

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

CARRERA DE MICROBIOLOGÍA

**IDENTIFICACIÓN DE *Penicillium chrysogenum* COMO FITOPATÓGENO
POST COSECHA EN FRUTOS DE UVILLA (*Physalis peruviana* L.)**

Disertación previa a la obtención del título de Licenciada en Microbiología

GRACE ANALLELY AGUAYO BOWEN

Quito, 2024

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo final de carrera de la Licenciatura en Ciencias Biológicas de la señorita Grace Anallely Aguayo Bowen ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas; por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.



Mtr. Jeniffer Yánez
Directora del Trabajo final de carrera
Quito, 28 de junio de 2024

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mis padres por su amor incondicional, y su apoyo constante, y a Dios por darme la oportunidad de estudiar esta carrera y bendecir cada uno de mis pasos para cumplir mis objetivos.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que han contribuido a la realización de este trabajo de titulación. En primer lugar, agradezco de todo corazón a mis padres, Patricio y Grace. Ellos siempre creyeron en mí y se esforzaron para darme la oportunidad de estudiar en esta prestigiosa universidad. Su constante apoyo y sacrificio han sido fundamentales en mi camino académico. A mi querida hermana, Anahí, quien estuvo a mi lado durante estos cuatro años de carrera, apoyándome y alentándome para no rendirme y no sentirme sola en este camino.

Quiero reconocer y agradecer profundamente a Roberto, un buen amigo que siempre me animaba cuando me sentía frustrada. También agradezco a mi amiga Paula, quien me ayudaba con mis inquietudes académicas y siempre lograba sacarme una sonrisa, haciendo mi vida universitaria más llevadera. Agradezco sinceramente a mis compañeros de clase y a todos mis profesores por sus palabras de aliento, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias, y por formar parte de este viaje académico que hemos recorrido juntos.

De igual forma, quiero agradecer a mi tutora de tesis, Jeniffer Yáñez, por ayudarme con mis inquietudes durante la elaboración de este trabajo, por su empatía y por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio. También quisiera agradecer a Alexis Quintana por su apoyo durante la parte experimental de esta investigación, el cual siempre estuvo dispuesto a responder mis preguntas y dudas, con una actitud positiva y una sonrisa en el rostro.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este trabajo. Sus contribuciones fueron fundamentales para alcanzar este logro académico.

MANUSCRITO PARA LA PUBLICACIÓN

Revista

Revista de Ciencias de la Vida, La Granja

Título

Identificación de *Penicillium chrysogenum* como fitopatógeno post cosecha en frutos de uvilla (*Physalis peruviana* L.).

Autores

Grace Anallely Aguayo Bowen*, Jeniffer Marcela Yáñez Altuna**.

Correo electrónico

*Gaaguayob@puce.edu.ec, **jyanez989@puce.edu.ec.

Dirección

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

El siguiente trabajo de investigación se presenta en el formato de la revista de Ciencias de la Vida,
La Granja a partir de la siguiente página.

Normas para autores: <https://lagranja.ups.edu.ec/pdf/granja/normas.pdf>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Sección (Marcar)
Artículo científico ____
Revisión Bibliográfica ____
Punto de vista ____
Special Issue” Sustentabilidad Organizacional, Desarrollo y Gestión Ambiental” ____

IDENTIFICACIÓN DE *Penicillium chrysogenum* COMO FITOPATÓGENO POST COSECHA EN FRUTOS DE UVILLA (*Physalis peruviana* L.)

IDENTIFICATION OF *Penicillium chrysogenum* AS A POST-HARVEST PHYTOPATHOGEN IN UVILLA FRUITS (*Physalis peruviana* L.)

RESUMEN

La uvilla (*Physalis peruviana* L.), originaria de los Andes, es rica en vitaminas A, B y C, y tiene propiedades medicinales como fortalecer el nervio óptico y depurar la sangre. Debido a sus beneficios, el consumo de uvilla ha aumentado, especialmente en Europa. Sin embargo, los cultivos de uvillas enfrentan ataques de hongos fitopatógenos, como *Penicillium* spp., lo que causa pérdidas del 20 al 50% en el campo, así como también en la postcosecha. *Penicillium* spp. es conocido por causar la podredumbre azul, caracterizada por podredumbre blanda y necrosis con micelio azul en los frutos de cítricos, lo que resulta en pérdidas económicas. El objetivo de la investigación fue identificar la presencia de *Penicillium* spp. en la postcosecha de uvillas en Ecuador. Se recolectaron 50 muestras de uvillas aparentemente sanas en Quito. Las muestras se desinfectaron y colocaron en cámara húmeda. Los frutos con síntomas del fitopatógeno se seleccionaron, se inocularon en agar papa dextrosa y se incubaron a 28 ± 1 °C durante siete días. Las colonias purificadas con características similares a *Penicillium* spp. se identificaron molecularmente mediante PCR, amplificando la región ITS. Los productos de PCR fueron secuenciados y comparados con bases de datos del NCBI y Mycobank, identificando las colonias como *P. chrysogenum*. Los postulados de Koch confirmaron que este hongo es el agente causal de la podredumbre azul en uvillas, siendo este el primer reporte de la enfermedad en *P. peruviana* en Ecuador.

31 **ABSTRACT**

32 The cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.), native to the Andes, is rich in vitamins A, B, and C, and has
33 medicinal properties such as strengthening the optic nerve and purifying the blood. Due to its benefits, the
34 consumption of cape gooseberries has increased, especially in Europe. However, cape gooseberry crops face
35 attacks from pathogenic fungi, such as *Penicillium* spp., causing losses of 20 to 50% in both the field and post-
36 harvest. *Penicillium* spp. is known to cause blue mold, characterized by soft rot and necrosis with blue
37 mycelium on the fruits, resulting in economic losses. The objective of the research was to identify the presence
38 of *Penicillium* spp. in the post-harvest phase of cape gooseberries in Ecuador. Fifty samples of apparently
39 healthy cape gooseberries were collected in Quito. The samples were disinfected and placed in a humid
40 chamber. Fruits with symptoms of the studied pathogen were selected, inoculated on potato dextrose agar,
41 and incubated at 28 ± 1 °C for seven days. Purified colonies with phenotypic characteristics similar to
42 *Penicillium* spp. were identified molecularly using PCR, amplifying the ITS region. The PCR products were
43 sequenced and compared with databases from NCBI and Mycobank, identifying the colonies as *P.*
44 *chrysogenum*. Koch's postulates confirmed that *P. chrysogenum* is the causal agent of blue mold in cape
45 gooseberries, making this the first report of the disease in *P. peruviana* in Ecuador

46

47 **Palabras clave**

48 *Physalis peruviana*, *Penicillium chrysogenum*., fitopatógeno, hongo, postcosecha.

49

50 **Keywords**

51 *Physalis peruviana*, *Penicillium chrysogenum*, phytopathogen, fungus, postharvest

52

53 **1. Introducción**

54 La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una especie vegetal originaria de los Andes y crece en altitudes que van
55 desde los 1000 a los 3000 metros sobre el nivel del mar. Es arbustiva, muy ramificada y su fruto se consume
56 cuando está totalmente maduro, es decir cuando el capuchón está seco y la fruta cae espontáneamente de
57 la planta. En campo abierto la uvilla rinde entre 6000 y 12000 kg/ha y su producción mejora llegando a 5000
58 a 35000 kg/ha si se somete el cultivo bajo invernadero (Grandes et al., 2008). La fruta de la uvilla es una
59 excelente fuente de vitamina C, vitamina A, y vitaminas del grupo B (niacina, tiamina, y vitamina B 12).
60 Además, posee 0,3% de proteínas, 78,9% de agua, 14,7% de carbohidratos totales, 0,2% de grasas, 1,0%
61 de cenizas y 4,9% de fibra (Villacís-Constante, 2002). En cuanto a sus propiedades medicinales, se puede
62 mencionar que la uvilla ayuda en el fortalecimiento y reconstrucción del nervio óptico, ayuda a depurar la

63 sangre, elimina la albúmina de los riñones, es ideal para las personas diabéticas, la cual pueden consumir
64 esta fruta sin restricciones, ayuda a la eliminación de parásitos en los niños, el agua de uvilla es buena para
65 desinflamar ovarios, promueve el tratamiento de las personas con dificultades de próstata por sus cualidades
66 diuréticas, y es efectiva en el tratamiento de problemas de garganta (Herrera, 2015). Todas estas propiedades
67 y beneficios incrementaron su consumo en los últimos años, especialmente en Europa y siendo exportada
68 esencialmente a Alemania, Canadá, Países Bajos, Australia, Francia, España, y Estados Unidos (PRO
69 ECUADOR, 2020).

70 Los principales ecotipos de uvilla en la región andina del Ecuador son: la colombiana que es de tono amarillo
71 intenso y tiene baja concentración de ácido cítrico, la ecuatoriana que tiene un color amarillo intenso, olor
72 agradable y es rica en vitaminas, y la ambateña que es de color amarillo verdoso y sabor agridulce (Arellano,
73 2018). El cultivo de uvilla en Ecuador aumentó en los últimos años, con 419 hectáreas utilizadas para producir
74 10000 kilogramos al año (Beune, 2023), generando ingresos para los agricultores del país. Por ejemplo, un
75 proyecto para restaurar la producción de uvilla en los Andes ecuatorianos utilizando agricultura regenerativa,
76 permitió a los agricultores alcanzar un margen del 50% y se obtuvieron 15 millones de dólares en ingresos
77 directos para las familias de agricultores de Ecuador y Colombia (Hoffecker y Lee, 2022).

78 Los cultivos de uvillas generalmente están expuestos a ataques de fitopatógenos, lo que provoca pérdidas en
79 campo y postcosecha. En esta última etapa se producen enfermedades causadas por microorganismos, por
80 daños mecánicos o por manipulación, almacenamiento y transporte inadecuados, lo que favorece al desarrollo
81 de síntomas como pudrición y, por tanto, el deterioro de la calidad del fruto (Cedeño, 2018). En este cultivo,
82 los hongos son los principales causantes de los daños, ya que factores como la presencia de ácidos orgánicos
83 y sustancias química volátiles que a medida que la fruta madura el contenido de azúcar especialmente
84 fructosa y glucosa aumentan y los ácidos orgánicos disminuyen, y la acidez aumenta brevemente y luego
85 disminuye, por lo que termina la fruta con un pH bajo, siendo estos factores que hacen susceptible a la uvilla
86 a ataques de hongos (Moreno-Caja 2013). Por lo tanto, es importante cuidar los frutos durante su
87 manipulación y el ambiente de almacenamiento después de la cosecha para reducir estos cambios naturales,
88 fisiológicos, patológicos o mecánicos (Rodríguez, 2006). La uvilla es susceptible a enfermedades fúngicas
89 como el mal de semilleros causada por *Botrytis* sp., *Rhizoctonia* sp. y *Fusarium* sp., que provocan pudrición
90 de raíces; la mancha gris causada por *Cercospora* sp., cuyo principal síntoma es la necrosis foliar; la muerte
91 descendente o mal de tierra causada por *Phoma* sp., presentando pequeñas manchas oscuras en las hojas,
92 y *Alternaria* sp. generando el secamiento descendente del cáliz (Moreno-Caja 2013). En Ecuador se presentan
93 casos de hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Alternaria* sp., *Cladosporium* sp.,
94 *Alternaria alternata*, *Cercospora malayensis*, *Phoma* sp., etc. Sin embargo, los informes sobre la gravedad y

105 las pérdidas económicas que estos hongos provocan a los cultivos de uvilla en el país son limitados (Yáñez
106 et al., 2019). En la fase postcosecha, período comprendido desde el retiro del producto de su origen natural
107 y envasado en las fincas, hasta el momento en el que es consumido en su forma original o utilizado en
108 procesamiento y transformación industrial; se producen pérdidas del 20 al 50% de los productos,
109 especialmente en países en desarrollo (Chilán, 2010). Así también, se reportan enfermedades causadas por
110 hongos como *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* sp. y pocas por de *Penicillium* spp., que resultan en pérdidas de
111 importancia económica cuando los frutos se exportan a los mercados europeos, debido a las condiciones de
112 humedad dentro de los contenedores destinados a la exportación (Gaitán, 2018). La temperatura óptima para
113 el crecimiento de estos hongos es de 20-25 ° C dependiendo de la especie, y la manifestación de desperfectos
114 mecánicos en la superficie del producto, lo que conduce al desarrollo de la mayoría de estas enfermedades
115 durante la postcosecha (Cárdenas, 2011). Los hongos del género *Penicillium* son agentes patógenos que
116 afectan a diversas especies de plantas en todo el mundo, resultando en pérdidas significativas de cultivos
117 importantes como manazas, peras, uvas, melones, cítricos, entre otros. Este género exhibe una amplia
118 variabilidad genética, con más de 300 especies identificadas a nivel global hasta la fecha (Huerta-Déctor,
119 2014). Se menciona a *P. chrysogenum* como causante de la podredumbre azul o verde durante la
120 postcosecha de cítricos a nivel mundial, provoca el marchitamiento y la degradación de los frutos, junto con
121 la formación de moho de color azul o verde en la superficie, así como, el ablandamiento y descomposición de
122 la pulpa. Por tanto, responsable de graves pérdidas económicas, debido a la reducción del rendimiento de la
123 cosecha y el deterioro directo de la calidad del fruto (Mosco-Ramírez, 2013). Sin embargo, ningún estudio a
124 nivel mundial reporta esta enfermedad en cultivos de *P. peruviana*.

125 En este contexto, este estudio tiene como objetivo el aislamiento e identificación de cepas de *Penicillium* sp.
126 causantes de pudriciones en frutos de uvilla durante la poscosecha. La identificación molecular y morfológica
127 de este patógeno es crucial para generar nuevos conocimientos y con ello, implementar métodos de control
128 fitosanitario garantizar la durabilidad en percha y la inocuidad alimentaria de esta fruta.

129

130 **2. Materiales y Métodos**

131 **2.1 Muestreo**

132 Se obtuvieron 50 muestras de 250 gramos de frutos de uvillas en tiendas y supermercados de la ciudad de
133 Quito, las cuales fueron transportadas en fundas nuevas y herméticas al laboratorio de Fitopatología y Control
134 biológico de la PUCE en Quito.

135 **2.2 Aislamiento del hongo fitopatógeno**

126 Las frutas con lesiones y crecimientos fúngicos sospechosos fueron separadas para su procesamiento. Las
127 uvillas se desinfectaron mediante una solución compuesta por 200 ml de agua estéril y 50 ml de hipoclorito
128 de sodio al 10%, se sumergieron en esta solución durante un minuto, seguido de dos enjuagues para eliminar
129 residuos de la solución desinfectante (Mendoza, 2022). Las uvillas secas se ubicaron dentro de una cámara
130 húmeda (recipiente hermético desinfectado con una base de papel absorbente humedecido con agua estéril
131 (Mendoza, 2022). Las cámaras húmedas fueron incubadas durante 15 días a temperatura ambiente para
132 simular una atmósfera saturada de humedad y así favorecer el crecimiento de los hongos. De las uvillas con
133 crecimiento fúngico se obtuvieron pequeños trozos y se ubicaron directamente en platos Petri de Agar Papa
134 Dextrosa (PDA), se adicionó 1% de ácido láctico al medio para inhibir el crecimiento de bacterias y permitir el
135 crecimiento selectivo de hongos. Las placas se incubaron a 28 °C durante siete días, las colonias fúngicas
136 observadas a simple vista fueron aisladas y purificadas en platos Petri nuevos con PDA (Abdullah, Mahmoud,
137 & Al-harethi, 2016).

138 **2.3 Descripción macroscópica y microscópica**

139 Las características macroscópicas describieron a las colonias a partir de cultivo axénicos de siete días en
140 PDA, Czapeck y MEA. Las colonias son verdes, suaves, peludas y de rápido crecimiento, con una amplia
141 corona radial blanca. Se puede observar exudado goteando desde la superficie de la colonia. El reverso de
142 las colonias suele ser amarillo o crema. Las estructuras microscópicas del hongo como hifas hialinas
143 septadas, conidióforos, metulas, y fiálides se midieron utilizando microscopía y herramientas digitales de
144 análisis de imágenes, las cuales permitieron medir las estructuras microscópicas a través de un software
145 Dino-lite. Se aplicó una cinta adhesiva sobre la superficie del hongo para recoger las estructuras. La cinta se
146 colocó en el portaobjetos con una gota de azul de lactofenol para teñir las estructuras, y se analizaron
147 utilizando un microscopio compuesto (INSST, 2022). Las características macro y microscópicas fueron
148 comparadas con las mencionadas por Pontón et al. (2002), donde se observan estructuras filamentosas con
149 conidióforos septados de paredes lisas (200-300 μm) que presentan ramas terminales con metulas (8-12 μm)
150 y fiálides (7-12 μm). En ellos se forman conidios ovalados lisos (2,5-4 μm) de color azul o verde-azulado,
151 dispuestos en cadenas no ramificadas, con una característica forma de racimo o pincel.

152 **2.4 Identificación molecular**

153 El hongo *Penicillium* spp. se cultivó en PDA a 28°C durante 10 días. La masa micelial se recuperó con un
154 bisturí estéril y el ADN se extrajo usando el kit comercial Invitrogen Pure Link® Plant siguiendo el protocolo
155 del fabricante (Invitrogen, 2012). La región ITS del ADN ribosómico se amplificó mediante PCR usando los

156 cebadores ITS1 (5 'TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5 'GGTCCTCCGCTTATTGATATGC 3') (White
157 et al., 1990). La reacción de PCR se llevó a cabo con 1,25 µl de cada cebador, 12,5 µl de GoTaq® Green
158 Master Mix (Promega, 2016), 2 µl de ADN fúngico y 8 µl de agua libre de nucleasas. La amplificación se
159 realizó en un termociclador MultiGene Optimax con un programa de desnaturalización inicial de 2 minutos a
160 95°C, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 50°C por 30 segundos y
161 extensión a 72°C por 2 minutos, y una extensión final de 5 minutos a 72°C. Los productos de la amplificación
162 se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% (Invitrogen). El gel se cargó con 2 µl de
163 marcador de peso molecular 100bp DNA Ladder (Promega, 2017), teñido con Blue Dextran y examinado con
164 un transiluminador (Safe Imager™ 2.0). La secuenciación Sanger se realizó en la empresa Macrogen (Seúl,
165 Corea del Sur). Las secuencias recibidas se editaron usando el software MEGA X (Kumar et al., 2018). Se
166 compararon las secuencias consenso con las registradas en la base de datos GenBank del NCBI y Mycobank,
167 permitiendo la identificación a nivel de especie del hongo aislado de las uvillas postcosecha.

168 **2.5 Postulados de Koch**

169 Este estudio siguió el protocolo de Hernández-Montiel (2009), desinfectando las uvillas con una solución de
170 hipoclorito de sodio al 10% a una concentración del 2% durante un minuto, seguido de dos lavados con agua
171 estéril. Luego, de secarlas con papel absorbente, se realizaron tres cortes en tres de las frutas con una aguja
172 infectada con *Penicillium chrysogenum*, mientras que se dejó tres uvillas sin inocular como control. Todas las
173 frutas se colocaron en cámaras húmedas y se observó cada tres días para verificar la aparición de síntomas
174 similares a los de la podredumbre azul en cítricos.

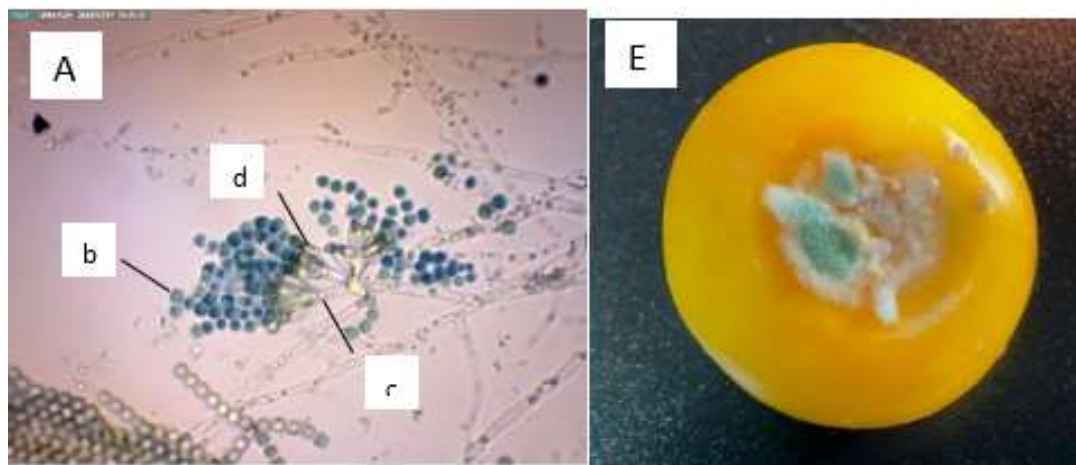
175 **2.6 Microcultivo**

176 El método del microcultivo (González *et al.*, 2010), se basó en la preparación de una cámara húmeda, en una
177 placa Petri con agua estéril en el fondo, y dos varillas de vidrio. Sobre las varillas se ubicó un portaobjetos, y
178 sobre este un trozo de un centímetro cuadrado de medio de cultivo PDA. El pedazo de agar fue inoculado con
179 esporas del hongo en estudio en los bordes utilizando un asa de platino en forma de L. Sobre el trozo del
180 medio inoculado se acomodó un cubreobjetos y se incubó durante siete días a 25°C. Al finalizar el periodo de
181 incubación, se retira el cubreobjetos y se lo coloca sobre un portaobjetos que contenía una o dos gotas de
182 azul de lactofenol para observar con microscopio compuesto, las estructuras características de la especie con
183 objetivos de 10x y 40x.

184 **3. Resultados**

185 **3.1 Aislamiento y descripción de las características fenotípicas de *Penicillium chrysogenum***

186 Los signos distintivos de la infección causada por *P. chrysogenum* en uvillas se presentaron como formación
187 de moho azul verdoso en la superficie, ablandamiento y descomposición de la pulpa (figura 1).



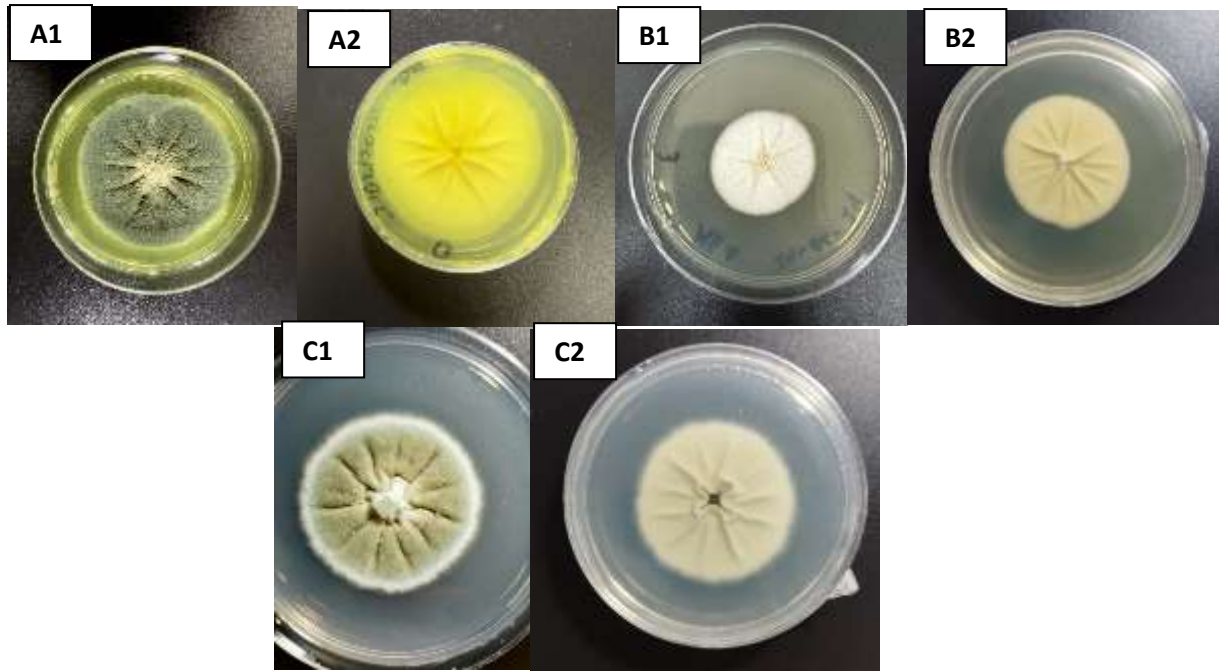
188

189 **Figura 1:** A) Características microscópicas de las estructuras de *Penicillium chrysogenum*. Observadas
190 mediante microcultivo en medio PDA con amplificación a 40X. Microconidios (b) métula (c) y fiálides (d). E)
191 Moho azul verdoso en la superficie de la fruta característico de *Penicillium* spp.

192 Las colonias presentaron en el anverso del plato Petri un aspecto de color verdoso con márgenes blancos. El
193 reverso de la colonia es amarillo. Por otra parte, las colonias formadas en el medio MEA presentaron en el
194 anverso un aspecto blanquecino y el reverso de la colonia es blanco y, por último, las colonias producidas en
195 el medio Czapek manifestaron colonias verdes con un tono azulado en el anverso y el reverso de color blanco
196 (figura 2).

197 La descripción microscópica se llevó a cabo utilizando un cultivo de PDA de siete días, en donde se
198 observaron la presencia de conidióforos ramificados y micelio septado con apariencia de plumero. Las fiálides
199 tienen aspecto de frasco (figura 1-d) donde los conidios elipsoidales (figura 1-b), se desarrollan, y los
200 conidióforos presentan metulas bien definidas (figura 1-c). El aislado AA1 fue identificado como un hongo del
201 género *Penicillium*, conforme con la morfología descrita por Díaz et al. (2020). Las mediciones de los
202 conidióforos, microconidios, metulas, y fiálides se exhibe en la tabla 1.

203



204

206

207

208

209 **Figura 2:** Observación macroscópica de *Penicillium* spp. después de siete días de crecimiento. 1) Anverso;
 210 2) Reverso; A) Colonias en agar papa dextrosa (PDA); B) Colonias en agar extracto de malta (MEA); C)
 211 Colonias en agar Czapek.

212 **Tabla 1:** Tamaño de las estructuras microscópicas después de 3 días de crecimiento.

| Código de cepa | Conidióforos | Conidias | Metula | Fiálides |
|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|-----------------|
| AA1 | 195-245 μm | 1.6-2.5 μm | 8 μm | 7 μm |

213

214 3.2 Identificación molecular de aislados fúngicos

215 A partir de los hongos aislados, se amplificaron amplicones mediante PCR utilizando las regiones ITS 1 e ITS
 216 4, los cuales tuvieron un tamaño aproximado de 600 pb. Las secuencias consenso derivadas de la
 217 secuenciación y alineamiento del gen ITS permitieron identificar el *Penicillium chrysogenum*. La Tabla 2
 218 presenta los porcentajes de identidad, los números de acceso y los valores de E-value obtenidos mediante el
 219 análisis BLAST (NCBI). Asimismo, se detallan los porcentajes de identidad y los números de acceso
 220 conseguidos a través del análisis en MycoBank. Los porcentajes de cobertura superaron el 96%. Además, el
 221 E-value fue consistentemente 0,0. Lo cual se considera aceptable, ya que como menciona Choudhuri (2014)
 222 un valor E de 0.0 en identificaciones moleculares señala que la similitud observada entre secuencias no es al
 223 azar, indicando una conexión confiable y significativa entre los elementos estudiados. Además, cuanto más
 224 cercano sea el valor E a 0, más precisa será la alineación entre las secuencias de los elementos analizados.

225

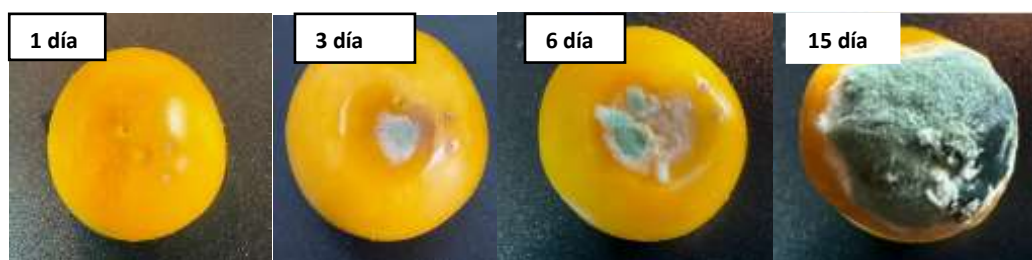
226 **Tabla 2:** Análisis molecular con los marcadores ITS 1 y ITS4 del aislado AA1 en las bases de datos del
227 NCBI y Mycobank

| Aislado | Numero de acceso | ID NCBI | (%) de similitud | E-value | Base de datos |
|---------|------------------|--------------------------------|------------------|-------------------|---------------|
| AA1 | JF834167.1 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 97.58% | 0.0 | NCBI |
| AA2 | MT079182.1 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 98.11% | 1e ⁻¹⁰ | NCBI |
| AA3 | SH 0884485.09 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 96,45% | – | Mycobank |
| AA4 | WM 06.341 | <i>Penicillium chrysogenum</i> | 92.41% | – | Mycobank |

228

229 3.3 Postulados de Koch

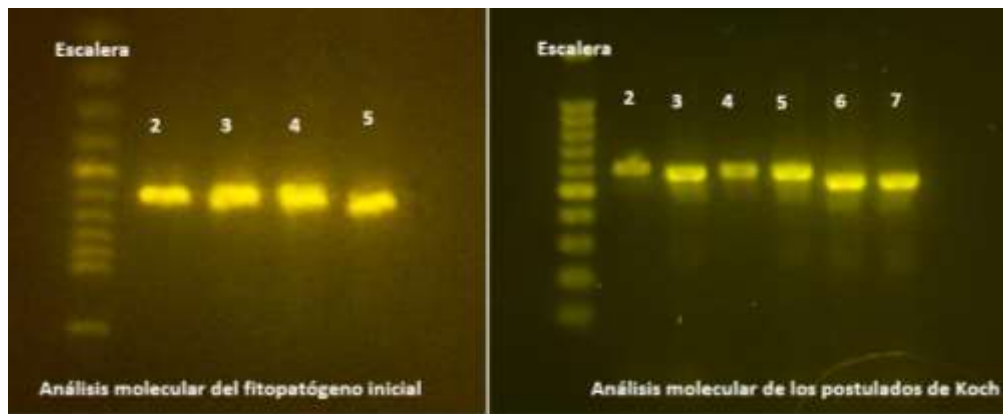
230 La cepa inoculada en frutas de uvilla desarrollaron síntomas característicos de la podredumbre azul causada
231 por *Penicillium* spp. en cítricos. Los primeros indicios de la infección se observaron tres días después de la
232 inoculación, manifestándose como pequeñas manchas de moho verde azulado en la superficie de las frutas.
233 A los seis días, estas manchas aumentaron progresivamente en tamaño y cantidad. Finalmente, al
234 completarse quince días, las uvillas estaban cubiertas a la mitad por el micelio, confirmando así la
235 patogenicidad del hongo aislado en este nuevo hospedador.



236

237 **Figura 3:** Evolución de *Penicillium chrysogenum* al ser inoculados en uvillas sanas (Postulados de Koch).

238 El aislado fúngico inoculado fue re aislado en plato Petri con PDA y se obtuvo la misma morfología
239 macroscópica y microscópica. Además, durante el análisis molecular, el hongo aislado mostró bandas de
240 tamaño similares en el gel de agarosa al patógeno inoculado (figura 4).



241

242

243

244

Figura 4: La electroforesis expone bandas de un tamaño cercano a las 600pb. El carril 1 fue utilizado para el marcador de peso molecular y en los carriles sucesivos se encuentran la muestra amplificada varias veces para confirmación.

245

4. Discusión

246

247

248

249

250

251

252

253

254

255

Los resultados del estudio muestran que *P. chrysogenum* es el fitopatógeno postcosecha responsable de la podredumbre azul en frutos de uvilla, caracterizada por la degradación de la fruta, formación de moho verde azulado en la superficie, y por el ablandamiento y la descomposición de la pulpa. Estos hallazgos son coherentes con los reportados por Almeida (2013), quien identificó a *P. expansum* como agente patógeno en manzanas y peras, mostrando síntomas de podredumbre blanda, necrosis y micelio azul. Donoso y Latorre (2006) también detectaron la presencia de *P. expansum* y *P. chrysogenum* como patógenos de las uvas, caracterizados por la formación de colonias de color verde o azul verdoso con márgenes blancos, además de la descomposición de los tejidos de la fruta. Además, Martínez et al. (2021) identificaron a *P. italicum* como responsable de la podredumbre azul y a *P. digitatum* como causante de la podredumbre verde en cítricos, manifestándose con manchas blandas y acuosas y la presencia de esporas de color azul-verdoso.

256

257

258

259

260

La alta incidencia de *P. chrysogenum* se explica por su presencia en vegetales, suelo, compost y alimentos, convirtiéndolo en un saprófito capaz de colonizar superficies y dañar productos debido a su acelerado crecimiento (Fernández, 2014). Su capacidad para producir micotoxinas y enzimas facilita la degradación de los componentes del alimento, provocando lesiones y pérdida de calidad del producto, lo que lo convierte en un importante patógeno de enfermedades postcosecha (Samson, 1989).

261

262

263

264

Las pérdidas causadas por patógenos como *P. digitatum* y *P. italicum*, que provocan podredumbre verde y azul respectivamente, son significativas a nivel mundial, con una incidencia comúnmente alta (más del 80% de los casos) (Carvalho, Nunes y Palou, 2012). Todos los estudios mencionados anteriormente coinciden con investigaciones previas en otros cultivos, donde especies de *Penicillium* son conocidas por causar

265 podredumbre azul postcosecha. Aunque no se encontraron estudios previos que mencionen a *P.*
266 *chrysogenum* como causante de la podredumbre azul en uvillas, los resultados de este estudio se destacan
267 por ser la primera vez que se describe a este hongo en frutas de uvilla, lo cual indica la necesidad de
268 desarrollar estrategias de manejo postcosecha para reducir la incidencia de este patógeno en estos frutos en la
269 región.

270

271 **5. Conclusiones**

272 Este estudio confirma que *P. chrysogenum* es un fitopatógeno postcosecha que causa la pudrición azul de la
273 uvilla. La enfermedad se manifiesta por la degradación de la fruta, formación de micelio verde azulado en la
274 superficie, y ablandamiento de la pulpa. Sin embargo, la falta de estudios específicos sobre *P. chrysogenum*
275 en uvillas indica la necesidad de seguir investigando su impacto y estudiar estrategias de manejo postcosecha
276 para reducir las pérdidas en la producción. Además, se logró identificar molecular y morfológicamente al
277 hongo *P. chrysogenum* a partir de frutos cosechados de uvilla y se llevaron a cabo los postulados de Koch
278 para corroborar que este hongo es el causante de enfermedades en la uvilla.

279 Este estudio proporciona una base importante para futuras investigaciones y para la implementación de
280 medidas de control que mejoren la calidad y conservación de la uvilla. La identificación precisa del patógeno
281 y la confirmación de su papel en la pudrición postcosecha son pasos cruciales para reducir las pérdidas
282 económicas en la producción de uvilla.

283

284 **Agradecimientos**

285 Al laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la PUCE, sede Quito y al proyecto de “Diagnóstico de
286 problemas fitosanitarios y agentes de control biológico asociados a uvilla (*Physalis peruviana*) en el Ecuador.
287 Convocatoria FCEN-PUCE 2022-2023” por financiar esta investigación.

288

289

290 **4. Referencias**

291 Abdullah, Q., Mahmoud, A., & Al-harethi, A. (31 de 7 de 2016). Isolation and Identification of Fungal Post-
292 harvest Rot of Some Fruits in Yemen. *PSM Microbiology*, 1, 36-44. Recuperado el 23 de 11 de 2023,
293 de <https://psmjournals.org/index.php/microbiol/article/view/99/68>
294 Almeida, D.P.F. 2013. Doenças de conservação das pomóideas, Inc Marual Eaytruta A Filossandace das
295 Pomoideas, Bayer Crop Science, po, 75-105. ISBN: 978-989-20-3811-7. Mitcham, B. (Ec.) 2002.
296 Postharvest Integrated Pest Management Postharvest Tecuralaeo Center University of California,
297 Davis, GA. Recuperado de:
298 https://www.phytoma.com/images/pdf/2017/292_octubre17_poscosecha_fruta_pepita.pdf

299 Beune. (2023). The Inca Berry and los Uvilleros-The struggles around the production of a new global superfood
300 in Ecuador's Northern Andes. *Wageningen University*. Recuperado el 24 de 10 de 2023, de
301 <https://edepot.wur.nl/394045>

302 Cárdenas. (2011). Estudio del efecto de la radiación uv-c sobre el decaimiento poscosecha en uvilla (physalis
303 peruviana l.) orgánica. Quito, Pichincha, Ecuador: *Universidad tecnológica equinoccial*. Recuperado
304 el 25 de 10 de 2023, de https://repositorio.ute.edu.ec/bitstream/123456789/4948/1/47763_1.pdf

305 Carvalho, C., Nunes, C. y Palou, L., (2012). Control de enfermedades de poscosecha [en línea]. Universidade
306 do Algarve. Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (CAAM). [Consultado el 3 de
307 junio de 2024]. Disponible en:
308 https://redivia.gva.es/bitstream/handle/20.500.11939/4981/2012_Pássaro_Control.pdf?sequence=1

309 Cedeño, E. (2018). Análisis de las pérdidas en el manejo post cosecha de naranja (*Citrus x sinensis*) en el
310 sitio DACA 1 de la parroquia Boyaca del cantón Chone. *Chone: Universidad Laica Eloy Alfaro de*
311 *Manabí*. Recuperado el 24 de 10 de 2023, de
312 <https://repositorio.ulead.edu.ec/bitstream/123456789/1452/1/ULEAM-AGRO-0036.pdf>

313 Choudhuri, S. (2014). Sequence Alignment and Similarity Searching in Genomic Databases. En *Elsevier*
314 *eBooks* (pp. 133-155). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410471-6.00006-2>

315 Chilán, V. (2010). Estudio sobre el comportamiento poscosecha del fruto de uvilla (physalis peruviana), en el
316 cantón cevallos de la provincia de tungurahua. *Ambato: Universidad técnica de Ambato*. Recuperado
317 el 25 de 10 de 2023, de <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/4321/1/Tesis-44agr.pdf>

318 Donoso, A. y Latorre, B., (2006). Caracterización del moho azul causado por *Penicillium* spp. en uva de mesa
319 almacenada en frío. *Ciencia e investigación AGRARIA* [en línea]. 33(2), 143–155. [Consultado el 3 de
320 junio de 2024]. Disponible en:
321 https://www.researchgate.net/publication/28127147_Caracterizacion_del_moho_azul_causado_por_Penicillium_spp_en_uva_de_mesa_almacenada_en_frio

322 Fernández, M., (2014). Caracterización de transportadores necesarios para la compartimentación de la
323 biosíntesis de penicilina en *Penicillium chrysogenum*. Grado de Doctor, Universidad de León.
324 [Consultado el 3 de junio de 2024]. Disponible en:
325 https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/4279/tesis_b39250.PDF?isAllowed=y&sequence=1

326
327

328 Grandes, B., Espín, S., Villacrés, E., Vaillant, F., Medina, G., & Badillo, F. (2008). Características físicas y
329 nutricionales de la fruta importantes en la investigación y elaboración de pulpas, jugos, concentrados
330 y postres. *Quito: INIAP*, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Nutrición y Calidad.
331 Recuperado el 24 de 10 de 2023, de <https://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/2623>

332 González, Luís, Manrique, Milagros, Montilla, Prince, Rojas, Tomás, Perelli, Amarily, & Calzolaio, Vita. (2010).
333 Identificación de flora fúngica en una empresa procesadora de alimentos del estado
334 Carabobo. *Kasmera*, 38(1), 45-52. Recuperado en 27 de junio de 2024, de
335 http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100005&lng=es&tlng=es.

336 Hernández Montiel, L. G., (2009). MECANISMOS ANTAGÓNICOS DE *Debaryomyces hansenii* HACIA
337 *Penicillium italicum* Y SU EFECTO EN LA PROTECCIÓN POSCOSECHA DEL LIMÓN MEXICANO.
338 Tesis para doctor en ciencias, Centro de investigación biológicas del noroeste, S.C. [Consultado el 1
339 de junio de 2024]. Disponible en:
340 http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/handle/123456789/244/hernandez_l%20TESIS.pdf?sequence=1&isAllowed=y

341
342

343 Herrera, P. (2015). Viabilidad de la producción y exportación de uvilla y sus derivados al mercado de Alemania.
344 Quito: *Pontificia Universidad Católica del Ecuador*. Recuperado el 10 de 11 de 2023, de
345 <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/8012/Tesis%20Final.pdf?sequence=1>

346 Hoffecker, E., & Lee, E. (2022). Rehabilitating Goldenberry Production in the Ecuadorian Andes With
347 Regenerative Agriculture. *Massachusetts Institute of Technology*. Recuperado el 24 de 10 de 2023,
348 de <https://d-lab.mit.edu/sites/default/files/inline-files/Rehabilitating%20Goldenberry%20Case-FINAL-Aug22%5B3%5D.pdf>

349 Huerta, D. (2014). *Penicillium* [en línea]. *Universidad Veracruzana*. [Consultado el 28 de mayo de 2024].
350 Disponible en: <https://es.slideshare.net/slideshow/penicillium-34153581/34153581>

351 INSST. (2022). *Penicillium* spp. Recuperado el 27 de 11 de 2023, de <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/penicillium-spp>

352
353

354 Invitrogen. (2012). PureLink® Plant Total DNA Purification Kit. Recuperado el 27 de 11 de 2023, de
355 https://assets.fishersci.com/TFS-Assets/LSG/manuals/purelink_plant_man.pdf?_ga=2.172030187.955867661.1686881409-200091846.1686116680

356
357

358 Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics
359 Analysis across Computing Platforms (Version 10.0). [Software]. Disponible en
360 <https://www.megasoftware.net>

361 Mendoza, K. G. (2022). Reporte de prueba realizada en cámara húmeda. *Scribd*. Recuperado de
<https://es.scribd.com/document/560718252/Reporte-de-Ensayo-Realizado-en-Camara-Humeda>

- 362 Moreno Caja, J., (2013). Identificación de fitopatógenos fungosos en tomatillo (*Physalis peruviana* L), en
363 Magdalena. Tesis de grado, *Universidad nacional de Cajamarca*. [Consultado el 28 de mayo de 2024].
364 Disponible en: <https://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/410>
- 365 Mosco Ramírez, (2013). Las podredumbres verdes y azules [en línea]. *RiuNet*. [Consultado el 28 de mayo de
366 2024]. Disponible en:
367 [https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/34626/RESUMEN%20CASTELLANO.pdf?sequence](https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/34626/RESUMEN%20CASTELLANO.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
368 [=2&isAllowed=y](https://m.riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/34626/RESUMEN%20CASTELLANO.pdf?sequence=2&isAllowed=y)
- 369 PRO ECUADOR. (2020). Oferta de uvilla ecuatoriana en mercados potenciales. *Ministerio de*
370 *Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca*. [Consultado el 28 de mayo de 2024].
371 Disponible en: www.proecuador.gob.ec
- 372 Promega. (2016). GoTaq® Green Master Mix. *Promega Corporation*. Recuperado el 27 de 11 de 2023, de
373 [https://www.promega.com/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-](https://www.promega.com/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix_protocol.pdf)
374 [master-mix_protocol.pdf](https://www.promega.com/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/gotaq-green-master-mix_protocol.pdf)
- 375 Promega. (2017). 100bp DNA Ladder. *Promega Corporation*. Recuperado el 27 de 11 de 2023, de
376 [https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-](https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight%20markers/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101)
377 [weight%20markers/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101](https://worldwide.promega.com/products/cloning-and-dna-markers/molecular-weight%20markers/100bp-dna-ladder/?catNum=G2101)
- 378 Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). Hongos y Actinomicetos Alergénicos.
379 Revista Iberoamericana de Micología, 36. [https://hongos-](https://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/036.PDF)
380 [alergicos.reviberoammicol.com/files/036.PDF](https://hongos-alergicos.reviberoammicol.com/files/036.PDF)
- 381 Robledo, O. (2016). Enfermedad de marchitamiento fúngico en plántulas de lechuga: un modelo didáctico-
382 experimental para la enseñanza de los postulados de Koch. *Universidad de Cádiz*. Recuperado el 25
383 de 11 de 2023, de <https://www.redalyc.org/journal/920/92046968012/html/>
- 384 Rodríguez, F., Gómez, O., Flores, S., Vargas, C., Tamayo, F., & Medel, S. (2017). Actividad de dos hongos
385 entomopatógenos, identificados molecularmente, (Vol. 43). *Bogotá, Colombia: Revista Colombiana*
386 *de Entomología*. Recuperado el 27 de 11 de 2023, de
387 file:///C:/Users/PC/Downloads/RCdEJun2017_43_1_27_33.pdf
- 388 Rodríguez, J. (2006). Producción de Frutas y Hortalizas. *Revista Eroski Consumer*. Recuperado el 24 de 10
389 de 2023, de www.consumer.es
- 390 Salgado, A. (2006). Incidencia de las enfermedades en uchuva *Physalis peruviana* L. por estado fenológico y
391 de acuerdo con la ubicación en los diferentes estratos de la planta, en el departamento de
392 cundinamarca. Bogotá: *Pontificia universidad javeriana*. Recuperado el 24 de 10 de 2023, de
393 <https://repositorio.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8260/tesis244.pdf?sequence=1>
- 394 Samson, R.A. (1989). Filamentous fungi in food and feed. *Journal of Applied Bacteriology Symposium*
395 *Supplement*, 27S-35S. https://www.academia.edu/50218983/Filamentous_fungi_in_food_and_feed
- 396 Vélez, D. (2020). Cultivo de hongos en cámara húmeda. *Julio Issac Espinosa Ochoa*. Recuperado el 23 de
397 11 de 2023, de https://issuu.com/emely10encalada/docs/cultivo_de_hongos_en_c_maras_h_medas
- 398 Villacís Constante, A. E., (2002). Producción e investigación de mercados para la uvilla. BachelorThesis,
399 *Universidad de las Américas*. [Consultado el 28 de mayo de 2024]. Disponible en:
400 <http://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/9645>
- 401 Yáñez, J. M., Arellano, M. J., Silva, A. D., & Garzón, C. D. (2019). First Report of Fusarium Wilt by *Fusarium*
402 *oxysporum* in *Physalis peruviana* in Ecuador. *Plant Disease*, 103(10), 2678.
403 <https://doi.org/10.1094/pdis-10-18-1807-pdn>
- 404 White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplificación y secuenciación directa de genes de ARN
405 ribosómico fúngico para filogenia. *California: Estados Unidos: Prensa Académica*. Recuperado el 27
406 de 11 de 2023, de
407 [https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W](https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics)
408 [Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics](https://www.researchgate.net/publication/223397588_White_T_J_T_D_Bruns_S_B_Lee_and_J_W_Taylor_Amplification_and_direct_sequencing_of_fungal_ribosomal_RNA_Genes_for_phylogenetics)
409

410

411

412

413

Anallely A.

Firma de la estudiante

Grace Anallely Aguayo Bowen

Quito, 28 de junio del 2024



Firma del director de disertación

Mtr. Jeniffer Yáñez A.

Quito, 28 de junio del 2024

Firma de la coordinadora de carrera

Dra. Diana Astorga

Quito, 2024