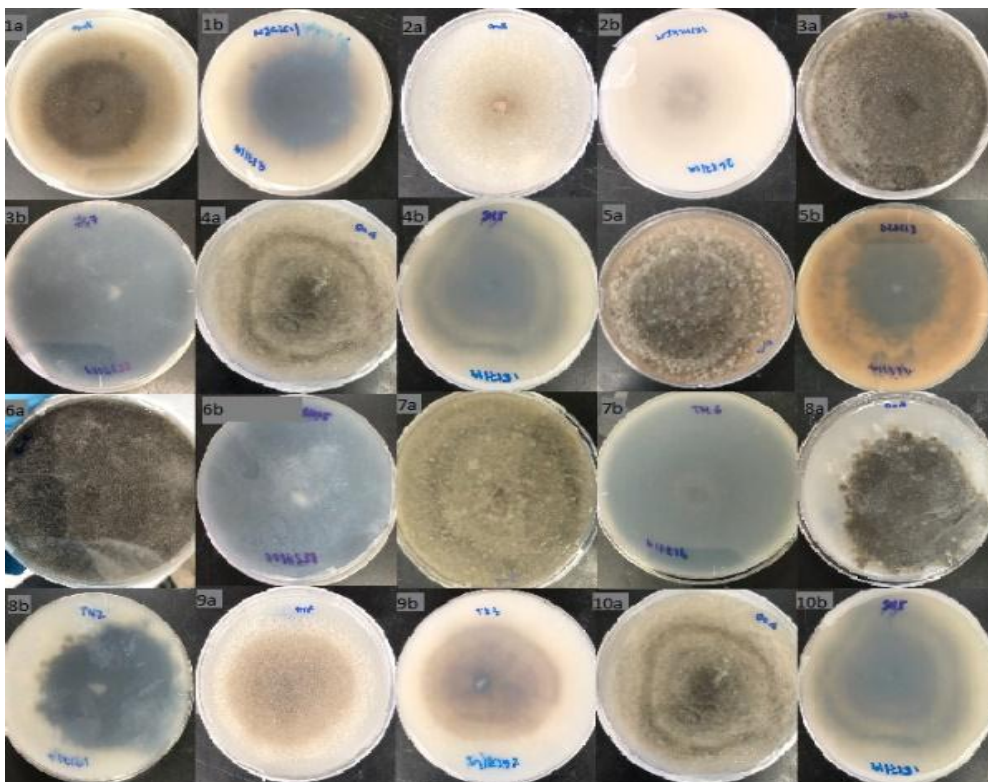


Figura 12. Crecimiento de los aislados fúngicos cultivados en agar harina de avena (OMA, por sus siglas en inglés) (15 días) a 23° C. a) anverso; b) reverso; 1) NJC2(1); 2) NJH14(2); 3) SC7; 4) SH5; 5) SLH13; 6) SLH15; 7) TH6; 8) TH7; 9) TR3; 10) SH6.

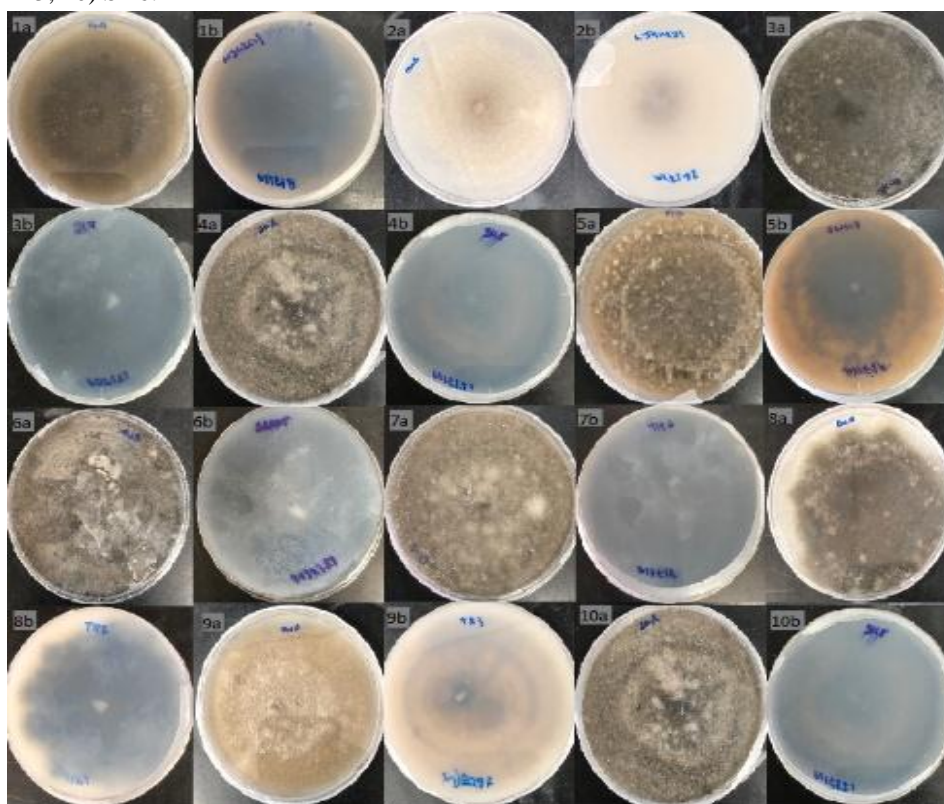


Figura 13. Crecimiento de los aislados fúngicos cultivados en agar harina de avena (OMA, por sus siglas en inglés) (21 días) a 23° C. a) anverso; b) reverso; 1) NJC2(1); 2) NJH14(2); 3) SC7; 4) SH5; 5) SLH13; 6) SLH15; 7) TH6; 8) TH7; 9) TR3; 10) SH6.

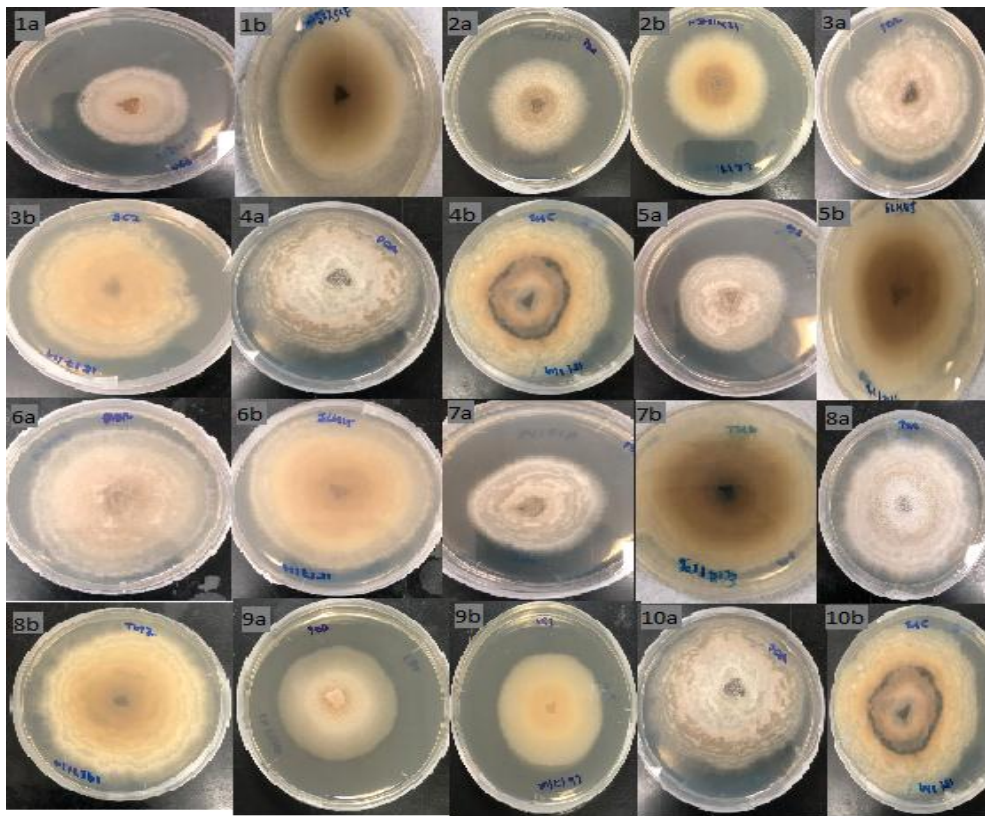


Figura 14. Crecimiento de los aislados fúngicos cultivados en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (7 días) a 23° C. a) anverso; b) reverso; 1) NJC2(1); 2) NJH14(2); 3) SC7; 4) SH5; 5) SLH13; 6) SLH15; 7) TH6; 8) TH7; 9) TR3; 10) SH6.

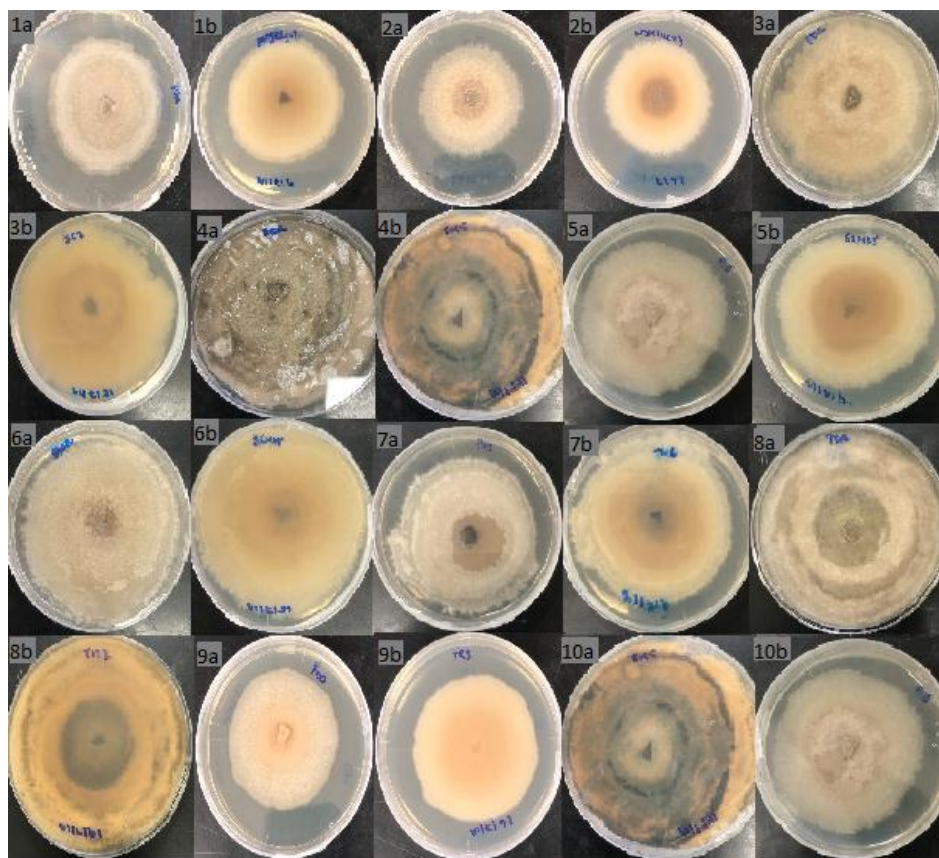


Figura 15. Crecimiento de los aislados fúngicos cultivados en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (15 días) a 23° C. a) anverso; b) reverso; 1) NJC2(1); 2) NJH14(2); 3) SC7; 4) SH5; 5) SLH13; 6) SLH15; 7) TH6; 8) TH7; 9) TR3; 10) SH6.

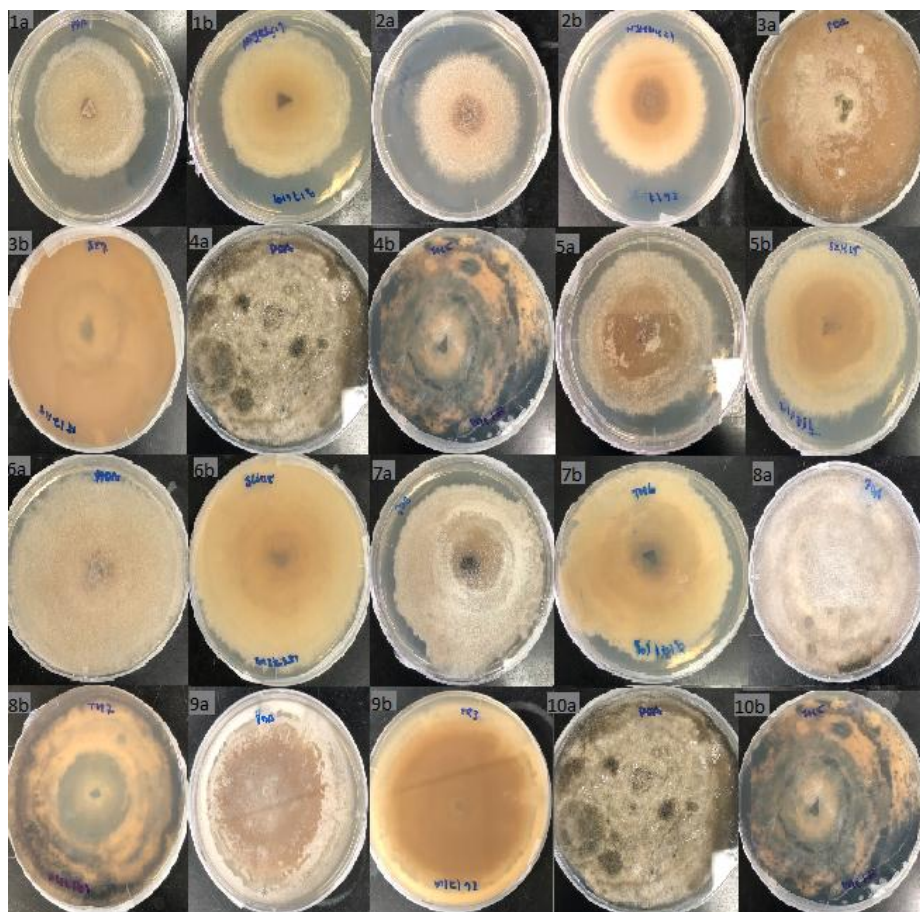


Figura 16. Crecimiento de los aislados fúngicos cultivados en agar papa dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés) (21 días) a 23° C. a) anverso; b) reverso; 1) NJC2(1); 2) NJH14(2); 3) SC7; 4) SH5; 5) SLH13; 6) SLH15; 7) TH6; 8) TH7; 9) TR3; 10) SH6.