

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS**

**DISERTACIÓN PREVIA A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA**

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS  
MICROSCÓPICOS OBTENIDOS EN CULTIVOS COMERCIALES  
ENFERMOS, EN LA REGIÓN INTERANDINA CENTRO- NORTE  
DEL ECUADOR EN EL PERÍODO 2011-2012**

**MARÍA CRISTINA AVILÉS GUZMAN  
GABRIELA FERNANDA GRANJA VALLE**

**DIRECTORA: Mtr. JENIFFER YÁNEZ ALTUNA**

**QUITO, 2014**

## **DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN**

Nosotras, **MARÍA CRISTINA AVILÉS GUZMÁN** Y **GABRIELA FERNANDA GRANJA VALLE**, CI.171799904-7 y 171865206-6, autoras del trabajo de graduación intitulado “IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE HONGOS MICROSCÓPICOS OBTENIDOS EN CULTIVOS COMERCIALES ENFERMOS, EN LA REGIÓN INTERANDINA NORTE – CENTRO DEL ECUADOR EN EL PERÍODO 2011-2012”, previa a la obtención de grado académico de LICENCIADO EN MICROBIOLOGÍA CLÍNICA Y APLICADA en la Escuela de Bioanálisis.

1. Declaramos tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.
2. Autorizamos a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador a difundir a través del sitio web de la Biblioteca de la PUCE el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la Universidad

Quito, marzo del 2015

**MARÍA CRISTINA AVILÉS GUZMÁN**  
CI 171799904-7

**GABRIELA FERNANDA GRANJA VALLE**  
CI 171865206-6

## **DEDICATORIA**

Este trabajo lo dedicamos:

A Dios, por habernos dado la fortaleza y sabiduría para alcanzar nuestras metas.

A nuestros padres por su sacrificio y por brindarnos siempre todo su amor y comprensión.

A nuestros maestros, por sus sabias enseñanzas y a los compañeros, por su amistad fraternal; para ellos, nuestro respeto y gratitud

## **AGRADECIMIENTO**

Dejamos constancia de nuestro especial agradecimiento, a nuestra Directora Mtr. Jeniffer Yáñez Altuna, ya que gracias a su sabia dirección y vocación educativa, hizo posible la culminación de ésta, nuestra disertación. A todos y a cada uno de los Catedráticos de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, quienes con sus conocimientos y enseñanzas propiciaron nuestra formación, hasta la culminación de nuestros estudios.

Un especial agradecimiento al Centro Internacional de la Papa (CIP) por permitirnos realizar nuestro trabajo de investigación en sus instalaciones y por darnos la oportunidad de formarnos y seguir preparándonos profesionalmente.

Agradecemos a todas aquellas personas que disponen de este documento, nuestra finalidad es de incentivar a la investigación de más y nuevas especies de los hongos microscópicos existentes en nuestro país.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

|   |      |
|---|------|
| DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN .....                                      | ii   |
| DEDICATORIA.....  | iii  |
| AGRADECIMIENTO .....  | iv   |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS.....   | v    |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....   | viii |
| ÍNDICE DE TABLAS.....   | ix   |
| ÍNDICES DE ANEXOS.....  | x    |
| RESUMEN.....  | xi   |
| ABSTRACT .....  | xii  |
| CAPÍTULO I.....   | 12   |
| 1. Introducción.....  | 12   |
| 1.1. Objetivos.....   | 15   |
| 1.1.1. Objetivo General.....  | 15   |
| 1.1.2. Objetivos Específicos .....                                    | 15   |
| CAPÍTULO II.....  | 17   |
| 2. Marco Teórico .....  | 17   |
| 2.1. Los Hongos.....  | 17   |
| 2.1.1. Diversidad de hongos .....                                     | 17   |
| 2.1.2. Características de los hongos microscópicos .....              | 18   |
| 2.1.3. Reproducción.....  | 19   |
| 2.2 Clasificación de los hongos .....                                 | 20   |
| 2.2.1 Hongos endófitos.....   | 21   |
| 2.2.2 Hongos biocontroladores.....                                    | 22   |
| 2.2.3 Hongos Patógenos .....  | 24   |
| 2.3 Interacciones entre hongos y plantas .....                        | 26   |
| 2.3.1 Enfermedades en plantas causadas por hongos microscópicos ..... | 27   |
| 2.4 Cultivos comerciales del Ecuador .....                            | 28   |
| 2.5 Identificación de hongos microscópicos. ....                      | 30   |
| 2.5.1 Técnicas morfológicas para la identificación de hongos.....     | 30   |
| 2.5.2 Técnicas moleculares para la identificación de hongos.....      | 31   |
| 2.5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....                | 31   |

|                    |   |    |
|--------------------|---|----|
| 2.5.2.2            | Secuenciación .....   | 32 |
| 2.5.2.3            | Marcadores moleculares para la identificación de hongos .....                           | 32 |
| 2.5.2.4            | Espaciador transcrito interno ribosomal .....   | 32 |
| 2.6                | Medida de la biodiversidad.....   | 33 |
| 2.6.1              | Índices de Diversidad .....   | 35 |
| 2.6.2              | Índices de equidad .....  | 35 |
| 2.6.3              | Índices de dominancia .....   | 36 |
| 2.7                | Análisis Filogenéticos .....  | 37 |
| CAPÍTULO III ..... |   | 39 |
| 3.                 | Marco Metodológico. ....  | 39 |
| 3.1                | Materiales, reactivos y equipos. ....   | 39 |
| 3.1.1              | Materiales de Laboratorio.....  | 39 |
| 3.1.2              | Reactivos y otras sustancias. ....  | 39 |
| 3.1.3              | Equipos. ....   | 40 |
| 3.2                | Métodos .....   | 40 |
| 3.2.1              | Recolección de muestras .....   | 40 |
| 3.2.2              | Procesamiento de las muestras .....   | 41 |
| 3.3                | Obtención de cultivos puros .....   | 42 |
| 3.3.1              | Desinfección y siembra de las muestras .....  | 42 |
| 3.3.2              | Purificación del hongo.....   | 43 |
| 3.4                | Identificación morfológica .....  | 43 |
| 3.5                | Identificación Molecular.....   | 44 |
| 3.5.1              | Inducción del desarrollo micelial para obtener células vegetales y extraer su ADN. .... | 44 |
| 3.5.2              | Extracción y cuantificación del ADN.....  | 46 |
| 3.5.3              | Amplificación del gen ITS .....   | 46 |
| 3.5.4              | Secuenciación .....   | 48 |
| 3.6                | Análisis de los datos .....   | 50 |
| 3.6.1              | Análisis de diversidad.....   | 50 |
| 3.6.2              | Análisis filogenéticos .....  | 50 |
| CAPÍTULO IV .....  |   | 52 |
| 4.                 | Resultados y Discusión.....   | 52 |
| 4.1                | Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica.....                           | 52 |
| 4.2                | Identificación molecular .....  | 53 |

|   |    |
|---|----|
| 4.2.1 Concentración y pureza de ADN.....  | 53 |
| 4.3 Identificación Molecular de Hongos .....  | 55 |
| 4.3.1 Identificación molecular de hongos en haba .....  | 56 |
| 4.3.2 Identificación molecular de hongos en maíz. ....  | 60 |
| 4.3.3 Identificación molecular de hongos en papa .....  | 62 |
| 4.3.4 Identificación molecular de hongos en tomate riñón.....   | 64 |
| 4.4 Estudio de la diversidad de hongos microscópicos encontrados en papa, tomate riñón, haba y maíz de las regiones Norte y Centro de la Sierra Ecuatoriana. .... | 66 |
| 4.5 Análisis de las relaciones filogenéticas de los hongos microscópicos identificados ....   | 69 |
| CONCLUSIONES.....   | 71 |
| RECOMENDACIONES .....   | 72 |
| REFERENCIAS .....   | 73 |
| ANEXOS.....   | 83 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Principales divisiones del Reino Fungi.....   | 21 |
| Figura 2. Componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad de escarabajos en un paisaje integrado por tres comunidades.....   | 34 |
| Figura 3. Índices de Shannon-Wiaver .....   | 36 |
| Figura 4. “Bootstrap. Nature Reviews Genetic, 2012” .....   | 38 |
| Figura 5. Toma de muestras durante la salida a Querococha, 2012. ....   | 41 |
| Figura 6. Centro Internacional de la Papa, CIP, 2012. ....  | 41 |
| Figura 7. Transferencia de hongos microscópicos. CIP, 2012. ....  | 42 |
| Figura 8. Purificación del hongo. CIP, 2012.....  | 43 |
| Figura 9. Cosecha de micelio. CIP, 2012. ....   | 45 |
| Figura 10. Molienda. CIP, 2012.....   | 46 |
| Figura 11. Cromatograma del aislado Haba 7 ITS5.....  | 48 |
| Figura 12. Alineamiento de Secuencias para obtener una secuencia consenso.....  | 49 |
| Figura 13. Secuencia consenso de papa 6. ....   | 49 |
| Figura 14. Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso en estudio. BLAST, 2014, NCBI. ....   | 50 |
| Figura 15. Identificación molecular y secuencias obtenidas de los hongos aislados del cultivo de haba. ....   | 57 |
| Figura 16. Identificación molecular y secuencias obtenidas de los hongos aislados del cultivo de maíz. ....   | 59 |
| Figura 17. Identificación molecular y secuencias obtenidas de los hongos aislados del cultivo de papa.....  | 61 |
| Figura 18. Identificación molecular y secuencias obtenidas de los hongos aislados del cultivo de tomate de riñón.....   | 63 |
| Figura 20. Árbol filogenético correspondiente a la relación de los hongos microscópicos aislados de haba, maíz, papa y tomate riñón de la Región Centro y Norte del Ecuador. .... | 70 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Codificación de las bases degeneradas.....   | 49 |
| Tabla 2. Resultados de la identificación morfológica de los hongos analizados .....   | 52 |
| Tabla 3. Valores de las concentraciones de ADN en ng/μl, cuantificados con Nanodrop.  | 54 |
| Tabla 4. Riqueza de especies agrupadas por regiones. Los números de accesos del “ <i>GenBank</i> ” son de las secuencias que ayudaron a identificación de las especies presentes en el estudio..... | 66 |
| Tabla 5. Índice de Shannon .....  | 67 |
| Tabla 6. Índice de Simpson .....  | 68 |

## ÍNDICES DE ANEXOS

|   |    |
|---|----|
| Anexo 1. Selección de la muestra para ser cultivado. ....   | 83 |
| Anexo 2. Desinfección de muestras .....   | 83 |
| Anexo 3. Siembra del corte del tejido. ....   | 83 |
| Anexo 4. Preparación de medios de cultivos.....   | 84 |
| Anexo 5. Preparación de las muestras para observar hongos microscópicos con Azul de lacto fenol .....             | 86 |
| Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN (PROMEGA).....  | 87 |
| Anexo 7. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de los cultivos obtenidos en este estudio. .... | 91 |
| Anexo 8. Amplificación de la región ITS4-ITS5. ....   | 95 |

## RESUMEN

Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad de hongos microscópicos en el mundo debido a su variedad de climas y regiones. Por esa razón existe una gran diversidad de hongos altamente adaptables que se encuentran presentes en prácticamente todos los ecosistemas. Si bien en su mayoría cumplen con una función indispensable y benéfica, existen algunas especies que, desde el punto de vista humano, son dañinas dado que son los organismos que más afectan a los cultivos de importancia comercial. El estudio de hongos microscópicos mediante técnicas moleculares se ha convertido en una herramienta útil para el reconocimiento rápido y preciso de los posibles patógenos que afectan a los cultivos. El objetivo del presente estudio fue identificar tanto morfológica como molecularmente las especies de hongos microscópicos presentes en la superficie de plantas aparentemente enfermas. Para lo cual, se colectaron 46 muestras de las partes aéreas de cuatro cultivos de importancia económica que estaban aparentemente enfermos. El aislamiento, purificación e identificación morfológica de los hongos se realizó en los laboratorios del Centro Internacional de la Papa (CIP-Quito); mientras que la extracción de ADN y amplificación del gen ITS se realizaron en los laboratorios de la Escuela de Bioanálisis de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Los productos de PCR obtenidos se enviaron para su purificación y secuenciación a Macrogen, Seúl - Corea. Las secuencias fueron editadas para obtener secuencias consenso las mismas que fueron comparadas con las secuencias disponibles en la base de datos *GenBank* para su identificación molecular utilizando la herramienta BLAST. La biodiversidad fue calculada utilizando los Índices de Shannon y Simpson, y el análisis filogenético se realizó con el método *Neighbour joining*. Como resultado, un total de 38 hongos fueron aislados de los cuales 9 fueron identificados morfológicamente y 34 molecularmente. Las especies de hongos microscópicos identificados pertenecen a los géneros *Alternaria*, *Bionectria*, *Clonosthachys*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Botriotinia* y *Paecilomyces*. En conclusión, la mayoría de los hongos identificados son endófitos los mismos que pueden ser utilizados como antagonistas contra otros patógenos; por tanto pueden ser utilizados como biocontroladores de plagas que afectan a los principales cultivos de interés comercial y fomentar una agricultura ecológica.

## ABSTRACT

Ecuador is one of the countries with the highest biodiversity of microscopic fungi in the world due to its variety of climates and regions. For this reason, there is great diversity of highly adaptable fungi, which are present in virtually all ecosystems. While most fulfill a vital and beneficial role, there are some species from the human point of view, considered as harmful because they are organisms that affect crop of commercial importance. The study of microscopic fungi using molecular techniques has become a useful tool for quick and accurate potential pathogens affecting crops recognition. The objective of this study was to identify microscopic fungi species present on the surface of apparently diseased plants based on morphological and molecular techniques. For this purpose, 46 samples collected of aerial parts of four economically important crops were apparently sick. Isolation, purification and morphological identification of fungi was carried out in the laboratories of the International Potato Center (CIP-Quito); while DNA extraction and amplification of the ITS gene were performed in the laboratories of the School of Bioanalysis at the Pontifical Universidad Católica del Ecuador. The PCR products obtained were sent for purification and sequencing to Macrogen, Seoul - Korea. Sequences were edited for consensus sequences thereof were compared with sequences available in the GenBank database for molecular identification using the BLAST tool. Biodiversity was calculated using the Shannon and Simpson indices, and phylogenetic analysis was performed using the Neighbour joining method. As a result, a total of 38 fungi were isolated, 9 of which were identified morphologically and molecularly 34. Species identified microscopic fungi belonging to the genus *Alternaria*, *Bionectria*, *Clonostachys*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Botriotinia*, and *Paecilomyces*. In conclusion, most of the identified endophytic fungi are the same that can be used as antagonists against other pathogens; therefore can be used as biocontrol of pests affecting major crops of commercial interest and promote organic farming.

# CAPÍTULO I

## 1. Introducción

Los hongos son considerados los organismos más diversos después de los insectos. Su riqueza se estima en 1,5 millones de especies a nivel mundial según Hawksworth, 1993 citado por (Gamboa, Heredia, Reyes, & De la Rosa, sf). En particular, los hongos microscópicos (HM) están ampliamente distribuidos en la biósfera, colonizando prácticamente cualquier tipo de sustrato orgánico. Dentro de los hongos microscópicos existen especies endófitas, epifitas, patógenas y simbioses que influyen directamente, a través de sus actividades, en el equilibrio de los ecosistemas (Iberoamericana, 2003).

Según el Ministerio del Ambiente del Ecuador (2010), el Ecuador es uno de los 17 países más ricos en diversidad biológica. La biodiversidad presente en el país se debe principalmente a tres factores como la ubicación del país en el neotrópico, la presencia de la cordillera de los Andes y la influencia de las corrientes marinas en sus costas (M.A.E., 2010), aunque el país se caracteriza por la alta biodiversidad no se han realizado estudios para identificar las especies de hongos microscópicos presentes en cultivos agrícolas existen evidencias de estudios acerca de la identificación de hongos marinos en los manglares del Ecuador (Panchana, 2009) y (Álvarez, 2011).

Los cambios producidos en el ambiente al transformar ecosistemas naturales en agroecosistemas (espacios de cultivos de plantas) causan un fuerte impacto en la dinámica del organismo. Por ejemplo las poblaciones de especies que obtienen alimentos de los cultivos, suelen incrementarse considerablemente; se vuelven plaga y causan pérdidas económicas. Éste es el caso de diversos hongos microscópicos, a los que por su habilidad de enfermar a las plantas cultivadas y reducir su capacidad para producir alimento, se les llama patógenos. Sin embargo, hay hongos que no afectan a las plantas sino a otros hongos que sí lo hacen. Estos hongos se consideran microorganismos benéficos que pueden incluirse en un programa de manejo integral (Huerta, sf).

En ese sentido, para prevenir las enfermedades de los cultivos de importancia comercial es importante conocer la biodiversidad de especies fúngicas. Para conocer la diversidad de hongos microscópicos es esencial identificarlos. Dicha identificación se realiza a través de técnicas de diagnóstico tradicionales y moleculares para el reconocimiento rápido y preciso de los microorganismos presentes en los cultivos (Daniell, Streatfield, & Wycoff, 2001).

La identificación de hongos microscópicos por técnicas tradicionales consiste en la descripción macroscópica de la colonia y en la observación de estructuras microscópicas como esporas, hifas, micelios (Agrios, 2005).

En la actualidad, existen técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y la secuenciación del material genético que son utilizadas para la identificación y caracterización de hongos (López, 2007). En general, los genes ribosomales son ampliamente utilizados para la identificación de hongos; en particular, del espaciador transcrito interno (ITS) ribosomal. Los dos métodos mencionados permiten la identificación de las especies lo que ayuda a encontrar hongos microscópicos fitopatógenos y sus antagonistas presentes en los cultivos. El diagnóstico por PCR resulta más rápido que los métodos tradicionales para aislar el patógeno (Schaad, Opgenorth, & Gaush, 2002). Pero la técnica no solo ayuda a identificar hongos patógenos sino también hongos microscópicos biocontroladores que podrán ser usados contra los hongos fitopatógenos. El conocimiento de estos microorganismos ayudará a un mejor manejo en el campo de la agricultura (Cueva, 2008).

El control de estas plagas en la agricultura se ha caracterizado por el uso intensivo de plaguicidas químicos. El uso indiscriminado de plaguicidas ha ocasionado pérdidas en el rendimiento y la aparición de resistencia en las plagas que han llevado a los productores a incrementar el uso de plaguicidas. Adicionalmente, el uso de productos químicos genera problemas de contaminación ambiental, muerte de la fauna benéfica, presencia de residuos químicos en los frutos, riesgo de intoxicaciones agudas y crónicas e incremento en los costos de producción (Flores, Egúsqüiza, Alcarraz, Woolcott, & Benavides, 2011). La identificación de las especies de hongos microscópicos ayudará a minimizar las pérdidas de los cultivos por las enfermedades y los costos para el tratamiento se reducen. Esto se debe a la mayoría de las plagas y organismos fitopatógenos tienen antagonistas biológicos o enemigos naturales que se pueden emplear como estrategia de lucha en un programa de control biológico. El control biológico clásico consiste en la potenciación o utilización de los enemigos naturales de una plaga para reducir su población (Rubio & Fereres, 2005). Estudios recientes demuestran la enorme capacidad que tienen los hongos endófitos para producir compuestos activos que le confieren protección a su hospedera contra el ataque de patógenos y herbívoros (Sánchez, Sandoval, Ulloa, Armendariz, & García, 2013). La falta de estudios acerca de la diversidad de hongos microscópicos asociados a la filósfera en los cultivos se debe a que las técnicas microbiológicas son limitadas debido al elevado

porcentaje de microorganismos no-cultivables (95–99%), este hecho representa una gran limitación en el estudio de la diversidad biológica. Sin embargo, los recientes avances en los métodos moleculares permiten analizar los mecanismos de interacción entre las plantas y los microorganismos, así como entender el papel de los microorganismos en procesos edáficos y ecológicos (Cordero, López, , Calderón, Figueroa, & Martínez, 2012). Además, los principales problemas a los que se enfrenta el conocimiento de la diversidad de los hongos microscópicos son la baja proporción de investigadores especializados y la poca importancia de la biodiversidad en cultivos de importancia comercial. El conocimiento de los microorganismos presentes en los cultivos ayudará a un mejor manejo de las enfermedades en cultivos como papa, cebada, maíz, arvejas, frijoles, habas, lentejas, cebolla, col, tomate de riñón, aguacate entre otros que son valiosos para la dieta ecuatoriana.

A pesar de que el Ecuador es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, no existe información acerca de la diversidad de hongos microscópicos en cultivos de importancia comercial. Por lo tanto, los resultados de la presente investigación aportarán con nueva información con respecto a la diversidad de hongos microscópicos presentes en cuatro cultivos de la Sierra ecuatoriana. Además, esta investigación dará inicio a una serie de nuevas investigaciones debido a que se reportará la presencia de especies de hongos fitopatógenos, biocontroladores y endófitos. Esta información es de gran importancia para el campo de la agricultura y el control de plagas en cultivos de importancia comercial

Por este motivo la presente investigación tiene el propósito de identificar tanto morfológica como molecularmente hongos microscópicos obtenidos de cultivos comerciales enfermos de la región interandina centro-norte del Ecuador en el periodo 2011-2012 mediante el diagnóstico convencional y la amplificación del espaciador transcrito interno (ITS).

La importancia del estudio y conservación de la biodiversidad radica en asegurar la multiplicidad de funciones que poseen los distintos organismos del ecosistema, a la vez que de mantener esas funciones cuando se produzcan alteraciones del medio. De esta forma, un mayor grado de diversidad de especies o de grupos funcionales aumentará la capacidad de reacción del ecosistema (Sánchez, 2009).

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1. Objetivo General**

Identificar morfológica y molecularmente las especies de hongos microscópicos presentes en los cultivos comerciales enfermos de la Región Interandina Centro-Norte del Ecuador mediante análisis convencionales y técnicas moleculares.

### **1.1.2. Objetivos Específicos**

- Aislar y purificar hongos microscópicos de tejido vegetal enfermo.
- Identificar morfológicamente los hongos aislados en este ensayo a través de técnicas convencionales.
- Determinar la especie o especies de los hongos microscópicos aislados mediante la amplificación y secuenciación del espaciador transcrito interno (ITS).
- Determinar la biodiversidad de los hongos microscópicos de cuatro cultivos comerciales de las regiones centro y norte mediante los índices de Shannon ( $H'$ ) y Simpson ( $\lambda$ )
- Realizar un árbol filogenético de las especies de hongos microscópicos identificados mediante el método de “*Neighbour joining*”.

## **CAPÍTULO II**

### **2. Marco Teórico**

#### **2.1. Los Hongos**

Los hongos son pequeños organismos, generalmente microscópicos, que carecen de clorofila y de tejido conductores. La mayoría de las 100,000 especies de hongos conocidas son estrictamente saprofitas y viven sobre la materia orgánica muerta, a la que descomponen. Alrededor de 8,000 especies de hongos producen enfermedades en plantas. Algunos hongos crecen y se reproducen solo cuando establecen una cierta asociación con las plantas que les sirven de hospedero durante todo su ciclo de vida (parásitos obligados), otros requieren de una planta hospedera durante una cierta etapa de su ciclo de vida, el cual lo puede concluir desarrollándose en medios artificiales, y más aún otros se desarrollan y reproducen tanto en plantas vivas como en materia orgánica muerta (parásitos no obligados) (Agrios, 2005).

La mayoría de los hongos tienen un micelio es el conjunto de filamentos y un trozo del mismo se denomina hifa. Las hifas pueden presentar septos y entonces el micelio está tabicado. Septos primarios son los formados cuando hay división nuclear y adventicia los otros. Si los tabiques están ausentes se habla de micelio continuo (Carrillo , 2003).

##### **2.1.1. Diversidad de hongos**

Los hongos son considerados los organismos más diversos después de los insectos. Su riqueza se estima en 1,5 millones de especies a nivel mundial (Gamboa et al.,sf) . En particular, los hongos microscópicos (HM) están ampliamente distribuidos en la biósfera (Iberoamericana, 2003). Un total de 700,000 especies de HM podrían existir en el planeta (Agrios, 2005) colonizando prácticamente cualquier tipo de sustrato orgánico (Iberoamericana, 2003). El 60 y 70 % de los hongos microscópicos del Reino Fungi están representados en todos los phyla de la escala taxonómica de la clasificación de los hongos. Aunque los hongos microscópicos son abundantes en relación a los hongos macroscópicos,

se ha prestado mayor atención a las especies macroscópicas (Rossman, 1994). Por ese motivo, apenas se ha descrito entre el 10-30 % del total de hongos microscópicos (Agrios, 2005). El conocimiento de la diversidad fúngica es importante para entender el adecuado funcionamiento de los ecosistemas, así como potencial fuente de nuevos productos bioactivos (Hawksworth, 2004).

Ecuador aparece casi al final de la lista de naciones privilegiadas. Sin embargo, al comparar las cifras de especies de cada país en relación a su superficie, Ecuador ocupa el primer lugar en el mundo. Con tan solo 256,370 km<sup>2</sup>, el 0,2% de la superficie del planeta, el país ocuparía las primeras posiciones en el número de especies por unidad de área para el caso de las plantas vasculares, mamíferos, aves, reptiles y anfibios (Ministerio del Ambiente del Ecuador).

Son muchos los estudios acerca de la flora y fauna de la región Sur del Ecuador, pero poco se sabe de la microflora, estudios recientes han proporcionado información acerca de esta en ambientes marinos como los manglares (Andrade, Cartuche, Cruz, & Meneses, 2014). Algo más se conoce acerca de la diversidad de macrohongos por ejemplo la Pontificia Universidad Católica del Ecuador posee un fungario con más de 4000 especies de hongos macroscópicos del Ecuador (Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2014).

### **2.1.2. Características de los hongos microscópicos**

Estos microorganismos heterótrofos tienen una pared formada por quitina el cual es un polisacárido muy rígido. Una característica común es que no pueden realizar fotosíntesis ya que carecen de plastidios y por tanto deben nutrirse a partir de materia orgánica ya elaborada (Arias & Piñeros, 2008). Los hongos absorben el alimento después de descomponerlo en pequeñas moléculas las cuales atraviesan la membrana plasmática mediante difusión o con la ayuda de las proteínas de transporte. La mayoría de los hongos son saprófitos, organismos que se alimentan de materia orgánica muerta. Por otro lado, los hongos también son parásitos, seres que se alimentan de sus organismos-huéspedes vivos (Murray, 2006). Los hongos parásitos se desarrollan sobre la superficie o entre el tejido de las plantas y se caracterizan porque producen una estructura llamada haustorio. La mencionada estructura penetra en el interior de las células y le ayuda a extraer los nutrientes necesarios para el crecimiento del hongo (Coto, 2007). Los hongos también

pueden ser depredadores, organismos que matan al ser del que se alimentan (Murray, 2006).

Los hongos se caracterizan por presentar estructuras básicas llamadas hifas. Las hifas presentan una forma filamentosa llenas de citoplasma, el tamaño varía dependiendo del organismo. Algunas hifas se caracterizan por la presencia de septos que son paredes transversales; mientras que otras hifas carecen de septos. Las hifas que presentan septos se llaman hifas septadas y las que no presentan septos se las conoce como hifas cenocíticas. En conjunto las hifas forman una estructura conocida como micelio. El micelio puede no estar presente en algunos hongos por lo que se los conoce como atípicos; este tipo de hongos son los formadores de plasmodios, capa mucilaginosa de citoplasma multinucleado, y las levaduras (Coto, 2007).

### **2.1.3. Reproducción**

Los hongos se reproducen principalmente mediante esporas, estructuras reproductoras especializadas para la propagación del hongo (Agrios, 2005). Las esporas carecen de flagelos o estructuras móviles por lo que son dispersadas por el viento o por los animales. Para la producción de esporas, algunos hongos suelen tener hifas aéreas que forman estructuras reproductivas grandes y complejas denominadas cuerpos fructíferos o esporocarpos (Carranza, 2006).

Los hongos se caracterizan porque pueden producir esporas de manera sexual o asexual que se caracterizan por ser haploides, posee sólo la mitad del número de cromosomas somáticos. En la reproducción sexual, las hifas de dos tipos de apareamiento genéticamente distinto se reúnen y sus núcleos se fusionan para formar un cigoto diploide. Por ejemplo, en dos grupos de hongos, ascomicetos y basidiomicetos, las hifas se fusionan pero los dos núcleos distintos no se fusionan de inmediato, si no que permanecen separados dentro de un citoplasma fungal. Cuando la espora entra en contacto con una fuente de alimento adecuada, germina y comienza a desarrollarse. Una hifa filiforme emerge de la diminuta espora y crece, ramificándose con frecuencia (Carranza, 2006).

La forma simple de la reproducción asexual es la producción de esporas asexuales que pueden ser producidas bien exógenamente en los extremos o lados de las hifas, o

endógenamente en estructuras especializadas semejantes a sacos llamadas esporangios. Los hongos inferiores producen esporas en esporangios que están formados típicamente en los extremos de hifas ordinarias o en hifas especializadas denominadas esporangióforos, aunque pueden ser formados a lo largo de la estructura hifal. Muchos hongos terrestres producen esporas no móviles llamadas aplanosporas, pero los acuáticos y algunos hongos habitantes del suelo que viven en suelos húmedos producen esporas móviles, llamadas zoosporas, dentro de esporangios. La movilidad de las zoosporas es conferida por la posesión de flagelos. En los hongos que producen zoosporas, el esporangio es nombrado como el zoosporangio (Reyes, 2000).

Las esporas producidas exógenamente están formadas muchas veces en hifas especializadas, y son denominadas conidiosporas o simplemente conidias. Las conidias varían en forma, color y complejidad y pueden ser grandes o pequeños. Estas están unidas en estructuras llamadas conidióforos. Los conidióforos algunas veces, pero no siempre, difieren de las hifas vegetativas, y pueden ser característicos de un género o especie de hongo particular (Reyes, 2000).

## **2.2 Clasificación de los hongos**

La clasificación tradicional de hongos se realiza a través de varios caracteres morfológicos que destaca aspectos presentes en los distintos especímenes como tamaño, forma y estructura, a estos se han añadido nuevos aspectos clasificatorios como caracteres bioquímicos y fisiológicos para determinar una caracterización para cada especie. De estos aspectos se desprende la clasificación del reino Fungi. En la figura 1 se indican las relaciones filogenéticas de los diferentes filos presentes en el Reino Fungi (Matheny , Moncalvo , & Scott, 2007).



**Figura 1. Principales divisiones del Reino Fungi**

Fuente: “Tree of life” “Web project”.

### 2.2.1 Hongos endófitos

La palabra ‘endófito’ etimológicamente significa ‘dentro de la planta’ (endon: dentro, phyton: planta). El ‘endofitismo’ se refiere a una asociación de costo-beneficio no obstructiva, asintomática y transitoria; este término está definido por la localización no por función por lo tanto el microorganismo se establece dentro de los tejidos vivos de la planta hospedera (Sánchez et al., 2013).

Como sugieren Shulz y Boyle (2005), los hongos endófitos se definen como microorganismos que pasan la mayor parte o todo su ciclo de vida colonizando los tejidos de la planta hospedera, sin causar daño evidente (Sánchez et al., 2013). Los hongos endófitos pueden dividirse en tres grupos básicos: las micorrizas, los balansiáceos y los no-balansiáceos. Las micorrizas son hongos que establecen relaciones simbióticas con raíces de plantas, favoreciendo la toma de nutrientes, especialmente de fósforo por parte de éstas; mientras que los balansiáceos son hongos de la familia Balansiaceae (Ascomycetes), y específicamente de los géneros *Epichloë* y *Balansia* y de sus estados anamórficos *Neotyphodium* y *Ephelis*. Estos hongos se caracterizan por su desarrollo sistémico en tejidos de gramíneas y por su transmisión vertical (por semilla sexual). Los no-balansiáceos corresponden a todas aquellas especies de hongos endófitos que no pertenecen a la familia Balansiaceae. Las especies de este grupo corresponden a la gran mayoría de hongos del grupo Ascomycetes o sus formas asexuales; algunos ejemplos de estos hongos son *Acremonium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*, *Phomopsis* y *Colletotrichum* (Vanegas, Gutiérrez, & Marín, 2014).

## ***Alternaria***

Las especies del género *Alternaria* son hongos ascomicetes, cosmopolitas que se los encuentran en cultivos de cereales en donde las hojas y los granos son colonizados principalmente. Por ese motivo es el hongo más aislado de la mayoría de los granos en el momento de la cosecha. Además, en hortalizas, en particular en tomates, se ha reportado la infección por las especies de este género. La infección es favorecida por la humedad debido a la lluvia o el rocío pudiendo causar importantes pérdidas de los frutos (Carrillo, 2003) . En las hojas se observan manchas de color pardo oscuro rodeadas de un halo de tejido clorótico (Flores, Melero, & Pállas, 2010).

## ***Fusarium***

Las especies del género *Fusarium* pertenecen a la división Ascomycota, se caracterizan porque se encuentra en los vegetales antes de la cosecha y persisten en los productos almacenados, si la actividad del agua lo permite crecerán causando alteraciones y muchas veces produciendo toxinas (Carrillo, 2003).

## ***Epicoccum***

El género *Epicoccum* es un hongo mitospórico distribuido extensamente y aislado comúnmente del aire, del suelo, de una gran variedad de plantas e insectos, de la piel humana, de textiles, etc. Se considera saprofito, en algunos casos se presenta como oportunista, siendo un invasor secundario de plantas (Qualtest announces PLM, 2006).

### **2.2.2 Hongos biocontroladores**

El control biológico es el uso de microorganismos que son antagonistas biológicos o enemigos naturales contra la mayoría de las plagas y organismos fitopatógenos (Rubio & Fereres, 2005). Los microorganismos biocontroladores son hongos, bacterias y virus que son antagonistas a los agentes patógenos que causan plagas y enfermedades vegetales (Lozano, 2007). Por lo que, el control biológico clásico consiste en la potenciación o utilización de los enemigos naturales y tiene efectos más específicos que el control

químico. En el control biológico solo el microorganismo patógeno o la plaga clave se ve negativamente afectado no se genera efectos adversos en otros microorganismos beneficiosos y fauna útil; como por ejemplo, artrópodos que actúan como enemigos naturales de las plagas. En general, el control biológico puede ser más seguro para humanos, cosechas y medio ambiente, y tiene el potencial de ser más estable y durar más tiempo que otros métodos de control, siendo total mente compatible con los conceptos y objetivos del control integrado y una agricultura sostenible (Rubio & Fereres, 2005). En particular, los hongos son de gran interés para las empresas y órganos de investigación debido a su papel en el control de plagas y enfermedades de cultivos sin dañar el medio y la salud (Lozano, 2007).

### ***Bionectria***

Las especies del género *Bionectria* son ascomycetes que se caracterizan por ser antagonistas frente a hongos patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Pythium. aphanidermatum* esta cepa se ha reportado son capaces de producir enzimas endoglucanasa y quitinasa (Melo, Vilela, Valente, & Faull, 2011)

### ***Clonostachys***

Las especies del género son conocidas por las capacidades de controlador biológico por la inhibición de quitinasa (Arai, Shiomi, Yamaguchi, Masuma, & Iwai, 2000). Una de las especies con capacidad de controlador biológico es *Clonostachys rosea* con una distribución cosmopolita. Esta especie es comúnmente un hongo saprófito presente en residuos del suelo y de varios cultivos. El principal mecanismo que *C. rosea* utiliza contra patógenos como *B. cinerea* es la competencia por los nutrientes y el sustrato. La especie antagonista requiere una fuente externa de azúcares para causar la infección (Costa, Rangel, Morandi, & Bettioli, 2013).

### ***Paecilomyces***

Es un género de hongos nematófagos que atacan nematodos dañinos, por lo tanto, el hongo puede ser utilizado como un bio-nematicida para el control de estos organismos mediante la aplicación a suelo (Piedra, 2008).

### ***Paecilomyces fumosoroseus***

Este hongo es uno de los agentes de biocontrol más efectivos contra la mosca blanca, *Bremisia* sp. y puede ser cultivado, tanto en fermentación sólida, como en fermentación líquida. Al igual que otros hongos entomopatógenos, este microorganismo produce metabolitos, como péptidos cíclicos, ácido dipicolínico (DPA) y ácido oxálico (OXA), que pueden tener actividad insecticida in vivo y/o in vitro (Torres, 2006) .

### **2.2.3 Hongos Patógenos**

Los patógenos son agentes bióticos causales de enfermedades en los cultivos. Los agentes patógenos como bacterias, hongos, virus, nematodos y fitoplasmas alteran las funciones fisiológicas de las plantas, afectando su normal funcionamiento, reduciendo los rendimientos y en casos extremos provocándoles la muerte (Lastres, 2009 ). En particular, los hongos fitopatógenos pueden provocar grandes pérdidas en la producción de frutas y hortalizas. Este tipo de microorganismos se caracterizan porque son capaces de producir sustancias como las micotoxinas, resultado de su metabolismo secundario. Las micotoxinas se distribuyen con facilidad en el sustrato y pueden llegar a ser perjudiciales incluso en muy bajas concentraciones (Trigos, Ramírez, & Salinas, 2008). Los principales hongos fitopatógenos que causan daño a los cultivos pueden ser *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani* (Mosquera, 2010).

### ***Botryotinia fuckeliana***

Es una de las especies del género *Botryotinia* del grupo Ascomycete está ampliamente distribuida, y presente en todos los continentes. *Botryotinia fuckeliana* es el teleomorfo de *Botrytis cinerea*. (Palmucci, 1997). La especie se caracteriza porque puede infectar una

amplia gama de plantas en cualquier etapa de crecimiento (The European Bioinformatics Institute, 2013), y en ocasiones produce necrosis y muerte de las partes herbáceas (Flores, Melero, & Pállas, 2010).

### ***Alternaria alternata***

Este patógeno es un hongo omnipresente y es normal su detección en el ambiente. Tiene alta habilidad para competir como saprófito y es patógeno facultativo, favorecido por estrés, madurez y senescencia del hospedero. Los síntomas comienzan con la aparición de unas pequeñas puntaciones castañas rodeadas de un halo clorótico generalmente se observa en hojas inferiores. En el fruto de tomate los conidios del hongo germinan y penetran por heridas y la infección se mantiene latente hasta que el mismo madura y los tejidos se debilitan. La enfermedad se manifiesta generalmente después de la cosecha, con síntomas que corresponden a manchas negras o castañas (SENASA, 2010)

### ***Fusarium oxysporum***

Hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Garcés, Orozco, Bautista, & Valencia, 2001)

Los metabolitos secundarios producidas por los aislados fúngicos pueden desempeñar papeles prominentes en los efectos tóxicos observados en larvas de insectos plagas (Jimenez, Huerta, & Mateo, 1997).

### ***Fusarium equiseti***

Habitante del suelo y se puede volver patógeno infectando a semillas, raíces, tubérculos y frutas de varias plantas de cultivo. A la especie se le ha implicado previamente como un agente causal de la enfermedad en diversas especies de plantas, como el algodón, caupí, lentejas, remolacha azucarera, la papa y el pino. Este hongo también puede producir micotoxinas en la planta (Goswami , Dong, & Punja, 2008).

### ***Fusarium culmorum***

Hongo filamentoso, se distribuye en numerosas plantas y están presentes en diferentes tipos de suelo. Pueden ser importantes fitopatógenos del arroz, caña de azúcar, sorgo y maíz. También pueden afectar a plátanos, tomates y melones. Su esporulación es más intensa en periodos cálidos y húmedos. Durante los meses fríos o en estaciones secas, las especies de *Fusarium* sobreviven en los restos de plantas y el suelo (Sempere, García, & Santamarina, 2003).

Otras especies como *Fusarium cerealis*, *F. graminearum* se caracterizan por la patogenicidad en las plantas especialmente en el trigo (Gagkaeva, 2010).

### **2.3 Interacciones entre hongos y plantas**

La atmósfera es el espacio que implica la relación entre microorganismos y plantas. Una gran cantidad de especímenes usan los vientos para cambiar de localización geográfica, es así que partículas biológicas están siempre presentes en el ambiente (Rosas, Cravioto, & Ezcurra, 2004). La rizósfera se conoce como la zona en la cual se dan las interacciones comensales y mutualistas entre microbios y plantas. Las relaciones entre hongos y plantas surgen al ser los hongos quienes proporcionan a las plantas nutrientes y minerales, para recibir por parte de las plantas la producción de la fotosíntesis. El tallo, las hojas y los frutos de las plantas son los hábitats adecuados para las poblaciones microbianas denominadas epífitas. El número de microorganismos que vive ahí depende de la estación del año y de la edad de la hoja (Atlas & Bartha, 2008). La presencia de hongos endófitos crea una relación hongo – planta que puede ir desde el mutualismo hasta la patogénesis. En estas relaciones ambos organismos producen metabolitos secundarios potencialmente tóxicos. El hongo endófito produce factores de virulencia, como exoenzimas y metabolitos fitotóxicos, mientras que la planta produce defensas tanto mecánicas como bioquímicas (Schulz & Boyle, 2005). En consecuencia, para que ambos organismos coexistan se establece entre ellos una relación de antagonismo balanceado que depende de la virulencia del hongo y de las defensas de la planta, las cuales varían y son influenciadas por los factores ambientales y por la etapa de desarrollo de ambos organismos. Cuando los factores de virulencia del hongo y las defensas de la planta están en equilibrio se establece

una relación endofítica y, por el contrario, cuando se presenta la senescencia del hospedero o se encuentra bajo estrés, el balance se torna a favor del hongo y éste se expresa como patógeno, presentándose los síntomas de enfermedad (Kusari, Hertweck, & Spiteller, 2012) En general, los hongos tienen una gran importancia en la naturaleza porque cumplen con funciones valiosas que aseguran la salud de los ambientes naturales. Una de las funciones importantes es la descomposición de la materia orgánica para que las plantas puedan incorporarlas y así se reutilicen los nutrientes del suelo. Además, las relaciones simbióticas que establecen los hongos con plantas vasculares contribuyen al mantenimiento y vigor de las comunidades vegetales (Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente de México, 2005).

### **2.3.1 Enfermedades en plantas causadas por hongos microscópicos**

Las plantas presentarán enfermedad cuando una o varias de sus funciones son alteradas por los organismos patógenos o por determinadas condiciones del medio. Las causas principales de enfermedad en las plantas son la presencia de organismos patógenos y los factores del ambiente físico. Los procesos específicos que caracterizan las enfermedades, varían considerablemente según el agente causal y a veces según la planta misma. En un principio, la reacción de la planta ante el agente que ocasiona su enfermedad se concentra en la zona enferma, y es de naturaleza química e invisible. Sin embargo, poco tiempo después la reacción se difunde y se producen cambios histológicos que se hacen notables y constituyen los síntomas de la enfermedad (Rodríguez, 2001).

Los patógenos causan enfermedades en las plantas mediante varios mecanismos. El debilitamiento del hospedante a causa de la absorción continua del alimento de sus células por parte del patógeno. El patógeno genera alteración o inhibición del metabolismo de las células hospedantes debido a la secreción de toxinas, enzimas o sustancias reguladoras del crecimiento. Por otro lado, el microorganismo patógeno causa el bloqueo de la translocación de los nutrientes minerales, alimentos y agua a través de los tejidos conductores, y el consumo del contenido de las células del hospedante con las que entran en contacto (Rodríguez, 2001) .

Los síntomas que pueden presentar la planta por la presencia de un hongo patógeno son de tipo local o general y pueden aparecer por separado en hospederos distintos, en un mismo hospedero o aparecer uno después de otro en un mismo hospedero. Los síntomas de las plantas se caracterizan por la presencia de una necrosis local o general o la muerte de los tejidos vegetales que infectan, hipertrofia o hipoplasia o atrofia de plantas completas o de sus órganos, e hiperplasia o crecimiento excesivo de ellas o de algunos de sus órganos (Agrios, 2005).

Para Agrios (2005) los síntomas necróticos más comunes son los siguientes:

**Manchas foliares** son lesiones localizadas sobre las hojas de los hospederos. Las lesiones se caracterizan porque constan de células muertas y colapsadas.

**Tizón** es empardecimiento general y extremadamente rápido de las hojas, ramas, ramitas y órganos florales de una planta, que dan como resultado la muerte de estos órganos.

**Cánceres** son heridas localizadas. También se las conoce como lesión necrótica que se encuentra con frecuencia bajo la superficie del tallo de una planta leñosa.

**Pudriciones blandas y pudriciones secas** son maceraciones y desintegraciones de frutos, raíces, bulbos, tubérculos y hojas carnosas de las plantas.

**Antracnosis** es una lesión necrótica que se asemeja a una úlcera profunda y que se produce en el tallo, hojas, frutos o flores de la planta hospedera.

## **2.4 Cultivos comerciales del Ecuador**

La producción agrícola ecuatoriana es de importancia primaria para la economía del país por su parte en la balanza comercial generación de divisas, puestos de trabajo, seguridad y soberanía alimentaria y uso de la diversidad (Villavicencio & Vásquez , 2008).

En el 2013 el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC) presentó la Encuesta de Superficies de Producción Agropecuaria continua, el Ecuador posee 7,32 millones de

hectáreas. A nivel nacional, los principales y más rentables cultivos son: caña de azúcar, el banano, palma africana, arroz, maíz duro seco y papa (INEC, 2013).

### **Haba (*Vicia faba* L.)**

El haba es un componente importante de la dieta del país, tanto en seco como en fresco (Cevallos, Vásquez, & Pinzón, 1973). En el 2010, la producción de haba verde en Ecuador alcanzó las 3 907 t/ha (INEC, 2011). Se encuentra en la Región Interandina, su temperatura de crecimiento óptimo oscila entre de 7°C a 14°C se desarrolla en varios tipos de suelos en especial los franco arcillosos con buen drenaje y un pH que va de 5,5 a 7,5. Entre las enfermedades más comunes que afecta a los cultivos de haba están la mancha chocolate causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, y la roya producida por *Phragmidium subcorticium* (INIAP, 2008).

### **Maíz (*Zea mays* L.)**

Es uno de los productos de consumo más cotizados y necesarios tanto para el hombre como alimento para criar animales (Aguilar, 2011). La superficie de siembra durante el año 2011 fue de 269 913 ha a nivel nacional, con un rendimiento de 3,16 t/ha (MAGAP, 2012). El maíz se encuentra principalmente en la Región Interandina, su temperatura de crecimiento óptimo oscila entre 10°C a 20°C, se desarrolla en varios tipos de suelo francos, franco arcilloso, franco arenoso y arcillo arenoso con buen drenaje y un pH que va de 5,5 a 7,5. Entre las enfermedades foliares del maíz están, la mancha foliar producida por *Curvularia lunata*, el tizón foliar generada por *Bipolaris/Helminthosporium maydis* y la roya causada por *Puccinia polysora* (INIAP, 2008).

### **Papa (*Solanum tuberosum* L)**

La papa constituye el cuarto alimento de mayor consumo en el mundo Su cultivo se encuentra presente en más de cien países (Borba, 2008). En el año 2011, se reportó una superficie cosechada de 43 605 ha a nivel nacional, con un rendimiento de 7,78 t/ha

(MAGAP, 2012). El cultivo de papa se encuentra principalmente en la Región Interandina, su temperatura de crecimiento óptimo oscila entre 18°C a 20°C se desarrolla en varios tipos de franco, franco arcilloso y negro-andino a un pH que va de 5,2 a 6,4 (INIAP, 2008). Entre las enfermedades más comunes que atacan a esta planta se puede mencionar a la lancha o tizón tardío provocada por el hongo patógeno *Phytophthora infestans*. Además se ha reportado el oidio generada por *Oidium* spp., esta enfermedad se presenta cuando el clima es seco, siendo más agresivo cuando el cultivo está madurando. Otra enfermedad muy común es la rizoctoniasis causada por *Rhizoctonia solani* conocida también con los nombres de costra negra; por la presencia de esclerocios en la superficie de los tubérculos afectados (INIAP, 2008).

### **Tomate Riñón (*Lycopersicon esculentum* M)**

En la actualidad es la hortaliza más cultivada en el mundo, por su contenido nutricional y su demanda en la dieta diaria (Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar, 2003). A nivel nacional, la superficie de cosecha del tomate riñón fue de 2 308 ha con un rendimiento de 5,45 t/ha en el 2012 (MAGAP, 2012). El cultivo de tomate de riñón se lo encuentra en la Región Interandina, su temperatura de crecimiento oscila entre 16°C a 18°C bajo cubierta y a medio ambiente a 18°C. El cultivo se desarrolla en varios tipos de suelos como liviano franco o franco arcilloso limoso y un pH que va de 5,5 a 6. Entre las enfermedades más comunes que atacan a este cultivo; están la pudrición gris causada por *Botrytis* spp., el oidio provocada por *Oidium* spp, la pudrición del cuello generada por *Phytophthora cactorum* y la antracnosis producida por *Colletotrichum gloeosporioides* (INIAP, 2008).

## **2.5 Identificación de hongos microscópicos.**

### **2.5.1 Técnicas morfológicas para la identificación de hongos.**

La identificación de los hongos se logra mediante el estudio microscópico de la morfología de su micelio, de sus estructuras fructíferas y de sus esporas. Para la identificación de las estructuras morfológicas es necesario observar la formación de estructuras reproductivas,

como esporas o conidios con alta nitidez y contraste para ello se utiliza diversos compuestos químicos que permiten evidenciar los detalles de las células fúngicas (Gonzales Gutiérrez & Diamont., 2011). Para una correcta identificación de los hongos es importante el uso de claves taxonómicas para determinar el género y la especie (Agrios, 2005). Sin embargo, la determinación tradicional basada en la observación de estructuras morfológicas y en propiedades fisiológicas no es suficiente para obtener una identificación fiable en algunos hongos (Aguin, Sabarias, Abelleira, Pintos, & Mansilla., 2001).

## **2.5.2 Técnicas moleculares para la identificación de hongos**

### **2.5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Debido a la rapidez y patogenicidad que producen los hongos en los cultivos se debe identificarlos en el menor tiempo posible y de una forma acertada. El desarrollo de técnicas moleculares, sobre todo con el descubrimiento de Kary Banks Mullis en 1986 de la PCR, ha permitido establecer la identidad de cada organismo y sus relaciones filogenéticas, lo que ha revolucionado la sistemática de hongos (Aguín et al., 2001). La PCR consiste en la repetición de un ciclo que tiene tres etapas. La primera etapa es la desnaturalización en donde las cadenas de ADN se abren; por lo general, a una temperatura entre 90°C a 95°C. La segunda etapa consiste en la hibridización en donde los “*primers*” o cebadores se van a unir a su complementario; en este caso la temperatura de esta etapa dependerá de la temperatura “*melting*” de los “*primers*” que va de 50°C-70°C. La tercera etapa se la conoce como extensión en donde la ADN polimerasa comienza a colocar los dNTPs desde el extremo 3'-OH de los “*primers*” de esta forma se sintetiza la cadena complementaria a una temperatura de 72°C (Gonzales, 2010)

Para la amplificación se utiliza pequeñas cantidades del ADN del hongo que puede ser de cultivos o del micelios (Delgado, Peña, León, & Barreto, 2006).

Las aplicaciones de la técnica PCR son muy amplias. En la actualidad, la PCR se utiliza en la detección e identificación de microorganismos como virus, bacterias y hongos (Aguín et al., 2001). En particular, esta técnica molecular es utilizada principalmente para la detección de patógenos en semillas, el cultivo de tejidos, detección de toxinas y residuos de

pesticidas (Delgado, Peña, León, & Barreto, 2006) Además, la PCR es uno de los métodos moleculares de mayor eficiencia en especial para el diagnóstico de enfermedades vegetales. El éxito de esta técnica consiste en su sencillez teórica y en la rapidez en su ejecución, ya que permite la identificación de un patógeno en un día, lo que permite una enorme ganancia en tiempo que beneficia principalmente en el control de las enfermedades (Aguin et al., 2001).

#### **2.5.2.2 Secuenciación**

El secuenciamiento de ADN consiste en la degradación específica de los polinucleótidos. Para el secuenciamiento se utiliza el producto de PCR y se realiza una PCR en donde se da la secuenciación de pequeños fragmentos. El ADN secuenciado es comparado con las secuencias de las bases de datos que contienen secuencias y esto se lo realiza mediante un análisis con un software específico (Necochea & Canul, 2004) como el BLAST.

#### **2.5.2.3 Marcadores moleculares para la identificación de hongos**

Dentro del ADN ribosómico existen determinadas secuencias que sirven para clarificar los límites y la identidad de las especies en hongos (Schoch, Seifert, Hundorf, Robert, & Spounge, 2012). En la actualidad, las secuencias de los espaciadores internos transcritos ribosomales ITS es una región hipervariable del ADNr es amplificada mediante PCR y secuenciada para identificar microorganismos que pueden o no cultivarse en el laboratorio (Cordero, López, , Calderón, Figueroa, & Martínez, 2012).

En la actualidad, las secuencias de los espaciadores internos transcritos ribosomales (ITS por sus siglas en inglés) y los genes 18S, 5.8S, y 28S son las regiones del ADNr más utilizados para la identificación de hongos microscópicos (Schoch et., al 2012) y (Saltos, 2012).

#### **2.5.2.4 Espaciador transcrito interno ribosomal**

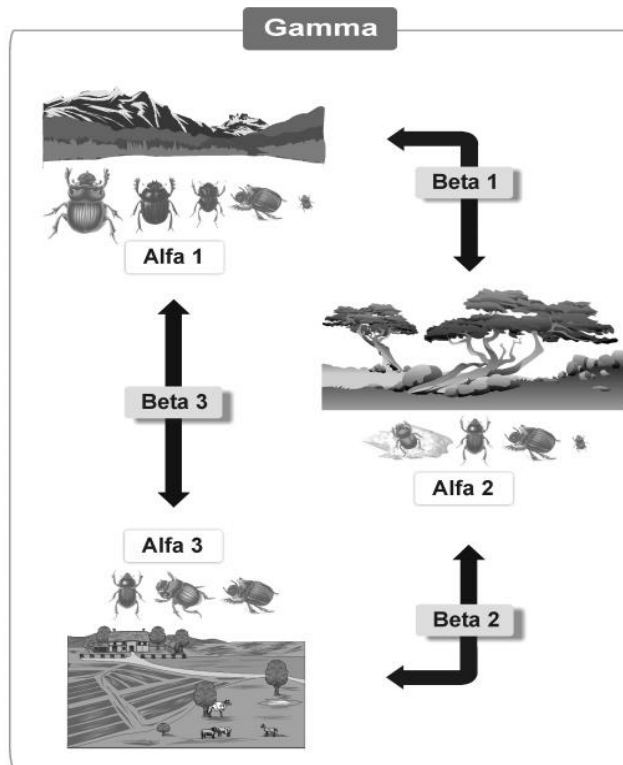
Los espaciadores transcritos internos ribosomales son importantes en el procesamiento del ARNr que forman estructuras específicas secundarias necesarias para el correcto reconocimiento de sitios de corte y unión de proteínas para la formación de proteínas

nucleares y ARNs durante la maduración del ribosoma (Korabecna, 2007). Por ese motivo, estas regiones han sido útiles para la sistemática molecular a nivel de especie e incluso dentro de cada especie. Adicionalmente, los espaciadores internos transcritos ribosomales son regiones candidatas a convertirse en códigos de barras genéticos por su variabilidad y porque son más susceptibles de acumular mutaciones (Schoch et al., 2012).

Los ITSs se caracterizan porqué contiene dos regiones no codificantes variables conocidas como ITS1 e ITS2 que se encuentran dentro de las repeticiones altamente conservadas del ADNr (Saltos, 2012) y separadas por el 5.8S ARNr (Schoch et al., 2012) . El ITS1 está localizado entre la subunidad pequeña, el gen 5.8S ARNr y el gen 18S ARNr de la subunidad ribosomal grande; mientras que el ITS2 está presente entre el gen 5.8S ARNr y el gen 28S ARNr (Guevara, Garza, & Cazares, 2004)

## **2.6 Medida de la biodiversidad.**

Según la *Convention on Biological Diversity* (CBD, 2006) la diversidad biológica se define como “la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos, y los complejos ecológicos de los que forman parte; incluye la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas”.



**Figura 2. Componentes alfa, beta y gamma de la biodiversidad de escarabajos en un paisaje integrado por tres comunidades.**

Fuente: (Halffter, Moreno, & Pineda, 2001)

A nivel de diversidad biológica se ha reconocido diferentes niveles de escala espacial designadas como diversidades alfa, beta y gamma. La diversidad alfa es la riqueza de especies de una comunidad particular considerada como homogénea. La diversidad beta es el grado de cambio o reemplazo en la composición de especies entre diferentes comunidades de un paisaje. La diversidad gamma es resultante tanto de las diversidades alfa como de las diversidades beta y constituye la riqueza de especies del conjunto de comunidades que integran un paisaje o región (Halffter, Moreno, & Pineda, 2001). En la Figura 2 se presenta un esquema de los componentes de la diversidad.

Para medir la biodiversidad existen varios índices cada uno relacionado con el tipo de información que se desea analizar. Cada variable de respuesta tiene maneras diferentes de analizarse. (Humboldt, 2009).

### **2.6.1 Índices de Diversidad**

El término general “indicadores de biodiversidad” abarca algo que va más allá de las mediciones directas de la propia biodiversidad, como las poblaciones de especies y la extensión de los ecosistemas. También abarca las acciones para garantizar la conservación de la biodiversidad y el uso sostenible, como la creación de áreas protegidas, la normativa en materia de captura de especies y las presiones o amenazas a la biodiversidad como la pérdida de hábitats. Puesto que los indicadores son medidas de algo, normalmente pueden presentarse en forma numérica o cuantitativa (Prydatko, Apetova , & Ischuk., 2005).

Existen varios índices para medir la diversidad, cada uno ligado a el tipo de información que se desea analizar, es decir, que algunas de los variables respuestas tienen maneras diferentes de analizarse. Si las dos variables respuesta que se están analizando son número de especies (riqueza específica) y datos estructurales (por ejemplo abundancia), cada uno de ellos se podrá analizar diferencialmente para obtener más información complementaria (Humboldt , 2009)

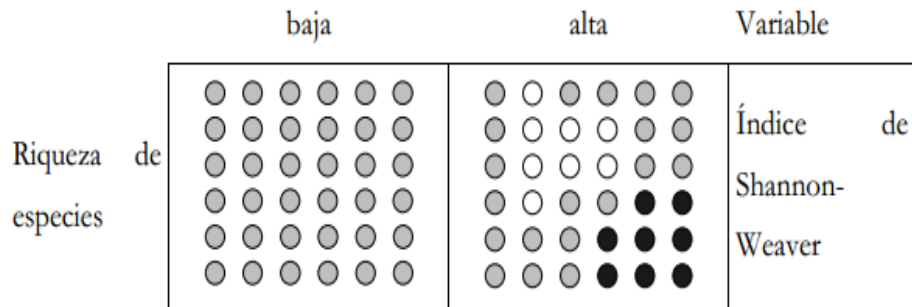
### **2.6.2 Índices de equidad**

La equitatividad (E) tiene en cuenta la abundancia de cada especie y que tan uniformemente se encuentran distribuidas (Humboldt , 2009). La abundancia relativa se obtiene dividiendo el número de individuos de cada especie entre el número total de individuos (Zelada, Mejía, & Castillo, 2010). Dentro de los índices de equidad se encuentra el Índice de Shannon-Wiaver ( $H'$ ).

El Índice de Shannon–Wiaver ( $H'$ ) es un índice que asume que todas las especies están representadas en las muestras. Este índice indica qué tan uniformes están representadas las especies en términos de abundancia teniendo en cuenta todas las especies muestreadas que constituyen la riqueza en especies. Por lo que el índice refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base del número de especies presentes y su abundancia relativa (Humboldt , 2009).

Conceptualmente es una medida del grado de incertidumbre asociada a la selección aleatoria de un individuo en la comunidad. Esto es, si una comunidad de  $S$  especies es muy homogénea, por ejemplo porque existe una especie claramente dominante y las restantes  $S-1$  especies apenas presentes, el grado de incertidumbre será más bajo que si todas las  $S$

especies fueran igualmente abundantes. O sea, al tomar al azar un individuo, en el primer caso tendremos un grado de certeza mayor (menos incertidumbre) que en el segundo; porque mientras en el primer caso la probabilidad de que pertenezca a la especie dominante será cercana a 1, mayor que para cualquier otra especie, en el segundo la probabilidad será la misma para cualquier especie (Pla, 2006). Figura 3.



**Figura 3. Índice de Shannon-Wiaver**  
Fuente: (Universidade de Santiago de Compostela)

El índice de Shannon se expresa con un número positivo, que en la mayoría de los ecosistemas naturales varía entre 1 y 5. Generalmente los valores altos se encuentran en ecosistemas como bosques tropicales o arrecifes de coral; mientras que, valores bajos se ha reportado para zonas desérticas. El único limitante del índice es que no toma en cuenta la distribución de las especies en el espacio (Orellana, 2009).

### 2.6.3 Índices de dominancia

Tienen en cuenta las especies que están mejor representadas (dominan) sin tener en cuenta las demás (Humboldt, 2009). Los índices de dominancia se basan en parámetros inversos a los conceptos de equidad puesto que toman en cuenta la dominancia de las especies con mayor representatividad, para lo cual el índice más común para utilizar es el índice de Simpson ( $\lambda$ ) (Orellana, 2009).

El Índice de Simpson ( $\lambda$ ) muestra la probabilidad de que dos individuos sacados al azar de una muestra correspondan a la misma especie. Este índice es uno de los parámetros que permite medir la riqueza de organismos (Orellana, 2009).

## 2.7 Análisis Filogenético

Filogenia proviene del griego (“φύλον”, raza y “genia”, nacimiento, producción, generación) y hace referencia a las relaciones evolutivas entre los organismos (especies, géneros, familias). El estudio de las relaciones entre las especies ha formado implícitamente parte en los estudios de taxonomía clásica desde el siglo XVI (Valcárcel, sf). El ADN entre los individuos de una misma especie se caracteriza porque es altamente conservada, lo que los hace compartir características físicas, biológicas y de comportamiento. Sin embargo, existen pequeñas diferencias entre los individuos de una misma especie en la secuencia de sus ADN, denominada variabilidad genética, que pueden o no tener efecto sobre las características visibles de los organismos. A mayor número de diferencias en la secuencia o estructura del ADN entre los individuos de una población, mayor es la diversidad genética en dicha población (Villalobos & Mendoza , 2010).

Un árbol filogenético, es una representación esquemática de entidades biológicas que están conectadas por descendencia común, pueden ser especies o grupos taxonómicos mayores. Hoy en día, la mayoría de árboles filogenéticos se crean a partir de datos moleculares ya sea ADN, ARN o proteínas. Se tiende a usar ADN cuando se analizan especies cercanamente emparentadas, porque proveen mayor información (las cadenas de ADN son más largas que las cadenas de aminoácidos); mientras que las secuencias de aminoácidos son usados para análisis filogenéticos de especies más lejanamente emparentadas (Mendoza, 2012).

Los métodos de inferencia filogenética como Métodos Bayesianos, Máxima verosimilitud, y *Neighbour joining* son el punto de partida para inferir filogenias y estudiar patrones y tasas de cambio evolutivo (Abascal, Irisarri, & Zardoy , 2014).

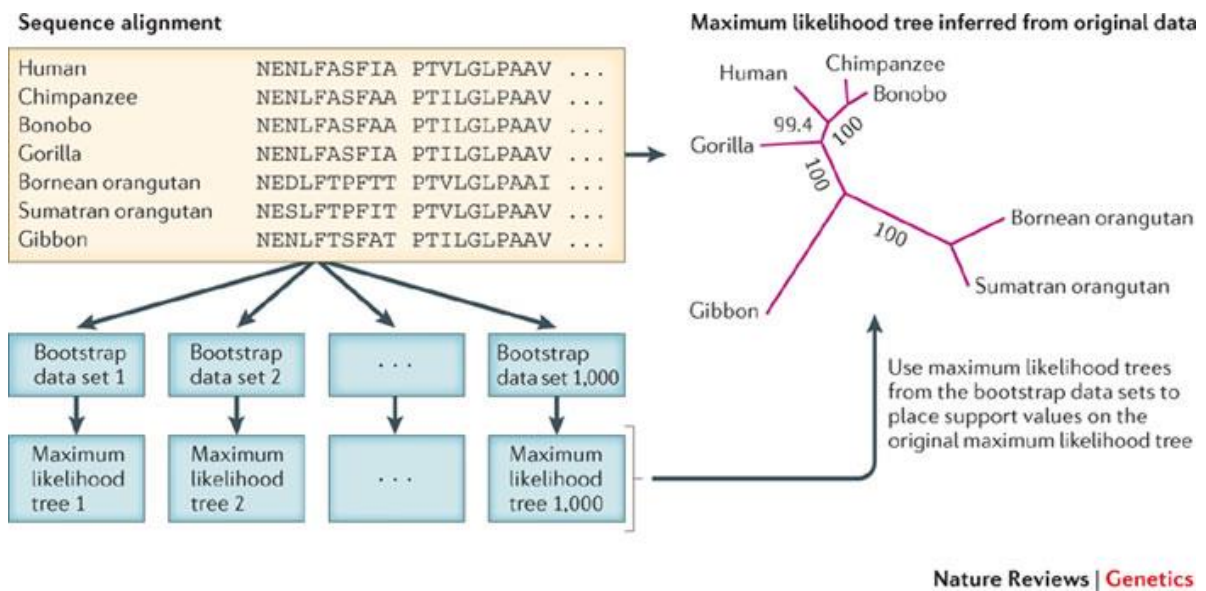
### **“*Neighbour joining*”**

El método “*Neighbour joining*” (NJ) es frecuentemente usado en estudios de “código de barras moleculares”, el objetivo fundamental es poder identificar individuos cuando se desconoce la especie a la que pertenecen. Además, existe la posibilidad de descubrir especies crípticas en grupos de morfología compleja o inaccesible. NJ es un método de inferencia filogenética que se basa en distancia genética. Este algoritmo consiste en generar un único árbol en el que se unen dos secuencia vecinas parecidas. A estas

secuencias iniciales se las considera como una sola identidad, y se busca el siguiente terminal que contenga secuencias parecidas. El procedimiento continúa hasta unir todos los terminales al árbol filogenético. Para construir las relaciones filogenéticas es necesario construir una matriz estándar de distancias entre todas las posibles combinaciones terminales. La inferencia filogenética mediante NJ solamente refleja el grado de similitud de los terminales o especies (Peña, 2011).

**“Bootstrap”**

Para los métodos de distancia, parsimonia y verosimilitud, el procedimiento más utilizado para evaluar la confianza en una estimación topología de árbol filogenético es el análisis de “Bootstrap”. El análisis consiste en que los sitios en la secuencia de alineación se vuelven a muestrear tantas veces como la longitud de la secuencia, generando una pseudo-muestra de arranque que es del mismo tamaño que el conjunto de datos original (Yang & Rannala, 2012). Un ejemplo que utiliza el método de máxima probabilidad se ilustra en la Figura 4. Los niveles de *bootstrap* de 71 a 99 % se consideran confiables (Molina, sf).



**Figura 4. “Bootstrap. Nature Reviews Genetic, 2012”**

## CAPÍTULO III

### 3. Marco Metodológico.

#### 3.1 Materiales, reactivos y equipos.

##### 3.1.1 Materiales de Laboratorio.

Placas Petri de 90 x 15 mm  
Placas Petri de 60 x 15 mm  
Pinzas estériles  
Tijeras podadoras  
Fundas ziploc®  
Embudo Buchner  
Papel cromatográfico  
Mortero  
Parafilm®  
Micro tubos de 0,2 µL (Eppendorf®)

##### 3.1.2 Reactivos y otras sustancias.

Agar Papa y Dextrosa (APD)  
Caldo de papa y dextrosa (CPD)  
Cloro al 2,5%  
Arena de cuarzo  
Kit “Wizard Genomic ADN Purification” (Promega)  
“GoTaq Master Mix” (Promega)  
“GoTaq Master Mix colorless” (Promega)  
Tinte azul de lactofenol y azul de bromocresol  
Tinte Gel Stain (Lonza)  
Gel de agarosa (Promega)  
Ladder o escalera 250-10 000 pb  
Solución buffer TBE 1X (Promega)

### **3.1.3 Equipos.**

Incubadora

Autoclaves

Cámara de flujo laminar

Mechero

Bomba al vacío

Termo bloque

Termociclador (Perkin Elmer Gen AMP, PCR System 2400)

Cámara Electroforética

Espectrofotómetro Nanodrop

## **3.2 Métodos**

El presente estudio forma parte del proyecto “Colección e inventario de hongos microscópicos que causan enfermedades en cultivos (fitopatógenos) de importancia en la Sierra Norte y Centro del Ecuador 2011-2012”, códigos I 13119 y H 13238, financiado por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, PUCE.

### **3.2.1 Recolección de muestras**

Las muestras fueron colectadas de las provincias de Pichincha en el Centro Académico Docente Experimental La Tola (CADET) de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central del Ecuador (Tumbaco), Imbabura (Valle del Chota), Carchi (El Ángel y San Gabriel) en los meses de Mayo y Junio del 2011, y Tungurahua (Quero y Querococha) en el mes de Junio del 2012.

El muestreo fue intencional ya que se escogieron cultivos que presentaban lesiones (manchas foliares necróticas) en las partes aéreas de las plantas, principalmente hojas y frutos. Las hojas afectadas fueron cortadas con una tijera podadora por el pecíolo y de los frutos se extrajo todo el órgano de la planta (Figura 5). Las tijeras podadoras utilizadas fueron previamente desinfectadas con alcohol al 70 % antes de cada toma de muestra. Las muestras fueron colocadas individualmente en fundas tipo “ziploc®” nuevas. Cada muestra fue etiquetada adecuadamente y trasladadas inmediatamente en un “cooler” con hielo hasta

los laboratorios del Centro Internacional de la Papa (CIP-Quito) para su procesamiento inmediato.



**Figura 5. Toma de muestras durante la salida a Querococha, 2012.**

### **3.2.2 Procesamiento de las muestras**

El procesamiento de las muestras fue realizado en los laboratorios del Centro Internacional de Papa (CIP) localizados en la Estación Experimental “Santa Catalina” del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), ubicada en la parroquia Cutuglagua del cantón Mejía, provincia de Pichincha (Figura 6).



**Figura 6. Centro Internacional de la Papa, CIP, 2012.**

### 3.3 Obtención de cultivos puros

#### 3.3.1 Desinfección y siembra de las muestras

Para la desinfección de las muestras se basó en el procedimiento reportado por Agrios (2005), para lo cual se realizaron cortes pequeños de los tejidos vegetales afectados de 5-10 mm<sup>2</sup> a partir del borde de la lesión con un bisturí estéril y se los colocó en cloro al 2,5 % por 2 minutos (Anexo 1). A continuación, los cortes fueron retirados asépticamente con una pinza estéril y colocados en tres vasos de precipitación para realizar tres lavados con agua estéril (Anexo 2). La pinza fue esterilizada con el mechero antes y después de su uso. Finalmente los cortes del tejido fueron colocados en un papel filtro estéril para eliminar el exceso de agua.

Los cortes del tejido vegetal esterilizado fueron colocados en cajas Petri con Agar Papa Dextrosa (APD) (Anexo 3 y Anexo 4). Las cajas Petri fueron selladas con parafilm® para evitar pérdida de humedad y contaminación de hongos ambientales y se incubaron a 23°C por 7 días (Figura 7).



**Figura 7. Transferencia de hongos microscópicos. CIP, 2012.**

### 3.3.2 Purificación del hongo

Cuando se observó presencia de micelio, se cortó el pedazo de agar con el borde de la colonia en crecimiento con un bisturí previamente esterilizado. El pedazo de agar fue colocado en cajas Petri con nuevo medio de cultivo APD e incubadas hasta obtener cultivos puros (Figura 8). Esto se realizó con el fin de evitar la proliferación de aquellos agentes contaminantes que hayan resistido la desinfección y que debido a su crecimiento más rápido pueden impedir el desarrollo adecuado de los hongos (Vesga, Otoyá, & Howard, 1991).



**Figura 8. Purificación del hongo. CIP, 2012**

### 3.4 Identificación morfológica

Para la identificación macroscópica se observaron las características de las colonias de los hongos. Se tomaron en consideración caracteres como el color, tamaño y forma de la colonia. Posteriormente, para la identificación microscópica se reconoció principalmente rasgos estructurales a través de microscopía óptica. Para lo cual se siguió la técnica de la cinta adhesiva reportado por (Prats, 2007). Brevemente, la técnica consiste en tocar levemente la colonia en desarrollo con la cinta adhesiva la misma que se la pega en el portaobjetos con una gota de azul de lactofenol (Anexo 5). Las estructuras de los hongos fueron observadas a 40X y para su identificación se utilizó el Atlas “Illustrated Genera of Imperfect Fungi” (Baenett & Hunter, 1998).

Finalmente, para tener un registro de la identificación morfológica se tomaron fotografías de las colonias, de los hongos que presentaron estructuras para la identificación y de los aislados que presentaron sólo micelio en el medio de cultivo APD

### **3.5 Identificación Molecular**

#### **3.5.1 Inducción del desarrollo micelial para obtener células vegetales y extraer su ADN.**

Para la inducción del desarrollo micelial se siguió el procedimiento reportado por Garzón, Yáñez, & Moorman (2007). Para lo cual se utilizó caldo de papa y dextrosa (CPD) autoclavado y dispensado en cajas Petri de 90 x15 mm. Posteriormente, se ubicaron trozos de agar con las colonias de los hongos crecidos en medio APD. Las cajas fueron rotuladas e incubadas en ausencia de luz durante una semana a 22°C por 7 días.

Una vez evidenciado el crecimiento del micelio y la ausencia de contaminantes se procedió a cosecharlo. La ausencia de contaminantes se determinó porque los medios no presentaban una turbidez característica de una contaminación por bacterias o levaduras.

El equipo para extraer el micelio fue armado de la siguiente manera: en un matraz Kitasato, se introdujo un embudo Büchner previamente esterilizado con alcohol al 70 % y se conectó a la manguera de una bomba de succión utilizada para crear vacío, recolectándose el líquido filtrado en el matraz mencionado (Figura 9).



**Figura 9. Cosecha de micelio. CIP, 2012.**

Una vez encendida la bomba de vacío, se coloca papel filtro estéril sobre el embudo Büchner y se dispensa el CDP con crecimiento micelial sobre este. Con la ayuda de una espátula estéril se remueve el micelio con cuidado, observando que el medio CDP se haya filtrado por completo. Finalmente, el micelio retenido en el papel filtro es recogido en un microtubo de 2 mL estéril con su respectiva rotulación, y guardado en refrigeración hasta el siguiente paso.

La liofilización del micelio fue realizado en el Departamento de Sanidad Animal del INIAP. El micelio liofilizado se molió con arena de cuarzo en un mortero estéril para guardarlo en microtubos estériles de 2 mL a temperatura ambiente (Figura 10). Los tubos fueron sellados con parafilm® para aislarlos de la humedad y otros contaminantes y también fueron mantenidos en refrigeración para el siguiente proceso.



**Figura 10. Molienda. CIP, 2012.**

### **3.5.2 Extracción y cuantificación del ADN**

Todos los análisis moleculares se llevaron a cabo en los laboratorios de la Escuela de Bioanálisis, PUCE durante el año 2013. La extracción de DNA del micelio se realizó utilizando el kit “*Wizard Genomic ADN Purification*” de acuerdo a las recomendaciones del fabricante con ciertas modificaciones (Anexo 6). Las modificaciones que se realizaron fueron en base al protocolo de extracción de ADN descrito por (Doyle & Doyle, 1987). Una vez obtenido el ADN genómico se evaluó la calidad y concentración del ADN antes de llevar a cabo la amplificación del ADN. La evaluación de la calidad y concentración fue mediante lecturas de las longitudes de onda de 260/280 utilizando el espectrofotómetro Nanodrop. Para la calidad del ADN se tomó en consideración los valores similares a 1,8 que indica una buena calidad ADN por el contrario valores inferiores indican presencia de contaminación (Calle, 2013).

### **3.5.3 Amplificación del gen ITS**

Para la identificación molecular de los hongos se amplificó una región comprendida entre ITS4, el ADN ribosomal 5.8S e ITS5 mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando los “*primers*” o cebadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

descritos por (White, Bruns, Lee, & Taylor, 1990). Para la pre-mezcla de la PCR se utilizó el reactivo GoTaq Master Mix (Promega) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las condiciones de reacción de PCR fueron las siguientes 0,5  $\mu\text{L}$  de *primer "forward"* y 0,5  $\mu\text{L}$  de *primer "reverse"* (cada primer contenía una concentración de 10  $\mu\text{M}$ ), 9,8  $\mu\text{L}$  de agua ultra purificada, 12,5  $\mu\text{L}$  Go taq mix y 1,7  $\mu\text{L}$  de ADN (concentración de 50 ng/ $\mu\text{L}$ ), Para cada reacción de PCR se colocó un control positivo y un negativo. El control negativo consistió en colocar la reacción sin ADN y el control positivo un ADN que amplificó previamente para la región comprendida entre el ITS4 e ITS5. Para las pruebas de PCR, todas las reacciones fueron realizadas utilizando "GoTaq Color Master Mix" esta solución se caracteriza porque el reactivo tiene un colorante necesario para la electroforesis. Una vez estandarizado el protocolo de PCR, en las reacciones se utilizó el reactivo "GoTaq Colorless Master Mix" este buffer es recomendado para la amplificación para las muestras que serán sometidas a secuenciamiento.

Las condiciones del termociclador fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 95°C por 3 minutos seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 57°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos seguido de una extensión final a 72°C por 5 minutos.

La visualización de los productos de la PCR se realizó en gel de agarosa (0,8%), para lo cual se pesó 8 gramos de agar y se añadió en 100 mL de agua destilada. Se diluyó el agar al calor y se adicionó 10 $\mu\text{L}$  del colorante *gel stain* para observar la corrida del ADN en el gel, se colocó en la cámara electroforética y se lo cubrió totalmente con la solución buffer TBE 1X.

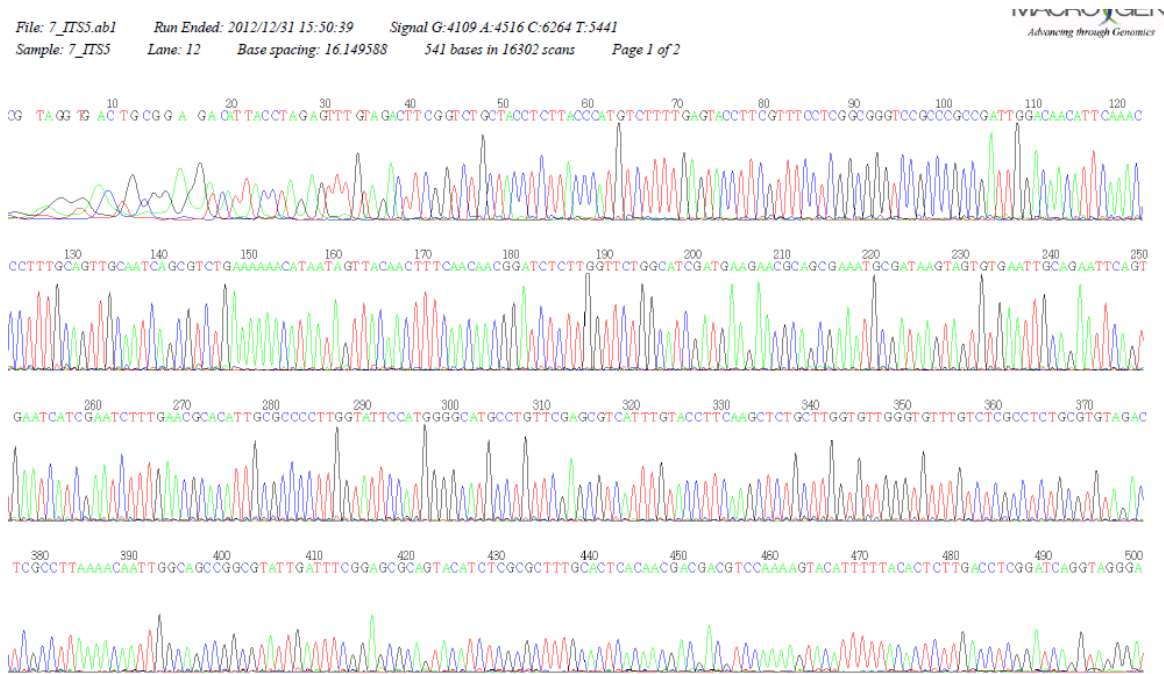
Para cargar las muestras en el gel, se mezclaron 2  $\mu\text{L}$  de producto de PCR y 1  $\mu\text{L}$  de tinte azul de bromocresol, para el caso de la master mix *Go Taq Colorless*, pero en el caso de *Go Taq Green* no hay necesidad. En cada corrida de las muestras se utilizó un 1  $\mu\text{L}$  de *ladder* o escalera (250-1000 pb) ubicado en el primer pocillo del gel. La escalera se la colocó para verificar el tamaño del producto de PCR obtenido. La corrida electroforética se efectuó a 90 voltios por una hora.

### 3.5.4 Secuenciación

Una vez que se verificó el tamaño del producto de la PCR, el mismo fue enviado a la empresa MACROGEN en Seúl - Corea para su purificación y secuenciación.

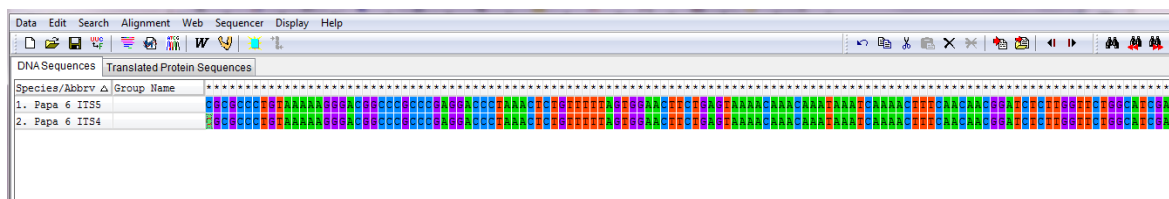
Una vez recibido los resultados, se procedió a su edición y limpieza manual es decir se chequeo las secuencias base por base y que tenga relación con su cromatograma en el programa Mega versión 6.06 (Taruma, Stecher, Peterson, Filipski, & Kumar, 2013)

En la Figura 11 se indica un ejemplo del cromatograma obtenido de una secuencia con el “*primer ITS5*”.



**Figura 11. Cromatograma del aislado Haba 7 ITS5.**  
Fuente: Macrogen, Corea del Sur

Para la edición y limpieza de las secuencias se alinearon las dos secuencias “*forward*” y “*reverse*” para obtener una secuencia consenso para lo cual se utilizó el programa Clustal W implementado en Mega versión 6.06 (Taruma, et al., 2013). El alineamiento de las secuencias fue chequeado con los cromatogramas de las secuencias de cada “*primer*”. En la figura 12 se muestra un ejemplo del alineamiento de las secuencias con los dos “*primers*” ITS4 e ITS5 para el aislado PAPA 6.



**Figura 12. Alineamiento de Secuencias para obtener una secuencia consenso**

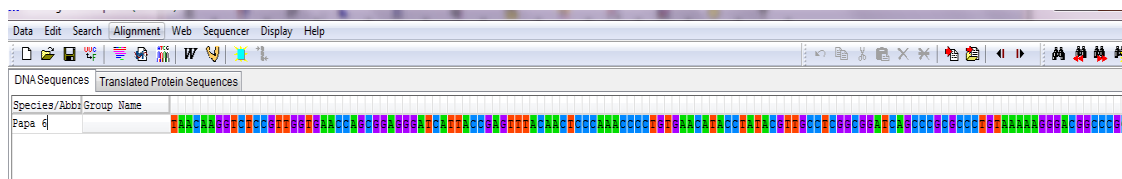
En el caso de encontrar ambigüedades es decir que dos bases diferentes se encuentran al mismo nivel se procedió a colocar bases degeneradas. Por ejemplo, si en el cromatograma tanto de la secuencia “*forward*” y “*reverse*” se observa dos curvas que representan a la Adenina y Guanina al mismo nivel se procedió a colocar la letra R. En la Tabla 1 se especifica la codificación de las bases degeneradas.

**Tabla 1. Codificación de las bases degeneradas**

Fuente: Instituto de Biotecnología. UNAM, 2009

|                   |                |                |              |
|-------------------|----------------|----------------|--------------|
| <b>M=A/C</b>      | <b>R=A/G</b>   | <b>W=A/T</b>   | <b>Y=C/T</b> |
| <b>V=A/C/G</b>    | <b>D=A/G/T</b> | <b>H=A/T/C</b> | <b>K=G/T</b> |
| <b>N= A/C/G/T</b> | <b>S=C/G</b>   | <b>B=C/G/T</b> |              |

Una vez que las secuencias se editaron, limpiaron y alinearon perfectamente de acuerdo a los correspondientes cromatogramas, se obtuvieron las secuencias consenso (Figura 13).



**Figura 13. Secuencia consenso de papa 6.**

Todas las secuencias consensos obtenidas fueron comparadas con las secuencias disponibles en el NCBI-*GenBank* mediante la utilización de la herramienta BLAST (“*Basic Local Alignment Search Tool*”, NCBI, 2013). Para la identificación de las secuencias se tomó en consideración el nombre de la especie, el porcentaje de identidad entre 99% y 100% y el número de acceso “*GenBank*” que son los datos principales que se obtienen de la búsqueda. En la figura 14 se indica un ejemplo de la presentación de los datos después de una búsqueda con BLAST.

| Description   | Max score | Total score | Query cover | E value | Ident | Accession                  |
|---|-----------|-------------|-------------|---------|-------|----------------------------|
| <a href="#">Bionectria sp. CHTAM90 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran</a>  | 845       | 845         | 100%        | 0.0     | 100%  | <a href="#">JF773676.1</a> |
| <a href="#">Bionectria sp. CHTAM89 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal tran</a>  | 845       | 845         | 100%        | 0.0     | 100%  | <a href="#">JF773675.1</a> |
| <a href="#">Uncultured soil fungus clone A24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and inte</a> | 845       | 845         | 100%        | 0.0     | 100%  | <a href="#">HM037672</a>   |

**Figura 14. Listado de organismos y la similaridad con la secuencia consenso en estudio. BLAST, 2014, NCBI.**

### 3.6 Análisis de los datos

#### 3.6.1 Análisis de diversidad

Una vez que se identificaron las especies presentes en los cuatro cultivos comerciales se calculó los índices de diversidad, riqueza de especies, uniformidad y distribución de las especies fúngicas. Para analizar la diversidad se agrupó los aislados de acuerdo a la localidad de colecta, en centro y norte. Para el análisis de la diversidad se utilizó el programa *BioDiversity Professional* versión 2 (McAleece, Gage, Paterson, & Lamshead, 1997). La diversidad alfa fue calculada mediante dos índices de diversidad el índice de Shannon – Wiener que es un índice de equidad y el índice de Simpson que es de dominancia.

#### 3.6.2 Análisis filogenéticos

Para el análisis de las relaciones filogenéticas de las especies de hongos microscópicos encontrados se utilizó el método de distancia “*Neighbor-Joining*” (NJ) utilizando el programa *Mega* versión 6.06 (Tamura et al., 2013). Para evaluar el soporte estadístico de las ramas se utilizó el método “*Bootstrap*” con 1.000 repeticiones. Como grupos externos se usó a *Glomus* sp y *Cladochytrium replicatum* con el número de acceso FM865595 y KJ464415 respectivamente.

## CAPÍTULO IV

### 4. Resultados y Discusión

#### 4.1 Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica

Un total de 46 muestras de la parte aérea de las plantas de diferentes cultivos fueron colectadas. De haba se colectaron 13, papa 11, maíz 13 y tomate riñón 9. De cada muestra se obtuvo un aislado fúngico. Al realizar la identificación morfológica se logró identificar 9 hongos que pertenecen a cuatro géneros (Tabla 2 y Anexo 7).

**Tabla 2. Resultados de la identificación morfológica de los hongos analizados**

| CÓDIGO | CULTIVOS          | MORFOLOGÍA           |
|--------|-------------------|----------------------|
| 1      | HABA 5            | <i>Epicoccum</i> sp  |
| 2      | HABA 7            | <i>Epicoccum</i> sp  |
| 3      | HABA 9            | <i>Fusarium</i> sp   |
| 4      | MAÍZ 2            | <i>Epicoccum</i> sp  |
| 5      | MAÍZ 3            | <i>Epicoccum</i> sp  |
| 6      | PAPA 2            | <i>Fusarium</i> sp   |
| 7      | PAPA 6            | <i>Fusarium</i> sp   |
| 8      | TOMATE DE RIÑÓN 2 | <i>Alternaria</i> sp |
| 9      | TOMATE DE RIÑÓN 7 | <i>Bionectria</i> sp |

Los hongos aislados se identificaron mediante el análisis de las características macro y microscópicas basadas en el concepto de morfoespecie. En el presente estudio se pudo identificar morfológicamente nueve hongos. Este resultado se debió principalmente a que no todos los hongos presentaron estructuras específicas vitales para la diferenciación de los hongos que permitan su identificación. Uno de los posibles factores que impidió la identificación morfológica es que la mayoría de los hongos en medios de cultivo no esporulan. Por esta razón es común encontrar que varios estudios reportan la ocurrencia de una alta frecuencia de hongos categorizados morfológicamente como *mycelia sterilia* (Vanegas, Gutiérrez, & Marín, 2014). Esto se debe principalmente al hecho de que no se

puede llegar a una identificación morfológica debido a que los hongos en el medio de cultivo elegido (APD) no llegan a formar estructuras de reproducción como es el caso de los hongos del presente estudio. Se sugiere también que los hongos endófitos derivan de un largo proceso de coevolución con sus hospederos vegetales, es por este motivo que puede ser muy difícil su aislamiento desde el hospedero vegetal (Ramírez, Delgado, Rodolfi, & Solvig, 2006). Una vez que han sido aislados, difícilmente se muestran fértiles “*in vitro*”. Por otro lado, Petrini (1981) citado por (Ramírez, et al., 2006) señala que el factor más importante de inducción a la esporulación es el tiempo. Los hongos endófitos aislados pueden fructificar solo dos o tres meses luego de la inoculación incluso algunos requieren más tiempo entre 12-14 meses o más. Por lo que para una identificación morfológica se debió dejar más tiempo de incubación como para poder observar las estructuras reproductivas como cuerpos fructíferos.

## **4.2 Identificación molecular**

Por medio de la observación macroscópica de los cultivos se excluyeron 8 (HABA 4, HABA 6, MAÍZ 5, MAÍZ 7, MAÍZ 10, TOMATE DE RIÑÓN 1, TOMATE DE RIÑÓN 5, TOMATE DE RIÑÓN 8) pues presentaban algún grado de contaminación ya sea por bacterias, levaduras o competencia con otros hongos como *Penicillium* y *Aspergillus* principalmente, y no fueron considerados para los análisis de identificación molecular (Tabla 3).

### **4.2.1 Concentración y pureza de ADN**

De 38 aislados de hongos microscópicos se obtuvo la concentración de ADN, la cual osciló entre 87,3 a 353,5ng/μL, mientras que la pureza fluctuó entre 0,49 a 1,94 (Tabla 3), el rango óptimo en el cual se espera obtener una alta pureza de ADN es de 1,8 a 2,0.

A pesar de que en algunas de las muestras no se obtuvo el valor esperado, se realizó de todas formas la PCR. Las muestras que presentaron valores de pureza del ADN menor a 1, no fueron consideradas.

En aquellos aislados que no se obtuvieron los valores esperados pudo deberse a varios factores, uno de ellos es la presencia de proteínas u otros agentes que se absorben fuertemente en o cerca de los 280 nm que se pudieron haber generado en el proceso de extracción de ADN (Palacios, 2008)

**Tabla 3.** Valores de las concentraciones de ADN en ng/μl, cuantificados con el Nanodrop.

| No.       | MUESTRA       | Concentración de ADN ng/μl | Pureza 260/280  |
|-----------|---------------|----------------------------|-----------------|
| 1         | HABA 1        | 283,4                      | 1,81            |
| 2         | HABA 2        | 116,5                      | 1,69            |
| 3         | HABA 3        | 87,3                       | 1,53            |
| 4         | HABA 5        | 273,6                      | 1,74            |
| 5         | HABA 7        | 353,5                      | 1,81            |
| <b>6</b>  | <b>HABA 8</b> | <b>56,5</b>                | <b>&lt;0,67</b> |
| 7         | HABA 9        | 98,5                       | 1,67            |
| 8         | HABA 10       | 51,2                       | 1,48            |
| 9         | HABA 11       | 192,1                      | 1,81            |
| 10        | HABA 12       | 201,3                      | 1,70            |
| 11        | HABA 13       | 224,4                      | 1,70            |
| 12        | MAÍZ 1        | 242,6                      | 1,79            |
| 13        | MAÍZ 2        | 425,8                      | 1,57            |
| 14        | MAÍZ 3        | 290,6                      | 1,82            |
| 15        | MAÍZ 4        | 111,2                      | 1,94            |
| 16        | MAÍZ 6        | 520,7                      | 1,59            |
| 17        | MAÍZ 8        | 304,9                      | 1,54            |
| 18        | MAÍZ 9        | 413,1                      | 1,51            |
| 19        | MAÍZ 11       | 354,6                      | 1,78            |
| 20        | MAÍZ 12       | 345,8                      | 1,62            |
| 21        | MAÍZ 13       | 531,5                      | 1,40            |
| 22        | PAPA1         | 484,4                      | 1,55            |
| 23        | PAPA2         | 277,0                      | 1,62            |
| 24        | PAPA3         | 229,2                      | 1,69            |
| 25        | PAPA4         | 293,4                      | 1,88            |
| 26        | PAPA5         | 275,1                      | 1,86            |
| 27        | PAPA 6        | 297,4                      | 1,86            |
| 28        | PAPA 7        | 319,2                      | 1,73            |
| <b>29</b> | <b>PAPA 8</b> | <b>66,3</b>                | <b>&lt;0,49</b> |

|    |                   |       |      |
|----|-------------------|-------|------|
| 30 | PAPA 9            | 221,2 | 1,82 |
| 31 | PAPA 10           | 391,5 | 1,84 |
| 32 | PAPA 11           | 233,6 | 1,71 |
| 33 | TOMATE DE RIÑÓN 2 | 179,0 | 1,84 |
| 34 | TOMATE DE RIÑÓN 3 | 169,4 | 1,88 |
| 35 | TOMATE DE RIÑÓN 4 | 109,4 | 1,76 |
| 36 | TOMATE DE RIÑÓN 6 | 107,7 | 1,78 |
| 37 | TOMATE DE RIÑÓN 7 | 274,0 | 1,73 |
| 38 | TOMATE DE RIÑÓN 9 | 263,4 | 1,73 |

### 4.3 Identificación Molecular de Hongos

34 muestras fueron amplificadas para la región ITS4-ITS5; y como resultado se obtuvo un producto de PCR de alrededor 500pb, esto se evidencia en un gel de electroforesis como se indica en el Anexo 8.

El ADN de los aislados HABA8 y PAPA8 no fueron enviados a Macrogen ya que la concentración fue muy baja. De las 36 secuencias recibidas, 2 provenientes de las muestras HABA11 y MAIZ13 no produjeron una secuencia consenso, se visualizó que los cromatogramas presentaron mucho ruido en el fondo. Una razón pudo ser posibles problemas con los cebadores, que probablemente reconocieron un sitio secundario o el cebador no se unió al molde debido a una cantidad insuficiente del cebador. La unión del cebador a un sitio secundario da lugar a picos extra. Otra posible razón es que el ADN estaba contaminado o degradado (Universidad de Córdoba, 2013).

De las 34 secuencias consenso se pudo identificar un total de 24 especies. De las cuales 6 se encuentran en el haba, 6 en el maíz, 9 en la papa y 3 en el tomate riñón. Las secuencias consenso de los diferentes hongos aislados, el porcentaje de identidad, la especie y el número de acceso al *Genbank* se detalla en la figura 15 para el haba, en la figura 16 para el maíz, en la figura 17 para la papa y en la figura 18 para el tomate riñón

### 4.3.1 Identificación molecular de hongos en haba

En el haba se encontraron especies de los géneros *Botriotinia*, *Fusarium*, *Bionectria*, *Epicoccum* y *Paecilomices*. De las 8 muestras del cultivo de haba, 2 corresponden a las especies *Botriotinia fuckeliana*, 2 fueron identificadas como *Fusarium* sp. y *F. poae*, 2 corresponden a *Epicoccum* sp; 1 como *Bionectria* sp., y 1 a *Paecilomices fumoroseus*. De las especies encontradas en el presente estudio, *Bionectria* sp. y *Paecilomices fumoroseus* pueden actuar como saprofitos.

En el presente estudio se identificó a *Botriotinia fuckeliana* patógeno que puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo del mismo y puede infectar cualquier parte de la planta (Benito, Arranz, & Eslava, 2000). Este hongo patógeno es difícil de controlar debido a que presenta una gran variedad de modos de ataque, diversos hospedantes como fuente de inóculo, y puede sobrevivir como micelio, conidios y esclerocios en residuos de cultivos (Rodríguez, Leyva, Nuñez, & Mariscal, 2007).

*Fusarium poae*, es un hongo de importancia reconocida, que se ha asociado con intoxicaciones humanas y animales ya que sus cepas producen aurofusarin, beauvericina, butenolida, culmorina, cyclonerodiol, eniatinas, fusarin, moniliformina, y los tricotecenos de tipos A y B. La amplia gama de producción de micotoxinas de este hongo requiere especial atención debido a los problemas toxicológicos que pueden provocar (Stenglein, 2009).

*Epicoccum* sp, se encuentra comúnmente en el aire como epifitos o en asociación con diversos sustratos, su presencia en las plantas podría ser indicativo de una colonización temporal eventual de los tejidos del hospedero, sin excluir un posible significado ecológico de endófitos (Ramírez, et al., 2006)



*Paecilomyces fumosoroseus* según Brown & Smith citado por (Pérez, Elósegui, & Padrón, 2003) es un hongo entomopatógeno (poseen características muy especiales que les permiten sobrevivir en forma parasítica sobre los insectos y en forma saprofita sobre material vegetal en descomposición) (Cañedo & Ames, 2004), utilizado para el control de plagas que afectan a cultivos de gran importancia económica. Entre ellas se encuentran *Bemisia tabaci* (mosca blanca), *Lyriomisa trifolli* Burgues, las termitas y *Thrips palmi* Karni, afectando grandemente los cultivos de papa, fréjol, calabaza y pepino, entre otros (Pérez, et al., 2003).

*Bionectria* sp es considerado un hongo controlador de *Rhizoctonia solani*, posee mecanismos como lo indica Junaid et al (2013) citado por (Soares, Peral, Simoni, Louise, 2014) en el cual incluyen antibiosis a través de la producción de compuestos con actividad antibiótica, micoparasitismo hiperparasitismo, competencia, producción de enzimas con actividad lítica.



### 4.3.2 Identificación molecular de hongos en maíz.

En el maíz se encontraron especies de los géneros *Chlonostachys*, *Bionectria* y *Epicoccum*. De las 10 muestras de maíz, 2 secuencias corresponden a *Epicoccum* sp, que son considerados como endófitos (oportunistas incidentales) (Schulz & Boyle, 2005), 3 de *Epicoccum nigrum*, este se considera saprofito, en algunos casos se presenta como oportunista, siendo un invasor secundario de plantas según William, (1976) citado por (Bleoju, 2007) 3 secuencias corresponden a *Bionectria* sp. y 2 como *Chlonostachys* sp estos hongos son considerados como biocontroladores como son mencionados en los cultivos anteriores (Álvarez, Osorio, & Montoya, 2013).

*Fusarium culmorum*, es considerado como un hongo de campo ya que requiere un alto contenido de humedad en el substrato para su crecimiento y la síntesis de micotoxinas (>20%), es un importante patógeno de un amplia variedad de plantas, especialmente de cereales, reduciendo la germinación de las semillas, (Hesterberg, et al., 2002; Miedaner, et al. 2004) citado por (Sempere, García, & Santamarina, 2003) produce una micotoxina llamada zearalenona al igual que *Fusarium graminearum*, que contaminan los cereales y alimentos a base de cereales, pudiendo provocar al ser humano a largo plazo una toxicidad (Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2011)

|         |                                 |            |               |   |
|---------|---------------------------------|------------|---------------|---|
| PAPA1   | <i>Alternaria alternata</i>     | JX154674.1 | 518/520(99%)  | GGGATCATTACAAAATATGAAGCGGGCTGGAACCTCTCGGGTTACAGCCTTGTGAATTATCACCTTGTCTTTTGGCTACTTCTTTTCTGGTGGTTGCGCCACCCTAGGACAAAACATAAACCTTTTGTAAATGCAATCAGCGTCAGTAAACAAATAAATACAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATGCGCCCTTTGGTATTCCAAAGGGCAGCTGTTGCGAGCGTCATTTGACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGGCGCTTGTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCCTAAAGTAATTTGGCAGCCGGCCCTACTGTTTCGGAGCGCAGCAAGTCGACTCTCTATCAGCAAAGTCTAGCATCCATTAAGCTTTTAACTTTTGAACCTCGGAAACAAGGAGGATACCCGCT  |
| PAPA 2  | <i>Fusarium sp</i>              | HQ674657.1 | 556/557(99%)  | AACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGACCCCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCAGCTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATACACCTGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATCAATAAGCGGAGGAAAA     |
| PAPA3   | <i>Fusarium oxysporum</i>       | KJ653447.1 | 542/542(100%) | TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCTCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGACCCCTAACTCTGTTTCTATGTAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCAGCTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAAAAACCTGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATCAATAAGCGGAGGAAAA          |
| PAPA 4  | <i>Fusarium equiseti</i>        | GQ505694.1 | 547/547(100%) | TCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGACCCCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCAGCTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATACACCTGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATCAATAAGCGGAGGAAAA |
| PAPA 5  | <i>Fusarium cerealis</i>        | KF576623.1 | 516/517(99%)  | TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGAAACCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCAGCTGGTGTGGGAGCTGAGTCTGCTGCACTCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGA   |
| PAPA6   | <i>Fusarium sp</i>              | KF181245.1 | 542/542(100%) | TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGACCCCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCAGCTGGTGTGGGACTCGCGTTAATTCGCGTTCCCAAATGATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATACACCTGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATCA                   |
| PAPA 7  | <i>Gibberella sp</i>            | EU532131.1 | 543/543(100%) | TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGAAACCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCAGCTGGTGTGGGAGCTGAGTCTGCTGCACTCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATca                    |
| PAPA 9  | <i>Fusarium culmorum</i>        | KC989094.1 | 547/547(100%) | tAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGAAACCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCAGCTGGTGTGGGAGCTGAGTCTGCTGCACTCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATcaataag               |
| PAPA 10 | <i>Fusarium culmorum</i>        | KC989094.1 | 541/541(100%) | AACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGAAACCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCAGCTGGTGTGGGAGCTGAGTCTGCTGCACTCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATCA                     |
| PAPA 11 | <i>Fusarium acaciae-meansii</i> | NR121204.1 | 543/543(100%) | TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACACGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCCTGTGAACATACCTATGTTGCTCGCGGATCAGCCCGCGCCCGTAAAAAGGGACGCGCCCGCCGAGGAAACCTAACTCTGTTTTAGTGGAACTTCTGAGTAAAAACAAATAAATCAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTTGAGCGTCATTTCAACCTCAAGCCAGCTGGTGTGGGAGCTGAGTCTGCTGCACTCCCAAATACATTGGCGGTCACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATTTACATATCGTTACTGTTAATCGTCGCGGCCACGCGGTAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAACATATCAatag                |

Figura 17. Identificación molecular y secuencias obtenidas de los hongos aislados del cultivo de papa

### 4.3.3 Identificación molecular de hongos en papa

En el cultivo de papa se encontraron especies de los géneros *Alternaria*, *Fusarium* y *Gibberella*. De las 10 muestras de papa, 8 corresponden a especies de *Fusarium*, que causan una enfermedad denominada “Pudrición seca o Fusariosis” en zonas cálidas y húmedas causando marchitamiento de follaje en papa (Contreras & Castro, 2011).

Dentro de las especies aisladas *Fusarium oxysporum* considerado como un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas Gimnospermas y Angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas según (Bosland, 1988) citado por (Garcés, Orozco, Bautista, & Valencia, 2001) . Generalmente su ataque está relacionado con altos niveles de humedad en el suelo por exceso de lluvias, riego o deficiencias en el drenaje de los lotes, sombrero excesivo, altas densidades de cultivo y falta de prácticas sanitaria tanto a nivel de cultivos establecidos, como en los bancos de propagación según Bhai y Hanesh (2008), citado por (Cardona, Montoya, & Díez, 2012).

Un estudio en Argentina detectó la capacidad toxigénica de varios tipos de *Fusarium* dentro del cual se encontró una micotoxina llamada tricotecene del grupo B en los cultivos de *F. equiseti* coincide con las investigaciones realizadas por Greenhalgh et al (1985) citado por (Lori, Carranza, Violante, Rizzo, & Alippi , 1992) cuando evaluó la toxicidad potencial de aislamientos de *Fusarium* spp recolectados en el sudeste asiático.

Se puede suponer como posible causa del aislamiento de este hongo, que los suelos cultivados tenían antecedentes de fusariosis (Flores, San Martín, Carillo, & Bejarano, 2005).

Se identificó al hongo *Gibberella* sp considerado como parásito no específico, con requerimientos simples y omnipresentes como saprofitos (Llano, 2002), puede ser recolectado de material vegetal muerto en descomposición, (Villanueva, y otros, 2013).

|                   |                           |            |               |   |
|-------------------|---------------------------|------------|---------------|---|
| TOMATE DE RIÑÓN 3 | <i>Clonostachys sp</i>    | EF601617.1 | 533/536(99%)  | TCGTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCACCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCTAG<br>GAAACTTAACTCTGTTTTATTTGGAACTCTCTGAGTAGTTTTACAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT<br>GAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCAATTTCAACCTCATGCCCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGGAGGGACGGCCGGCCCTAAA<br>TCTAGTGGCGGACCCGTCGTGGCTCTCTGCGAAGTAGTAATATTCGCATCGGACAGCAGAGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCCAAGGTGACCTCAGATCAGG                               |
| TOMATE DE RIÑÓN 2 | <i>Alternaria sp</i>      | JN038445.1 | 552/553(99%)  | TGGAAGTTAAAAATCGTAACAAGTCTCCGTAGGTGAACCTCGGAGGGATCATTACACAAATGAAGCGGGTGGAACTCTCGGGTTACAGCCTTGTGAATTATTCACCTTGTCTTTGCGTACTTCTGTTTCCTT<br>GGTGGGTTGCCACCCTAGGACAAACATAAACCTTTTGAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAATTACAACCTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTA<br>GTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTCGAGCGTCAATTTGACCTCAAGCTTTGCTTGGTGTGGCGCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGA<br>GACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCGGCTACTGTTTTCGGAGCGCAGCAAGTCGCACTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCCATTAAGCCTTTTTCAACTTTGACCTCGGATCAGGTAGG                      |
| TOMATE DE RIÑÓN 4 | <i>Epicoccum nigrum</i>   | GU934519.1 | 494/497(99%)  | TATAGAGTTTGAAGACTTCGGTCTGCTACCTCTTACCATGTCTTTGAGTACCTTCTGTTTCTCGGCGGGTCCGCCCGCGGATGGACAACATTCAAACCTTTGACGTTGCAATCAGCGTCTGAAAAACATTATAATACA<br>ACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAGTGTGAATTGAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAAACGCAATTGCGCCCTTGGTATTCCATGGGCGATGCCTG<br>TTCGAGCGTCAATTTGACTTCAAGCTCTGCTTGGTGTGGTGTGCTCGCTCTCGGTGACTCGCCTTAAACAATTGGCAGCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTGCACCTCAACAACGAGC<br>ACGTCCAAAAGTACATTTTACACTCTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATA   |
| TOMATE DE RIÑÓN 6 | <i>Clonostachys sp.</i>   | EF601617.1 | 516/517(99%)  | GGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCACCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCTAGGAACTTAACTCTGTTTT<br>ATTTGGAACTCTCTGAGTAGTTTTACAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGA<br>ACGCACATTGCGCCCGCAGTATTGCGCGGCGATGCCTGTCTGAGCGTCAATTTCAACCTCATGCCCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGGAGGGACGGCCCGCCCTAAATCTAGTGGCGGACCCGTC<br>GTGGCTCTCTGCGAAGTAGTAATATTCGCATCGGACAGCAGAGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCCAAGGTGACCTCAGATCA   |
| TOMATE DE RIÑÓN 7 | <i>Bionectria sp</i>      | JF773676.1 | 563/563(100%) | TAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCACCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCTAGGAA<br>ACTTAACTCTGTTTTATTTGGAACTCTCTGAGTAGTTTTACAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA<br>TCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCAATTTCAACCTCATGCCCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGGAGGGACGGCCGGCCCTAAATCT<br>AGTGGCGGACCCGTCGTGGCTCTCTGCGAAGTAGTAATATTCGCATCGGACAGCAGAGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCTAAGGTTGACCTCAGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACCTAAGCATA       |
| TOMATE DE RIÑÓN 9 | <i>Clonostachys rosea</i> | AJ876484.1 | 570/571(99%)  | gTAACAAGGTCTCCGTTGGTGAACCAGCGGAGGGATCATTACCGAGTTTACAACCTCCAAACCCATGTGAACATACCTACTGTTGCTTCGGCGGGATTGCCCGGGCACCTCGTGTGCCCGGATCAGGCGCCCGCTAGGA<br>AACTTAACTCTGTTTTATTTGGAACTCTCTGAGTAGTTTTACAATAAATAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGACGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGA<br>ATCATCGAATCTTTGAAACGCACATTGCGCCCGCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTCTGAGCGTCAATTTCAACCTCATGCCCTAGGGCGTGGTGTGGGGATCGGCCAAAGCCCGGAGGGACGGCCGGCCCTAAATC<br>TAGTGGCGGACCCGTCGTGGCTCTCTGCGAAGTAGTAATATTCGCATCGGACAGCAGAGCCCTGCCGTTAAACCCCAACTTCCAAGGTTGACCTCAGATCAGGTAGGAATaCCcCTGAACCTAAGCATATCaat |

aa

**Figura 18. Identificación molecular y secuencias obtenidas de los hongos aislados del cultivo de tomate de riñón**

Se encontró a *Alternaria alternata* agente causal de la mancha café, enfermedad de las hojas y tubérculos, muy similar al tizón temprano. En Europa, los síntomas causados por las 2 enfermedades son tan difíciles de discernir, que ambos patógenos (*Alternaria alternata* y *Alternaria solani*) son considerados como agentes causales de un "complejo" de tizón (Gevens, 2012).

#### **4.3.4 Identificación molecular de hongos en tomate riñón.**

En el cultivo de tomate riñón se encontraron especies de los géneros *Alternaria*, *Epicoccum*, *Bionectria* y *Chlonostachys*. De las 6 muestras de tomate riñón, 3 corresponden a especies del género *Chlonostachys*, 1 a *Alternaria*, 1 a *Bionectria* y 1 a *Epicoccum*. Al igual que el cultivo de haba y maíz presentaron especies de los géneros *Bionectria* y *Epicoccum* mencionados anteriormente y el género *Chlonostachys* también se encontró en el cultivo de maíz.

Tanto *Clonostachys rosea* como *Clonostachys* sp., y *Bionectria* sp., se han probado con éxito como un agente de control biológico contra hongos patógenos de plantas, como *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahlia* (Toledo, Virla, Humber, Parradell, & López, 2005).

De acuerdo a un estudio realizado en Perú, se considera a *Clonostachys rosea* un hongo con elevado potencial antagónico que coloniza las plantas vivas como endófito, digiere el material en el suelo como saprofito y también es conocido como un parásito de otros hongos y de nematodos. Los mecanismos de biocontrol atribuidos a *C. rosea*, son: micoparasitismo, competencia por los nutrientes y antibiosis, siendo el primero el principal mecanismo de acción de este hongo; este biocontrolador cubre al hongo, ataca y penetra en sus células, causándole un daño extensivo alterando y degradando la pared celular (Rodríguez & Chico, 2013).

No se obtuvo una similitud de géneros y especies en los cultivos, se presume que pueden influir factores como la especificidad de los hongos por cada cultivo ya que según estudios

realizados en Colombia hay evidencia de la existencia de la simbiosis planta hongo endófito desde hace varias decenas de millones de años según Carroll (1995) citado por (Gamboa, 2006), es probable que durante la evolución biológica esta asociación se haya originado muchas veces independientemente, tanto en los trópicos como en las zonas templadas.. Muy poco se sabe acerca de la distribución de los hongos endófitos en los tejidos de un mismo órgano. Por ejemplo, es posible hallar diferentes especies en cada uno de los tejidos de una hoja: parénquima, haces vasculares, dermis, etc. Los escasos trabajos realizados en este campo en los trópicos muestran algún tipo de evidencia respaldando que las relaciones entre microorganismo planta sean diferentes en cada uno de las zonas (Gamboa, 2006).

A esto se suma el factor temperatura, que ejerce una gran influencia en el desarrollo vegetativo del hongo (Jiménez, sf). La alta luminosidad, presencia de residuos de diurón en el suelo del almácigo y baja fertilización constituyeron los factores de estrés más importantes que incrementaron la susceptibilidad del cultivo al ataque de *Fusarium spp*. La exposición de las plantas al 75 o 100% de luminosidad y la presencia de residuos de diurón fueron factores de estrés significativos en la incidencia de *P.costarricensis* la cual fue mayor (76,38%) especialmente cuando se produjo sinergismo entre el ataque de *Fusarium spp*. y los efectos del diurón según Bustamante (2001) citado por Lobos (2001).

De todos los cultivos, la mayoría de los hongos microscópicos identificados pertenecieron a los géneros *Epicoccum* y *Fusarium*. Las especies de estos géneros se caracterizan por que se encuentran comúnmente en el aire como epífitos o en asociación con diversos sustratos. Su presencia en las plantas analizadas podría ser indicativa de una colonización temporal eventual de los tejidos del hospedero como sugiere (Ramírez, et al., 2006) sin dejar de considerarlos como posibles hongos endófitos. La relación endófitos-plantas pueden ir desde el mutualismo hasta la patogénesis, y en muchas investigaciones recientes se está dando mucho énfasis a la relación mutualista con las plantas ya que pueden producir metabolitos secundarios que inhiben a un patógeno en particular o a otros hongos endófitos como nos explica Sánchez et al. (2013). Se pueden utilizar a estos hongos como microorganismos controladores de otros fitopatógenos, ya que para proteger directamente a las plantas del ataque de los patógenos se puede incluir la acción de microorganismos antagónicos en el sitio de infección antes o después de que ocurra la infección, un claro ejemplo de esto se ha dado a conocer con la marchitez del camote, debida a *Fusarium*

*oxysporum*, que se puede controlar con éxito inoculando esquejes de este tubérculo con una cepa no patógena del mismo hongo (Agrios, 2005).

En el Ecuador existen varias especies de hongos que podrían constituir un óptimo material biológico para futuras investigaciones, sobre todo en el área de biocontrol de enfermedades.

#### 4.4 Estudio de la diversidad de hongos microscópicos encontrados en papa, tomate riñón, haba y maíz de las regiones Norte y Centro de la Sierra Ecuatoriana.

**Tabla 4. Riqueza de especies agrupadas por regiones.**

| GÉNERO Y ESPECIE                 | Número de acceso GenBank | REGIÓN NORTE | REGIÓN CENTRO |
|----------------------------------|--------------------------|--------------|---------------|
| <i>Alternaria alternata</i>      | JX154674.1               | 1            |               |
| <i>Alternaria</i> sp.            | JN038445.1               | 1            |               |
| <i>Bionectria</i> sp.            | JF773676.1               | 1            | 4             |
| <i>Botryotinia fuckeliana</i>    | JX981485.1               | 2            |               |
| <i>Clonostachys</i> sp.          | EF601617.1               |              | 4             |
| <i>Clonostachys rosea</i>        | AJ876484.1               |              | 1             |
| <i>Epicoccum</i> sp1             | KC178668.1               | 2            |               |
| <i>Epicoccum</i> sp2             | KF128843.1               | 1            |               |
| <i>Epicoccum</i> sp3             | KC178651.1               |              | 1             |
| <i>Epicoccum nigrum</i>          | EU232716.2               | 1            |               |
| <i>Epicoccum nigrum</i>          | JN689342.1               | 1            |               |
| <i>Epicoccum nigrum</i>          | HQ607859.1               |              | 1             |
| <i>Epicoccum nigrum</i>          | GU934519.1               | 1            |               |
| <i>Fusarium</i> sp1              | KF181245.1               | 1            |               |
| <i>Fusarium</i> sp2              | HQ674657.1               |              | 1             |
| <i>Fusarium</i> sp3              | JF505287.1               |              | 1             |
| <i>Fusarium cereales</i>         | KF576623.1               | 1            |               |
| <i>Fusarium equiseti</i>         | GQ505694.1               | 1            |               |
| <i>Fusarium poae</i>             | AF414968.1               |              | 1             |
| <i>Fusarium oxysporum</i>        | KJ653447.1               | 1            |               |
| <i>Fusarium acaciae-mearnsii</i> | NR_121204.1              | 1            |               |
| <i>Fusarium culmorum</i>         | KC989094.1               | 1            | 1             |
| <i>Gibberella</i> sp.            | EU552131.1               | 1            |               |
| <i>Paecilomyces fumosoroseus</i> | AF461743.1               | 1            |               |
| <b>Riqueza de especies</b>       |                          | <b>19</b>    | <b>15</b>     |

La riqueza de especies evaluada por el número de especies presentes por región, se presenta en la Tabla 4, en donde se puede apreciar que de la región Norte del Ecuador se han aislado 19 especies y de la región Centro 15, además se presentan los números de accesos del “GenBank” de las secuencias que ayudaron a identificación de las especies presentes en el estudio

La tabla 4 así mismo nos indica que los hongos *Bionectria sp.* y *Fusarium culmorum* están presentes en las dos zonas estudiadas y puede indicar dominancia de estos dos organismos asociados a plantas enfermas en dichas regiones. En la misma tabla podemos observar la abundancia de individuos de cada especie, 19 especies fueron únicas, representadas por un solo aislado, y 5 especies fueron plurales, representadas por más de un aislado.

El índice de Shannon  $J'$  nos indica que tan uniformes están representadas las especies muestreadas (Orellana, 2009). Como se puede observar en la tabla 4 la región Norte presenta 4 especies más que la región Centro y el índice calculado fue de 0.988, mientras que para la región Centro con 15 especies el índice fue de 0.896 (tabla 5), esto sugiere que la región norte es más diversa que la región centro, es decir que hay más especies distribuidas en esta región y hay más probabilidad de encontrar especies diversas que en la región centro.

A pesar de que la recolección de las muestras se realizó en la misma época (Mayo-Junio), los cultivos de la región Centro mostraban mayor signos de deshidratación en sus hojas lo que pudo ser un factor que influyó en la carga microbiana de los cultivos, esto se debe a que el clima es diferente en las regiones mencionadas siendo en la región interandina norte de tipo páramo y mesotérmico húmedo, con una temperatura que fluctúa entre los 10 a 15°C (Amaguaya, 2008) y en la región centro de tipo templado y seco, con una temperatura que fluctúa entre los 14°C y 17°C (Poaquiza, 2010).

**Tabla 5. Índice de Shannon**

| INDICES                   | REGION NORTE | REGION CENTRO |
|---------------------------|--------------|---------------|
| Shannon H' Log Base 10,   | 1,215        | 0,855         |
| Shannon Hmax Log Base 10, | 1,23         | 0,954         |
| <b>Shannon J'</b>         | <b>0,988</b> | <b>0,896</b>  |

Índice de Simpson **D** es un índice de dominancia entre especies y se puede interpretar como la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar pertenezcan a la misma especie (Marcial et al., 2012). Se observa en la tabla 6 en la región Centro (0.114) presenta el valor más alto de índice de especies dominantes, esto nos sugiere que existen especies que predominan disminuyendo la diversidad de la carga microbiana. Cabe recalcar que dentro de las especies dominantes en la región central se encontraron hongos biocontroladores, como es *Bionectria* y *Clonosthacys*, podemos destacar que estos organismos pueden ser desarrollados potencialmente como antagonistas de especies patógenas (Melo, et al.,2011).

**Tabla 6. Índice de Simpson**

| <b>INDICES</b>                | <b>REGION NORTE</b> | <b>REGION CENTRO</b> |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|
| <b>Simpsons Diversity (D)</b> | <b>0,012</b>        | <b>0,114</b>         |
| 8Simpsons Diversity (1/D)     | 85,5                | 8,75                 |

En el Ecuador no se han reportado estudios referentes a índices de diversidad sobre hongos microscópicos en cultivos de importancia económica, pero existen estudios desarrollados en los manglares del Ecuador (Panchana, 2009) y (Álvarez, 2011). Así mismo, muy poco se sabe sobre las interacciones de endófitos como antagonistas y posibles agentes controladores como lo sustentan Ramírez, et al., (2006).

Existen varios estudios en México en el que analizan índices de diversidad en los bosques con índices de Simpson de 0,70 a 0,96 en diferentes tipos de vegetaciones de los bosques lo que sugiere que no existen especies dominantes en todo el bosque existe una distribución equitativa (Chanona, Andrade, Castellanos, & Sánchez, 2007). Lo que no ocurre en este estudio ya que existe una gran diferencia entre los resultados obtenidos de la Región Centro vs Región Norte (0.114 a 0,012) reafirmando que en la región Centro hay menos especies con mayor probabilidad de ser aisladas y se las considera como especies dominantes de esa área.

En general, los géneros de hongos asociados a lesiones necróticas más abundantes en haba, maíz, papa y tomate de árbol de la región sierra norte y centro del Ecuador son *Fusarium* y *Epicoccum* con 11 y 8 individuos respectivamente, seguidos por *Bionectria* con 5 y

*Clonostachys* con 4. Dentro de estos, las especies predominantes fueron *Epicoccum nigrum* y para *Fusarium* 7 de las 11 especies son diferentes, mientras que 3 de estas especies no fueron identificadas. Los resultados obtenidos son corroborados por otros estudios realizados donde estas especies se encuentran entre los principales endófitos aislados (Urrutia et al., 2002; Cornejo, 2014).

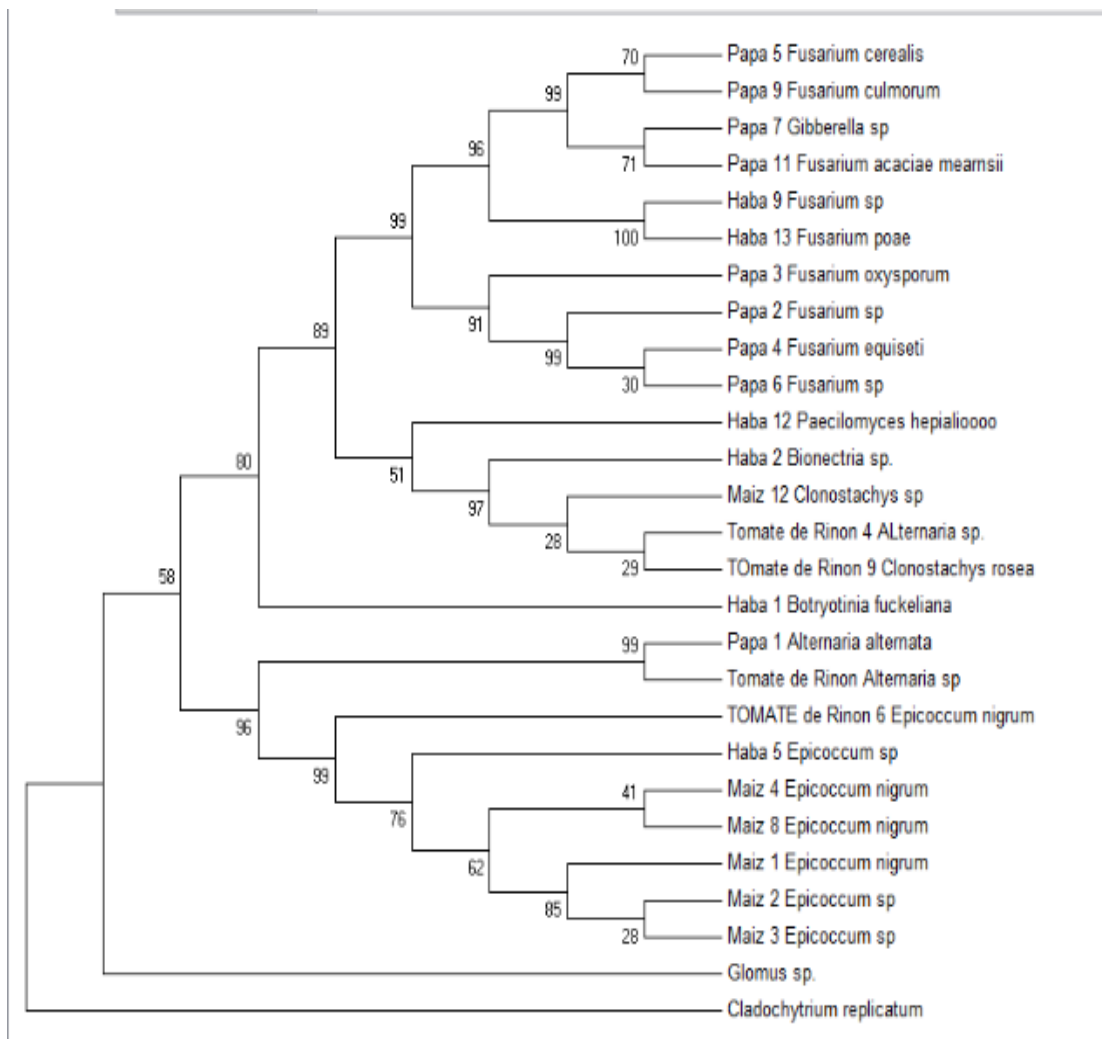
#### **4.5 Análisis de las relaciones filogenéticas de los hongos microscópicos identificados**

El árbol filogenético correspondiente a los hongos microscópicos identificados en lesiones necróticas de haba, papa, tomate riñón y maíz de la sierra norte y centro del Ecuador, se forman cinco grupos (Figura 20). Todos los organismos pertenecen al filo Ascomycota y el *outgroup* a Glomeromycota y Chitridiomycota. Las cifras que se encuentran en las ramas pertenecen al porcentaje de soporte del valor de *Bootstrap*

La primera agrupación está constituida por el género 10 géneros de *Fusarium* con un valor *bootstrap* de 99 % y la segunda representada por *Paecilomyces*, *Bionectria*, *Alternaria* y *Clonostachys*, con un valor *bootstrap* de 51% los cuales presentan una relación cercana con el género *Fusarium* perteneciente al primer grupo. La tercera agrupación la constituye el género *Botryotinia* con 80% de valor *bootstrap*. Dos géneros de *Alternaria* forman la cuarta agrupación y 7 géneros de *Epicoccum* forman la quinta agrupación, en los dos casos con un valor *bootstrap* de 99%.

Los niveles de *bootstrap* de 71 a 99 % se consideran confiables (Molina, sf), pero para el caso de la segunda agrupación es baja y se considera inestable.

Como se puede apreciar en el árbol filogenético, el primer grupo está compuesto por hongos del género *Fusarium* obtenidos de papa y haba, mientras que los hospederos de la segunda agrupación son haba, maíz y tomate riñón y los géneros obtenidos son muy variados. El tercer grupo lo forma solamente el hongo *Botryotinia fuckeliana* aislado de haba. En el cuarto grupo está el hongo del género *Alternaria*, pero los hospederos son papa y tomate riñón. La quinta agrupación donde predomina la especie *Epicoccum nigrum* tiene como hospederos al tomate riñón, haba y maíz.



**Figura 20. Árbol filogenético correspondiente a la relación de los hongos microscópicos aislados de haba, maíz, papa y tomate riñón de la Región Centro y Norte del Ecuador.**

En el primer grupo del árbol perteneciente al filo *Ascomycota* merece especial atención ya que ahí se encuentran las especies del género *Fusarium* y *Gibberella sp.*, este último hongo es el anamorfo (estadio reproductivo asexual) de *Fusarium* (Guenther & Trail, 2005; Van Hove, Waalwijk, Logrieco, Munaut, & Moretti, 2011 citados por Cornejo, 2014) y por ello su gran relación. Observamos también que 3 miembros del género *Fusarium* no tienen identificación a nivel de especie por la conocida dificultad en lograrlo con ITS (Schoch et al., 2012, citado por Cornejo, 2014), el análisis de las secuencias y los números de acceso al *Genbank* nos permitió separarlos en tres haplotipos diferentes. Además, en el árbol podemos observar también diferencias entre ellos, ya que, aunque forman parte del mismo grupo existe buena separación y los valores *bootstrap* son aceptables. Para la quinta agrupación tenemos un fenómeno similar.

## CONCLUSIONES

De un total de 46 muestras obtenidas en campo, nueve hongos se identificaron morfológicamente y pertenecen a los géneros *Epicoccum*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Bionectria*. El resto no presentaron estructuras reproductivas necesarias para su identificación microscópica.

Los protocolos de extracción de ADN y de amplificación (PCR) utilizados en esta investigación fueron estandarizados correctamente, por lo que más del 90% de los aislados fueron identificados.

Molecularmente se identificaron 34 hongos cuyas especies corresponden a los géneros *Alternaria*, *Bionectria*, *Botryotinia*, *Clonosthachys*, *Epicoccum*, *Fusarium* y *Paecilomyces*, donde se destaca la especie *E. nigrum* que fue la más abundante. Los hongos microscópicos identificados son considerados como endófitos, biocontroladores y fitopatógenos.

Los índices de diversidad calculados indican que en la región centro existen especies dominantes sobre todo especies biocontroladores. Lo contrario ocurre con la Región Norte ya que existe una mayor diversidad de especies que en su mayoría son hongos endófitos y patógenos.

## RECOMENDACIONES

El aislamiento de microorganismos a partir de una muestra es un punto primordial. Es importante realizar una desinfección correcta de lo contrario pueden crecer microorganismos epífitos de la plantas. Esto puede causar confusiones al momento de identificar al microorganismo proveniente de la lesión. Por lo que se recomienda una correcta desinfección de las muestras antes de procesarlas microbiológicamente.

La invasión de microorganismos secundarios como ácaros o bacterias a los aislados fue constante, y se puede perder por completo el aislado y la colección. Por lo que se recomienda, el uso de medios con antibióticos específicos para la eliminación de bacterias o levaduras, y en el caso de ácaros, acaricidas que pueden ser agregados al medio de cultivo. Además, se recomienda buscar nuevas alternativas de conservación del cepario para evitar contaminaciones futuras.

Utilizar otras combinaciones de primers y elegir una región codificante más extensa para conseguir identificar a nivel de especie aquellos aislados sin caracterización.

Tomar muestras en otros cultivos y durante otras épocas del año para obtener más aislados y mejores índices de diversidad.

## REFERENCIAS

- Abascal, F., Irisarri, I., & Zardoy, R. (2014). *Filogenia y evolucion molecular*. Obtenido de [http://ubio.bioinfo.cnio.es/people/fabascal/filo\\_metodos/filogenia.pdf](http://ubio.bioinfo.cnio.es/people/fabascal/filo_metodos/filogenia.pdf)
- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. Fifth edition. ELSEVIER Academic Press.
- Aguilar. (2011). *El maíz*. Obtenido de <http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/266/3/03%20AGP%2094%20TESIS.pdf>
- Aguin, Sabarias, Abelleira, Pintos, & Mansilla. (28 de Septiembre de 2001). *Tecnica de Diagnóstico en Fitopatología Forestal*. Obtenido de <http://www.efadip.org/comun/publicaciones/posters/2001/2001%20Granada/Poster%20PCR%20HONGOS.pdf>
- Álvarez. (2011). *Aislamiento e identificación de hongos marinos del manglar de palmar-Provincia de Santa Elena y establecimiento del banco de cepas fúngicas*. Obtenido el 17 de 02 de 2015, de <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/16518/1/TESIS%20MAESTRIA%20XAVIER-15-03-2011.pdf>
- Álvarez, C., Osorio, N., & Montoya, M. (2013). *Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en colombia*. Obtenido de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/rt/priniterFriendly/37216/40953>
- Amaguaya, P. (2008). *Provincia del Carchi*. Obtenido el 17 de 02 de 2015, de <http://repositorio.uct.edu.ec/bitstream/123456789/245/4/Cap%20I%20provincia%20del%20Carchi.pdf>
- Andrade, J., Cartuche, L., Cruz, D., & Meneses, M. (2014). *Recolección, caracterización y evaluación del potencial farmacológico de actinomicetos y basidiomicetos en la Región Sur del Ecuador*. Obtenido de [http://smartland.utpl.edu.ec/sites/default/files/recoleccion\\_caracterizacion.pdf](http://smartland.utpl.edu.ec/sites/default/files/recoleccion_caracterizacion.pdf)
- Arai, N., Shiomi, K., Yamaguchi, Y., Masuma, R., & Iwai, Y. (Octubre de 2000). *Argadin, un nuevo inhibidor de la quitinasa, producido por Clonostachys sp. FO-7314*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11045447>

- Arias, E., & Piñeros, P. 2008. Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los paramos de Guasca y Cruz Verde. Bogotá, Colombia. Obtenido de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis226.pdf>.
- Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar. (2003). *El cultivo de Tomate de riñon en invernadero*. Obtenido de <http://repository.unm.edu/bitstream/handle/1928/11199/El%20cultivo%20de%20tomate%20ri%C3%B1%C3%B3n%20en%20invernadero.pdf>
- Atlas, R., & Bartha, R. (2008). *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. Madrid: Isabel Capella.
- Baenett, H., & Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi (4th ed)*. St. Paul, Minn, United States of America: APS Press.
- Benito, E., Arranz, M., & Eslava, A. (2000). *Factores de patogenicidad de Botrytis cinerea*. Obtenido de <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>
- Bleoju. (2007). *“ESTUDIO DE ESTABILIDAD Y ALGUNAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS DE PIGMENTOS SINTETIZADOS POR Epicoccum nigrum*. Obtenido de <http://dspace.ubu.es:8080/trabajosacademicos/bitstream/10259.1/39/1/Bleoju.pdf>
- Borba, N. (08 de 2008). *La papa un alimento básico Posibles impactos frente a la introducción de papa transgénica*. Obtenido de <http://webs.chasque.net/~rapaluy1/transgenicos/Papa/Papa.pdf>
- Calle, A. &. (2013).. Estudio poblacional de Oso Andino en los páramos del Parque Nacional Podocarpus Loja- Ecuador: *UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA* Obtenido de <http://dspace.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/7941/1/TESIS%20Arias%20Daniela%20y%20Calle%20Estefania.pdf>
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongo entomopatógenos*. Lima - Perú: CIP.
- Cardona, Montoya, & Díez. (2012). *Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla*. Obtenido de <http://revistamexicanademicologia.org/wp-content/uploads/2012/05/Vol.-35-p%C3%A1ginas-23-34.pdf>
- Carranza, Z. (2006). *Selección e identificación de especies de hongos ectomicorizógenos del estado de Hidalgo mas competentes en medio de cultivo sólido*. Obtenido de [http://www.uaeh.edu.mx/nuestro\\_alumnado/icap/licenciatura/documentos/Seleccion%20e%20identificacion%20de%20especies.pdf](http://www.uaeh.edu.mx/nuestro_alumnado/icap/licenciatura/documentos/Seleccion%20e%20identificacion%20de%20especies.pdf)

- Carrillo . (2003). *Microbiología Agrícola*. Obtenido de <http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Departamentos/Samp/Microbiologia/Estructuras%20de%20los%20hongos.pdf>
- Carrillo. (2003). *Los hongos de los alimentos y forrajes*. Obtenido de <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/07htextoalternaria.pdf>
- CBD. (2006). *Convenio Sobre la Diversidad Biológica*. Obtenido de [http://www.biolveg.uma.es/links/cbd\\_europa\\_es.pdf](http://www.biolveg.uma.es/links/cbd_europa_es.pdf)
- Cevallos, E., Vásquez, J., & Pinzón, J. (1973). *Guía para el cultivo del haba*. Quito: INIAP.
- Chanona, Andrade, Castellanos, & Sánchez. (2007). Macromicetos del Parque Educativo Laguna Bélgica, municipio de Ocozocoautla de Espinosa, Chiapas, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, vol.78 no.2 .
- Contreras, A., & Castro, I. (2011). Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa. En Ingrid Castro Urrutia y Andrés Contreras Méndez, *Manejo de plagas y enfermedades en el cultivo de la papa* (págs. 22-23). Chile: Imprenta Austral.
- Cordero, J., López, R., Calderón, C., Figueroa, A., & Martínez, J. (Septiembre de 2012). *Microorganismos asociados a la rizosfera de jitomate en un agroecosistema del valle de Guasave, Sinaloa, México*. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532012000300011&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-34532012000300011&script=sci_arttext)
- Cornejo, F., (2014). *Diversidad de hongos endófitos relacionados con lesiones necróticas en fréjol común (Phaseolus vulgaris L.) en la provincia de Loja, Ecuador*, 2013. Disertación final de carrera. PUCE, Quito.
- Costa, L., Rangel, D., Morandi, M., & Bettioli, W. (2013). *Effects of UV-B radiation on the antagonistic ability of Clonostachys rosea to Botrytis cinerea on strawberry leaves*. Obtenido de [http://ac.els-cdn.com/S1049964412002800/1-s2.0-S1049964412002800-main.pdf?\\_tid=5db067a2-51a6-11e4-84e4-00000aab0f01&acdnat=1413073750\\_6420348ef7d23a52d4799ea4c7ccfa6c](http://ac.els-cdn.com/S1049964412002800/1-s2.0-S1049964412002800-main.pdf?_tid=5db067a2-51a6-11e4-84e4-00000aab0f01&acdnat=1413073750_6420348ef7d23a52d4799ea4c7ccfa6c)
- Coto, G. (2007). Los hongos como agentes causales de enfermedades en las plantas. En G. R. Coto, *Conceptos Introductorios a la FITOPATOLOGIA* (págs. 27-30). San Jose-Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- Cueva, D. (2008). Recuperado el 15 de 06 de 2013, de <http://repositorio.utpl.edu.ec/bitstream/123456789/3372/1/579X55.pdf>

- Daniell, H., Streatfield, S., & Wycoff, K. (2001). Medical molecular farming: production of antibodies biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.*, 6, 219-226.
- Delgado, Y., Peña, E., León, R., & Barreto, R. (2006). *Técnicas para el diagnóstico y determinación de variabilidad genética de fitopatógenos*. Obtenido de <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/libros/index/assoc/HASH01d2/441186ed.dir/doc.pdf>
- Doyle, J., & Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem bull*, 11 - 15.
- Flores, A., Egúsqüiza, R., Alcarraz, M., Woolcott, J., & Benavides, E. (2011). *biodiversidad de bacillus thuringiensis aislados de agroecosistemas peruanos y evaluación del potencial bioinsecticida*. Obtenido de [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v14\\_n1/pdf/a06v14n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/ciencia/v14_n1/pdf/a06v14n1.pdf)
- Flores, C., San Martín, S., Carillo, L., & Bejarano, N. (2005). *Especies de Fusarium de la Quebrada de Lozano, Jujuy, Argentina*. Obtenido de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412005000200013](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412005000200013)
- Flores, R., Melero, J., & Pállas, V. (2010). *Patógenos de Plantas descritos en España*. Obtenido de [http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos\\_final\\_tcm7-1286.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/publicaciones/patogenos_final_tcm7-1286.pdf)
- Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria. (2011). Zearalenona. *EFSA Journal*, 9(6):2197. Obtenido de EFSA Journal 2011;9(6):2197: [http://www.elika.net/datos/pdfs\\_agrupados/Documento111/22.Zearalenona.pdf](http://www.elika.net/datos/pdfs_agrupados/Documento111/22.Zearalenona.pdf)
- Gagkaeva, T. (2010). *Microbiología*. Obtenido de <http://connection.ebscohost.com/c/articles/52965217/phytopathogenic-fungus-fusarium-cerealis-russia>
- Gamboa, M. (2006). *Hongos Endóftos Tropicales*. Bogotá, Colombia.
- Gamboa, M., Heredia, G., Reyes, M., & De la Rosa, S. (sf). *Biodiversidad y Desarrollo Humano de Yucatan*. Recuperado el 15 de 06 de 2013, de <http://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Sitios/Biodiversidad/pdfs/Cap4/04%20Bacterias%20y%20hongos.pdf>
- Garcés, E., Orozco, M., Bautista, G., & Valencia, H. (2001). *Acta Biológica Colombiana*. Obtenido de <http://www.virtual.unal.edu.co/revistas/actabiol/PDF%27s/V6N1/Art1V6N1.pdf>

- Garzón, C.D., Yáñez, J. M., Moorman, G.W. 2007. *Pythium cryptoirregulare, a new species within the P. irregulare complex*. Mycologia, 99 (2):291-301.
- Gevens, A. (22 de Agosto de 2012). *Actualización de Cultivos de Hortaliza*. Obtenido de <http://www.plantpath.wisc.edu/wivegdis/pdf/2012/Newsletter%2022%20Espanol.pdf>
- Gonzales, Gutiérrez & Diamont. (2011). *Técnica de tinción de estructuras fúngicas con colorantes vegetales como una alternativa no contaminante*. Obtenido de <http://www.scielo.org.ve/pdf/ba/v23n1/art09.pdf>
- Gonzales, Á. (2010). En *Bioquímica Clínica y Patología Molecular*. (págs. 38,39,40). España: Gráficas Muriel S.A.
- Goswami, R., Dong, Y., & Punja, Z. (2008). *Telluriques Anfitrión gama de micotoxinas y la producción por Fusarium equiseti aislamientos procedentes de los campos de ginseng*. Obtenido de <http://www.ndsu.edu/pubweb/goswami-lab/Publications/Host%20range%20paper.pdf>
- Guevara, G., Garza, F., & Cazares, E. (2004). *Estudio del ITS nuclear en algunas especies del género Cantharellus*. Obtenido de [http://eprints.uanl.mx/612/1/art\\_hongos.pdf](http://eprints.uanl.mx/612/1/art_hongos.pdf)
- Halffter, G., Moreno, C., & Pineda, E. (2001). *Manual para evaluación de la diversidad en reservas de la biosfera*. Obtenido de <http://www.sea-entomologia.org/PDF/M&TSEA02.pdf>
- Hawksworth, D. (2004). *Fungal diversity and its implications for genetic resource collections*. Obtenido de <http://www.fungalbiodiversitycentre.org/publications/1050/002-Fungal%20diversity%20and%20its%20implications%20for%20genetic%20resource%20collections.pdf>
- Huerta, G. (sf). *Hongos microscópicos en la agricultura*. Recuperado el 2012, de ECOfronteras: <http://revistas.ecosur.mx/filesco/38.pdf>
- Humboldt . (2009). *Instituto de investigación de recursos biológicos*. Obtenido de <http://www.bio-nica.info/biblioteca/HumboldtAnálisisDatos.pdf>
- Iberoamericana, R. (2003). *Red Iberoamericana*. Recuperado el 15 de 06 de 2013, de <http://www1.inecol.edu.mx/redemic/red.htm#Presentación>
- INEC. (2011). *Visualizador de Estadísticas Agropecuarias del Ecuador ESPAC*. Obtenido el 2011, de <http://200.110.88.44/lcds-samples/testdrive-remoteobject/main.html#app=dbb7&a24-selectedIndex=0>

- INEC. (2013). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua ESPAC 2013*.  
Obtenido de [http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas\\_agropecuarias/espac/espac%202013/PRESENTACIONESPAC2013.pdf](http://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_agropecuarias/espac/espac%202013/PRESENTACIONESPAC2013.pdf)
- INIAP. (2008). *Guía técnica de cultivos*. QUITO: INIAP.
- Jiménez. (sf). *Uso de la meteorología en el combate de enfermedades fitopatógenas*.  
Recuperado el 17 de 02 de 2015, de <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A5851E/A5851E.PDF>
- Jimenez, M., Huerta, T., & Mateo, R. (1997). *ASM SOCIETY*. Obtenido de [http://translate.googleusercontent.com/translate\\_c?depth=1&hl=es&prev=/search%3Fq%3DFusarium%2Bcamptoceras%26rlz%3D1C1KMZB\\_enEC598EC598%26espv%3D2%26bizw%3D1280%26bih%3D880&rurl=translate.google.com.ec&sl=en&u=http://aem.asm.org/content/63/2/364&usg=ALkJrh](http://translate.googleusercontent.com/translate_c?depth=1&hl=es&prev=/search%3Fq%3DFusarium%2Bcamptoceras%26rlz%3D1C1KMZB_enEC598EC598%26espv%3D2%26bizw%3D1280%26bih%3D880&rurl=translate.google.com.ec&sl=en&u=http://aem.asm.org/content/63/2/364&usg=ALkJrh)
- Korabecna. (2007). Department of Biology, Faculty of Medicine in Pilsen. Karlovarska, Czech Republic. Obtenido de The Variability in the Fungal Ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and
- Kusari, S., Hertweck, C., & Spiteller, M. (2012). *Chemical ecology of endophytic fungi: origins of secondary metabolites*. Recuperado el 15 de Abril de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22840767>
- Lastres. (2009 ). *Sanidad Vegetal*. Obtenido de Universidad Zamorano: <http://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1354/2/02.pdf>.
- Llano, L. (2002). *FUSARIOSIS Gibberella zea*. Obtenido de <http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/fusarium/fusarium.htm>
- López, C. (2007). *Fitopatología molecular*. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia.
- Lori, G., Carranza, M., Violante, A., Rizzo, I., & Alippi, H. (1992). *Fusarium spp en trigo, capacidad toxicogenica y quimiotaxonomia de las cepas aisladas en la Argentina*. Obtenido de <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00885490/document>
- Lozano, V. (2007). *Universidad de Alicante*. Obtenido de Control biológico de plagas y enfermedades vegetales: <http://sgitt-otri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-0811-control-biologico-de-plagas.pdf>
- M.A.E. (2010). *Cuarto Informe Nacional para el Convenio sobre la Diversidad Biológica*. Quito: Ministerio del Ambiente del Ecuador.
- MAGAP. (2012). Recuperado el 2011, de <http://servicios.agricultura.gob.ec/sinagap/index.php/papa-2>

- Marcial, M., Magalhães, K., Silva, C., Dias, D., Duarte, W., & Schwan, R. (2012). *Culturable bacteria from soils of the Brazilian Cerrado in Minas Gerais state*. Prime Journal of Microbiology Research (PJMR), 2 (6), 153-164.
- Matheny, B., Moncalvo, J., & Scott, A. (09 de Mayo de 2007). Obtenido de Agaricales: <http://tolweb.org/>
- McAleece, N., Gage, J., Paterson, G., & Lambhead, P. (1997). *BioDiversity Professional statistics analysis software*. Obtenido de <http://www.sams.ac.uk/peter-lamont/biodiversity-pro>
- Melo, I., Vilela, E., Valente, A., & Faull, J. (2011). *Laboratory of environmental Microbiology, Embrapa Environment*. Obtenido de <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/918315/1/2011RA067.pdf>
- Mendoza, J. (2012). *Aportes de la filogenética a la investigación*. Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v23n2/v23n2ce1.pdf>
- Ministerio del Ambiente del Ecuador. (s.f.). *Reservas de la biosfera del Ecuador: Lugares excepcionales*. Obtenido de [http://sumaco.org/biblioteca/RB\\_LibroRBdelEcuador.pdf](http://sumaco.org/biblioteca/RB_LibroRBdelEcuador.pdf)
- Molina. (sf). *Filogenia*. Obtenido el 17 de 02 de 2015, de <http://infectomica.cinvestav.mx/Portals/0/SiteDocs/Productividad/DR%20JOSE%20LUIS%20ROSALLES/ARTICULOS%202007/Zinnia%20Ind%20Acuic%20Nov%2010%202007.pdf>
- Mosquera, A. (2010). *Evaluación del efecto biocontrolador de orquídeas sobre Rhizoctonia solani Kühn patógeno del suelo en arroz (Oryza sativa L)*. Obtenido de <http://www.bdigital.unal.edu.co/3340/357/9106501.2010.pdf>
- Murray, W. (2006). *Introducción a la botánica*. Madrid: Pearson Educación s.a. Obtenido de <http://biblio3.url.edu.gt/Libros/2011/bot/19.pdf>.
- Necochea, R., & Canul, J. (2004). *Secuenciación de ácidos nucleicos*. Obtenido de [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion\\_acidos\\_nucleicos.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf)
- Orellana, J. (2009). *Determinación de índices de diversidad Florística Arborea en las parcelas permanentes de muestreo del valle del Sacta*. Obtenido de Facultad de Ciencias Agrícolas: <http://www.posgradosfor.umss.edu.bo/boletin/umss/05%20PASANTIAS/6%20pasantia.pdf>
- Palacios. (2008). *Comparación de diferentes métodos de extracción de ADN de transgénicos en alimentos mediante tecnología de PCR*. Obtenido de

- [http://dspace.ubu.es:8080/trabajosacademicos/bitstream/10259.1/32/1/Palacios\\_Santamaria.pdf](http://dspace.ubu.es:8080/trabajosacademicos/bitstream/10259.1/32/1/Palacios_Santamaria.pdf)
- Palmucci, R. W. (1997). *Botrytis cinerea Pers en plantas ornamentales cultivadas en Argentina*. Obtenido de [http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf\\_plagas%2FBSVP-23-02-295-299.pdf](http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/revistas/pdf_plagas%2FBSVP-23-02-295-299.pdf)
- Panchana, H. (2009). *Identificación de hongos marinos en el manglar de palmar, provincia de santa Elena – Ecuador*. Obtenido el 17 de 02 de 2015, de <http://www.repositorio.upse.edu.ec:8080/bitstream/123456789/821/1/TESIS%20PANCHANA%20%20TIRCIO%20HUMBERTO-%20%202011.pdf>
- Peña, C. (2011). *Métodos de inferencia logenética*. Obtenido de [http://www.academia.edu/1551962/Metodos\\_de\\_inferencia\\_filogenetica](http://www.academia.edu/1551962/Metodos_de_inferencia_filogenetica)
- Pérez, A., Elósegui, O., & Padrón, N. (2003). Aislamiento, caracterización morfológico y fisiológico del hongo entomopatógeno *Paecilomyces fumosoroseus* Broum y Smith. *Fitosanidad*, Volumen 7, pag 27-32.
- Piedra, R. (2008) *Manejo biológico de nematodos fitoparásitos con hongos y bacterias* Tecnología en Marcha, Vol. 21-1, Enero-Marzo 2008, P. 123-132
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: inferencia basada en el índice de shannon y la riqueza. *SCIELO*, parra 9.
- Poaquiza, M. (2010). *El contexto de la corporación de organizaciones campesinas de Pihahuin*. Obtenido el 17 de 02 de 2015, de <http://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/547/3/Capitulo%202.pdf>
- Pontificia Universidad Católica del Ecuador. (2014). *Fungario QCA (M)*. Obtenido de <http://www.puce.edu.ec/portal/content/Fungario/442;jsessionid=2E8EC51E755E85E5540D888F90D9CE34.node0?link=oln30.redirect>
- Prats, G. (2007). *Microbiología Clínica*. Buenos Aires: Madrid: Medica Panamericana.
- Prydatko, Apetova , & Ischuk. (2005). *Alianza sobre los indicadores de Biodiversidad*. Obtenido de Guía para el desarrollo y el uso de indicadores de biodiversidad nacional: <http://www.bipindicators.net/LinkClick.aspx?fileticket=DXIqYoKxNW4%3D&tabid=373>
- Qualtest announces PLM. (2006). *Fungi of the month*. Obtenido de [http://www.qualtestusa.com/files/June\\_2006\\_Cladosporium\\_sp.pdf](http://www.qualtestusa.com/files/June_2006_Cladosporium_sp.pdf)

- Ramírez, Delgado, Rodolfi, & Solvieg. (2006). *Boletín micológico*. Obtenido el 2014, de <http://es.slideshare.net/fpgordillo/actividad-antagónica-de-hongos-endófitos-de-plantas-medicinales-del-ecuador-sobre-bacterias-patógenas>
- Reyes, C. (2000). *Fitopatología General*. Obtenido de Capítulo III Hongos fitopatógenos: [http://www.bio-nica.info/biblioteca/ReyesHongos Fitopatogenos.pdf](http://www.bio-nica.info/biblioteca/ReyesHongos%20Fitopatogenos.pdf)
- Rodríguez , M., & Chico, J. (2013). *Efecto antagónico in vitro de Clonostachys rosea sobre Botrytis cinerea procedente de cultivos de Vitis vinífera*. Revista Científica de la Facultad de Ciencias Biológicas (Universidad Nacional de Trujillo, Perú).
- Rodríguez. (2001). *Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México*. Obtenido de [http://www3.inecol.edu.mx/csmbgbd/images/stories/resultados\\_articulos\\_archivos/5%20BIODIVERSIDAD%20DE%20LOS%20HONGOS%20FITOPATOGENOS.pdf](http://www3.inecol.edu.mx/csmbgbd/images/stories/resultados_articulos_archivos/5%20BIODIVERSIDAD%20DE%20LOS%20HONGOS%20FITOPATOGENOS.pdf)
- Rodríguez, J., Leyva , S., Nuñez, T., & Mariscal, L. (2007). *Etiología y control de la necrosis de flores y pudrición de frutos de pepino en morelos, México*. Obtenido de <http://www.redalyc.org/pdf/609/60927902010.pdf>
- Rosas, I., Cravioto, A., & Ezcurra, E. (. (2004). *Microbiología ambiental*. Mexico: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rossmann, A. (1994). *Strategy for an all-taxa inventory for fungal biodiversity*, *Bull. Bot. Inst., Acad. Sinica, ser. 14: 169-194*.
- Rubio, V., & Ferreres, A. (2005). *Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. Obtenido de <http://digital.csic.es/bitstream/10261/13780/1/46.%20Rubio%20and%20Ferreres,%202005.pdf>
- Saltos, N. (2012). *Extracción de ADN genómico y amplificación de la región ITS por PCR en el ascomicete marino Lulworthia grandispora*. Obtenido de <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/1681/1/Extracci%C3%B3n%20de%20ADN%20gen%C3%B3mico%20y%20amplificaci%C3%B3n%20de%20la%20regi%C3%B3n%20ITS%20por%20PCR%20en%20el%20ascomicete%20marino%20Lulwo...Saltos,%20Nancy.pdf>
- Sánchez , R., Sandoval , Y., Ulloa, Á., Armendariz, B., & García, M. (2013). *Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos como utilidad en la agricultura y medicina*. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/revespciequibio/cqb-2013/cqb132f.pdf>

- Sánchez. (2009). *Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a plantas de especial interés ecológico en ambientes mediterráneos*. Obtenido de <http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/18131360.pdf>
- Schaad, W., Opgenorth, D., & Gaush, P. (2002). *Phytopathology*. Obtenido 03-10-2014, de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO.2002.92.7.721>
- Schoch, C., Seifert, K., Hundorf, S., Robert, V., & Spoungé, J. 2012. *Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) regions as a universal DNA barcode maker of fungi*. Obtenido de [http://www.csic.es/web/guest/noticias?p\\_p\\_id=contentviewerservice\\_WAR\\_alfresco\\_packportlet&p\\_p\\_lifecycle=1&p\\_p\\_state=maximized&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-1&p\\_p\\_col\\_pos=1&p\\_p\\_col\\_count=2&\\_contentviewerservice\\_WAR\\_alfresco\\_packportlet\\_struts\\_action=%2F](http://www.csic.es/web/guest/noticias?p_p_id=contentviewerservice_WAR_alfresco_packportlet&p_p_lifecycle=1&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_contentviewerservice_WAR_alfresco_packportlet_struts_action=%2F)
- Schulz, B., & Boyle, C. (2005). *The endophytic continuum*. Obtenido el 15 de Abril de 2014, de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080390>
- Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente de México. (2005). *La biodiversidad en MICHOACÁN estudio del estado*. Michoacán: Villaseñor G., L. E.
- Sempere, F., García, F., & Santamarina, P. (2003). *Caracterización morfológica y cultural de Fusarium culmorum*. Obtenido de <http://www.etsmre.upv.es/varios/biologia/Documentos.PDF/Articulos/14b.Caracterizaci%C3%B3n.morfol%C3%B3gica.y.estructural.de.Fusarium.culmorum.pdf>
- SENASA, S. (2010). *Alternaria alternata*. Obtenido de <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/alternaria-alternata>
- Soares, Peral, Simoni, Louise. (2014). *Mycoparasitic nature of Bionectria sp. strain 6.21*. Journal of Plant Protection Research, Vol 54. No 4.
- Stenglein, S. (2009). *Fusarium poae: Pathogen that needs more attention*. *Journal of Plant Pathology*, 25 - 36.
- Taruma, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. 2013. *MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0*. Obtenido octubre de 2013 de [http://kumarlab.net/pdf\\_new/TamuraStecher13a.pdf](http://kumarlab.net/pdf_new/TamuraStecher13a.pdf)
- The European Bioinformatics Institute. (2013). *Ensembl Hongos liberar* © EBI. Obtenido el 12 de 2013, de [http://fungi.ensembl.org/Botryotinia\\_fuckeliana/Info/Index](http://fungi.ensembl.org/Botryotinia_fuckeliana/Info/Index)
- Toledo, A., Virla, E., Humber, R., Parradell, S., & López, L. (2005). *First record of Clonostachys rosea (Ascomycota: Hypocreales) as an entomopathogenic fungus of*

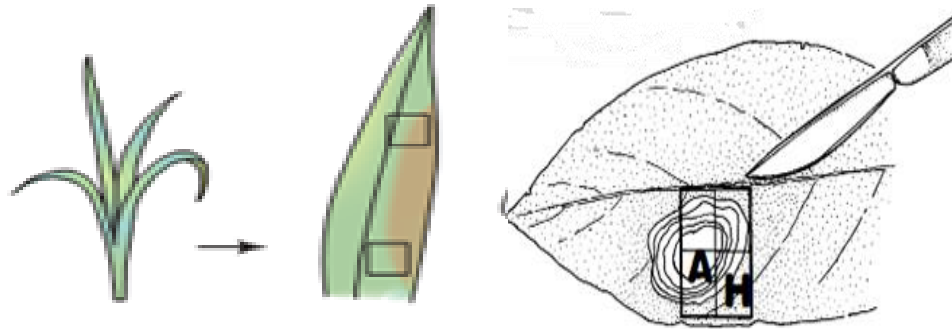
- Oncometopia tucumana and Sonesimia grossa (Hemiptera: Cicadellidae) in Argentina. Obtenido de <http://naldc.nal.usda.gov/download/6043/PDF>
- Torres, A. (2006). *Producción de metabolitos insecticidas por Paecilomyces fumosoroseus en fermentación líquida y sólida*. Obtenido de <http://148.206.53.84/tesiMiami/UAMI13486.pdf>
- Trigos, A., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista Mexicana de Micología* 28, 125/129.
- Universidad de Córdoba. (2013). *Guía de usuarios de secuenciación*. Córdoba, España.
- Universidad de Santiago de Compostela. (s.f.). Obtenido de Estructura y Diversidad .
- Urrutia, M., Angeles, H., Alippi, H., Rollán, C., & Larran, S. (2002). *Endophytic fungi in healthy soybean leaves*. Investigación agraria. Producción y protección vegetales, 17, 173-178.
- Valcárcel, V. (sf). *Filogenia molecular*. Obtenido de [http://ocw.uam.es/cursos/valcarcel/filogenia/1\\_W\\_Text\\_1.pdf](http://ocw.uam.es/cursos/valcarcel/filogenia/1_W_Text_1.pdf)
- Vanegas, K., Gutiérrez, P., & Marín, M. (mayo-agosto de 2014). *Identificación molecular de hongos aislados de tejidos de frijol con síntomas de antracnosis*. Obtenido de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=319030502002>
- Vesga, B., Otoya, M., & Howard, F. (1991). *Técnicas para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos del frijol*. Cali: CIAT.
- Villalobos, G., & Mendoza, J. (2010). Diversidad Genética. En *La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado*. (págs. 379, 380). Campeche. Mexico: Universidad Autónoma de Campeche.
- Villanueva, R., Aguilar, A., Gómez, M., Valencia, G., Piña, B., & Bautista, S. (2013). *Control de bacterias patógenas y hongos de postcosecha con extractos del pimiento de Gibberella zeae (Fusarium graminearum)*. Obtenido de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952013000700006&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952013000700006&script=sci_arttext)
- Villavicencio, & Vásquez. (2008). Guía Técnica de Cultivos. En *Guía Técnica de Cultivos* (pág. 3). Quito - Ecuador: INIAP.
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En G. D. Innis M, *PCR Protocols: A guide to methods and applications* (págs. 315 - 321). San Diego: California: Academic Press.

Yang, Z., & Rannala, B. (2012). *Molecular phylogenetics: principles and practice*.  
Obtenido de <http://www.nature.com/nrg/journal/v13/n5/full/nrg3186.html>

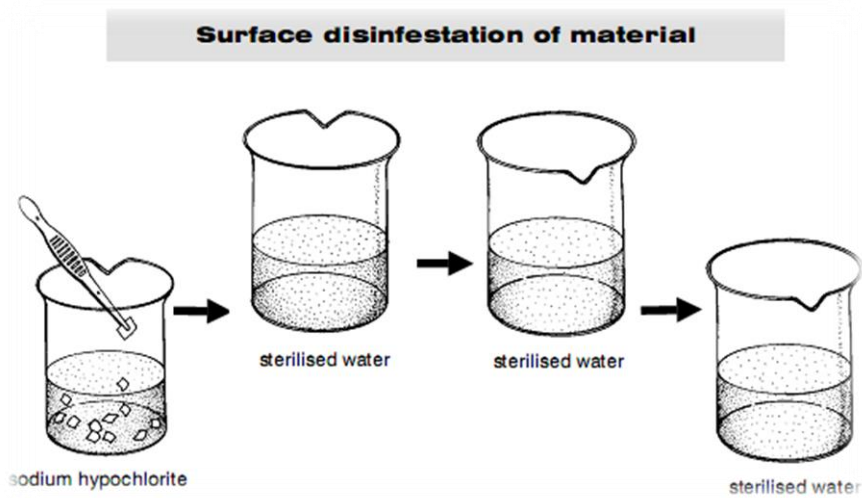
Zelada, W., Mejía, F., & Castillo, H. (2010). *Abundancia relativa y diversidad de la  
mitofauna de la quebrada Escalón Parque Nacional Huascarán, época seca*.  
Obtenido de <http://www.scielo.org.pe/pdf/as/v3n2/a12v3n2.pdf>

# ANEXOS

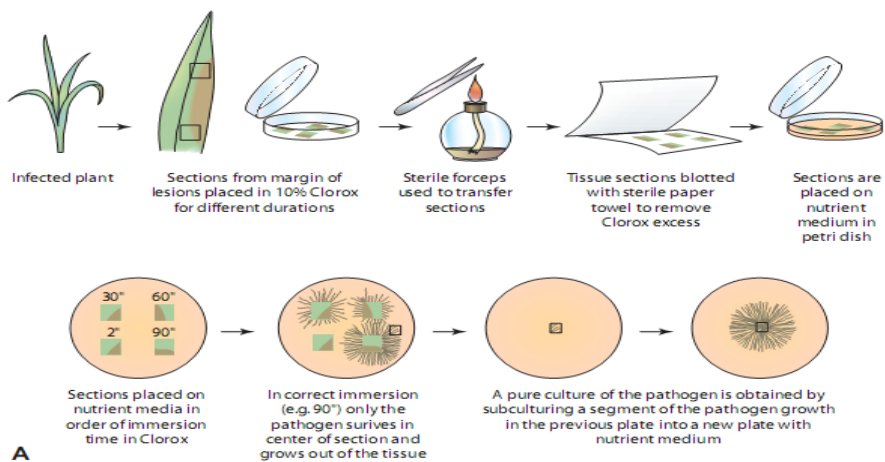
## Anexo 1. Selección de la muestra para ser cultivado, Agrios, 2005



## Anexo 2. Desinfección de muestras, Agrios, 2005



## Anexo 3. Siembra del corte del tejido, Agrios, 2005



#### **Anexo 4. Preparación de medios de cultivos**

Para el cultivo de los hongos se utilizó agar papa dextrosa (APD) y caldo papa dextrosa (CPD)

##### **AGAR PAPA DEXTROSA (APD)**

Es el más utilizado para el aislamiento, crecimiento y almacenamiento de hongos

##### **Componentes:**

|                |                                  |
|----------------|----------------------------------|
| Papas Partidas | 250 g                            |
| Dextrosa       | 10 g                             |
| Agar           | 20 g                             |
| Agua destilada | 1000 ml (para un litro de medio) |

##### **Preparación**

Se toma 65 g del agar deshidratado y se lo disuelve bien en 1 litro de agua purificada, se lo autoclave a una temperatura de 121°C por 15 minutos a una presión de 15 PSI.

Se dispensa el medio en cajas Petri de 60 x 15 mm en una cámara de flujo.

Se suplementa con 3-5 gotas ácido láctico 25 % para inhibir el crecimiento bacteriano.

##### **CALDO PAPA DEXTROSA (CPD)**

##### **Fundamento**

Se ajusta a la formulación de la USP y la Ph. Eur. Por el contenido de peptona de soja y peptona de caseína resulta una aportación nutritiva que permite el desarrollo óptimo de un gran número de microorganismos, tanto exigentes como no exigentes.

##### **Composición (g/l):**

|                                  |     |
|----------------------------------|-----|
| Digerido Papaínico de Soja ..... | 3,0 |
| D(+)-Glucosa .....               | 2,5 |

Digerido Pancreático de Caseína ..... 17,0  
di-Potasio Hidrógeno Fosfato ..... 2,5  
Sodio Cloruro ..... .. 5,0  
pH: 7,3 ±0,2

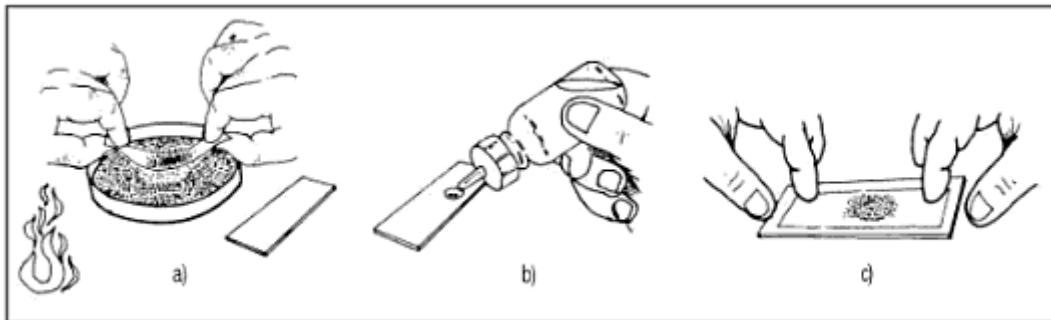
### **Preparación**

Suspender 30 g en 1 litro de agua destilada; mezclar bien y calentar ligeramente hasta disolución total. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

## Anexo 5. Preparación de las muestras para observar hongos microscópicos con Azul de lacto fenol

1. Tocamos levemente la superficie de una colonia en desarrollo con una cinta adhesiva transparente y la pegamos sobre una lámina portaobjetos que contenía la gota de azul de lactofenol.
2. Posteriormente observamos al microscopio las estructuras del hongo para lograr la identificación microscópica

### Preparación con cinta adhesiva



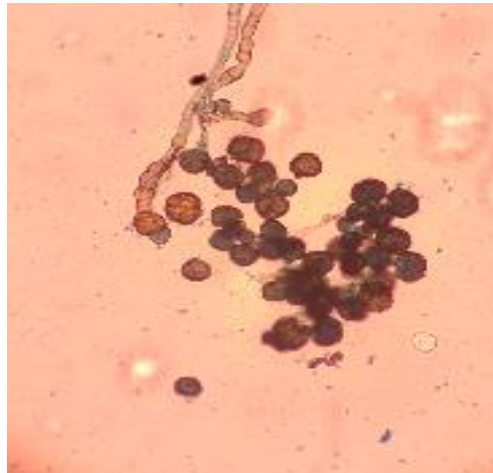
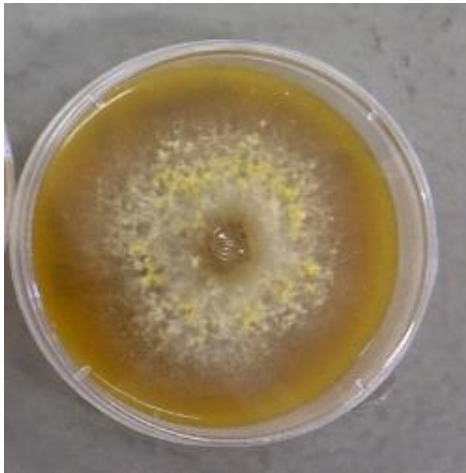
## **Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN (PROMEGA)**

Pesar 20 mg del micelio pulverizado y colocarlo en un microtubo estéril, previamente rotulado.

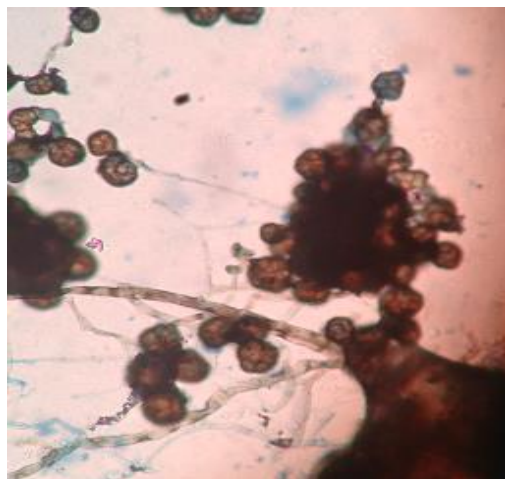
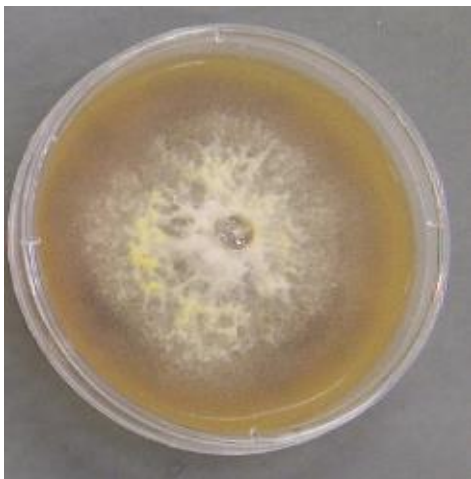
- En el pellet que contiene la muestra agregar 600 µl del reactivo de lisis celular.
- Incubar 80 °C por 10 minutos, dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Anadir 3µl del RNAsa (para el lisado de las células), mezclar invirtiendo el tubo con movimientos lentos y contantes.
- Incubar a 37°C por 15 min y dejar enfriar a temperatura ambiente.
- Colocar 200 µl del reactivo que precipita las proteínas mezclar con el vortex por 20 segundos.
- Exponerlo por 5 minutos en hielo.
- Centrifugarlo 13 000 rpm por 3 min.
- Retirar con cuidado el sobrenadante que contiene el ADN (dejando la proteína del pellet detrás) y transferir a un microtubo que contenga 600µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- Mezclar suavemente la solución por inversión hasta observar una masa visible de hebras filiformes de ADN.
- Centrifugar a 13 000 rpm por 3 min.
- Decantar cuidadosamente el sobrenadante.
- Agregar 600µl de etanol a 70 % a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 13 000 rpm por 3 min.
- Cuidadosamente decantar el sobrenadante (invertirlo sobre un papel toalla absorbente).
- Rehidratar con 100µl de solución de rehidratación.
- Incubar toda la noche a 4°C o a 65°C por 30 minutos.

**Anexo 7. Aislamiento e identificación macroscópica y microscópica de cultivos obtenidos en este estudio.**

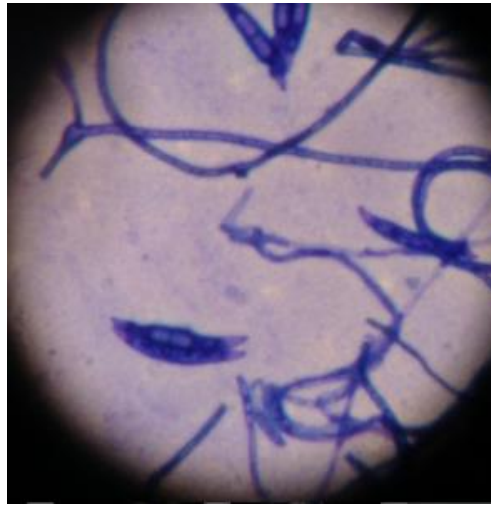
**Identificación morfológica aislado HABA 5, *Epicoccum* sp. a 40x.**



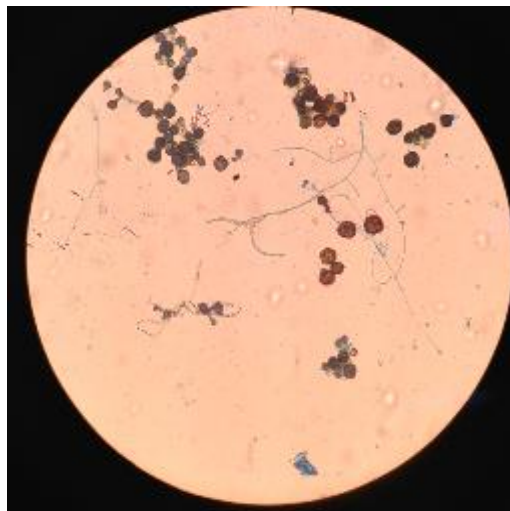
**Identificación morfológica del aislado HABA 7, *Epicoccum* sp. a 40x.**



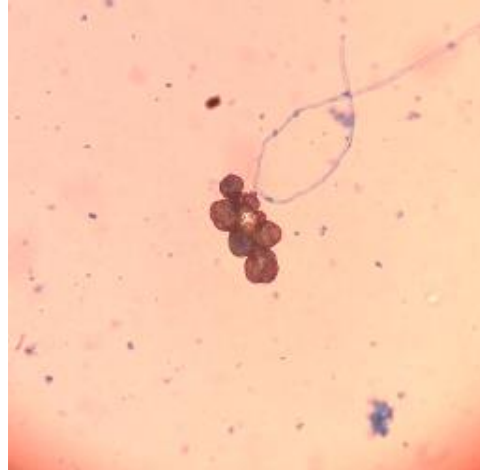
**Identificación morfológica aislado HABA 9, *Fusarium* sp. a 40x.**



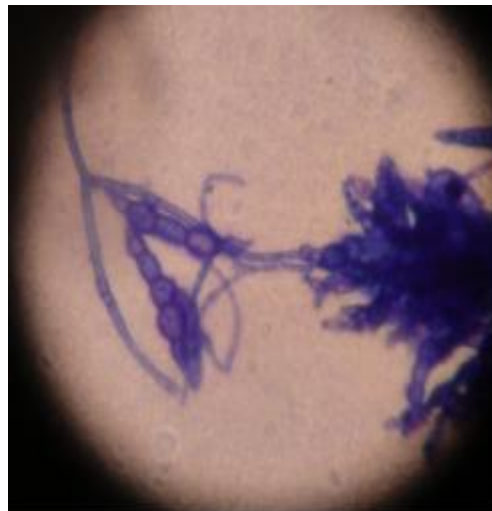
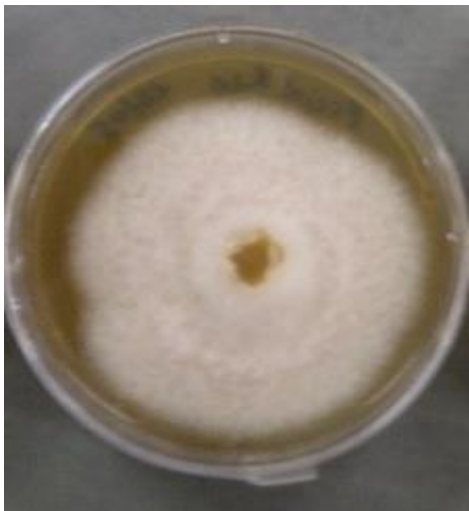
**Identificación morfológica aislado MAIZ 2, *Epicoccum* sp. 40x**



**Identificación morfológica aislado MAIZ 3, *Epicoccum* sp. a 40x.**



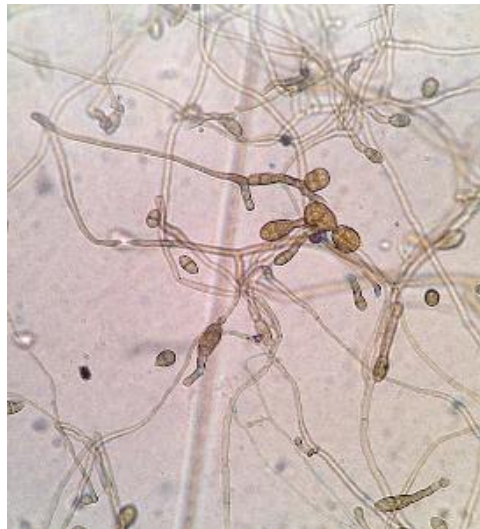
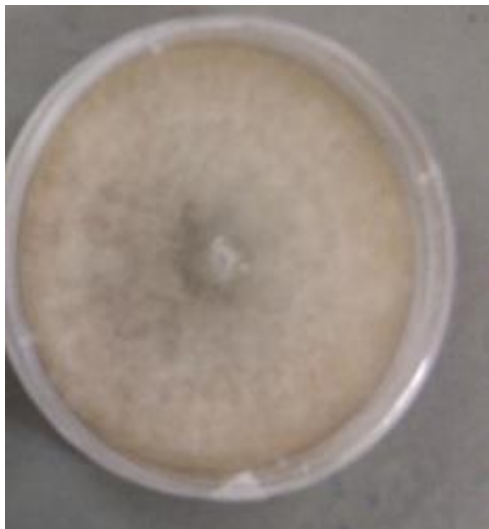
**Identificación morfológica aislado PAPA 2, *Fusarium* sp. a 40x.**



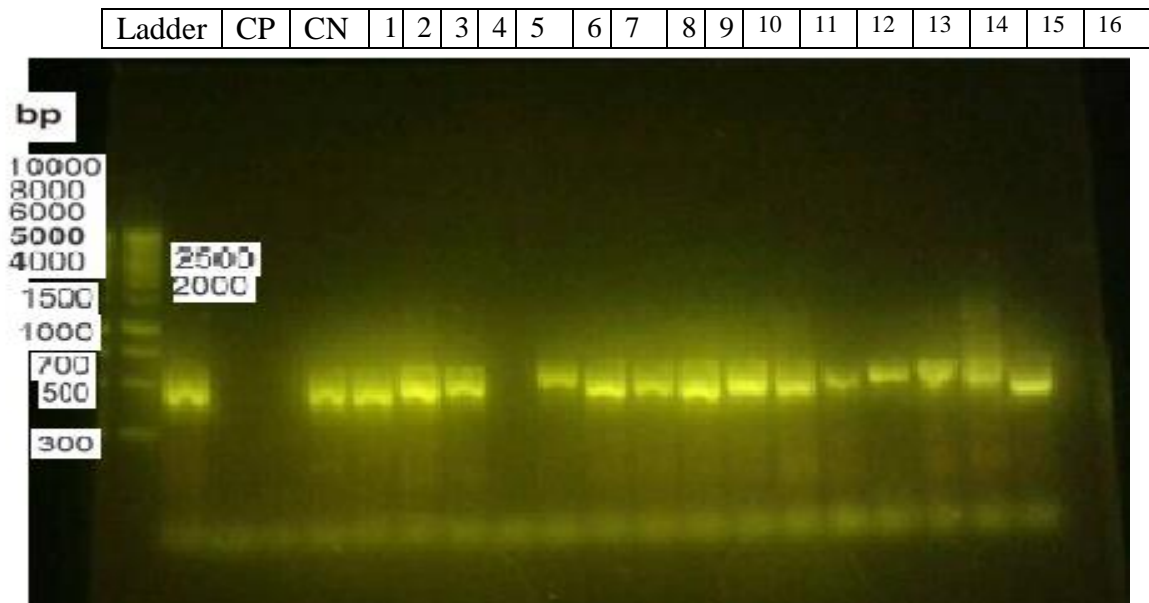
Identificación morfológica aislado PAPA 6, *Fusarium* sp. a 40x.



Identificación morfológica aislado TOMATE DE RIÑÓN 2, *Alternaria* sp. a 40x



## Anexo 8. Amplificación de la región ITS4-ITS5.



De izquierda a derecha: control positivo, control negativo, Maíz 8, Maíz 9, Maíz 11, Maíz 12, Maíz 13, Papa 1, Papa 2, Papa3, Papa 4,Papa 5, Papa6, Papa 7, Papa 9, Papa 10, Papa 11, Tomate de Riñón 3