

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Caracterización de fitopatógenos aislados de plantas ornamentales (*Gypsophila paniculata*) en Pichincha-Ecuador

Laura Valentina Huilca Mejía

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniera en Biotecnología

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Caracterización de fitopatógenos aislados de plantas ornamentales
(*Gypsophila paniculata*) en Pichincha-Ecuador**

Laura Valentina Huilca Mejía

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D.

Quito, 18 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el

repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Laura Valentina Huilca Mejía

Código: 00212903

Cédula de identidad: 0604807941

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

La especie *Gypsophila paniculata*, es importante en la industria floral de Ecuador, ya que la producción de Ecuador de este ornamental representa el 70% de la producción mundial, sin embargo, durante su producción se pierde aproximadamente el 60% del cultivo por enfermedades fúngicas de suelo. Este estudio se llevó a cabo para identificar los hongos fitopatógenos que causan pudrición y decoloramiento en tallos y raíces que afectan a esta especie. Se recolectaron muestras de plantas sanas y enfermas de la empresa florícola Florisol (Pichincha-Ecuador) y se aplicó la metodología de metagenómica de amplicón de la región del espaciador transcrito interno (ITS2) para analizar la diversidad fúngica asociada a plantas sanas vs. enfermas. En donde, se observó mayor porcentaje de abundancia relativa de los taxones *Fusarium* sp., y *Thanatephorus* sp., en plantas enfermas. Posteriormente, se aislaron 18 hongos y 2 oomicetos de tejido enfermo para luego realizar pruebas de patogenicidad. El aislado G13 generó la sintomatología descrita inicialmente, este aislado se caracterizó macroscópicamente, microscópicamente y usando herramientas de ADN. Con el gen factor de elongación (*Tef-1 α*) se construyó un árbol filogenético con el programa BEAST v.1.10.4 que utiliza el método estadístico Interferencia Bayesiana. Los resultados revelaron que el aislado G13 se agrupa dentro del clado de *Fusarium triseptatum*. Este, fue el fitopatógeno predominante causando un 100% de infección en las plantas inoculadas en ensayos en invernadero. Este hallazgo subraya la necesidad de implementar estrategias de manejo adecuadas para mitigar pérdidas en cultivos de *Gypsophila* frente a este fitopatógeno.

Palabras clave: *Gypsophila paniculata*, *Fusarium triseptatum*, metagenómica de amplicón, pruebas de patogenicidad, hongo.

ABSTRACT

Gypsophila paniculata is important in the Ecuadorian floral industry, since Ecuadorian production of this ornamental represents 70% of the world production, however, in one of the floriculture companies with the highest production (Florisol), approximately 60% of the crop is lost due to fungal diseases. This study was carried out to identify the phytopathogenic fungi that cause rot and discoloration in stems and roots that affect this plant. Samples of healthy and diseased plants were collected from the Florisol floriculture farm, and the amplicon metagenomics methodology of the internal transcribed spacer region (ITS2) was applied to analyze the fungal diversity associated with healthy vs. diseased plants. A higher percentage of relative abundance of *Fusarium* sp., and *Thanatephorus* sp., taxa was observed in diseased plants. Subsequently, 18 fungi and 2 oomycetes were isolated from diseased tissue. Pathogenicity tests were performed with all 20 isolates. The isolate G13 generated the symptoms initially described, this isolate was characterized macro and microscopically, and molecularly. A phylogenetic tree was constructed using the BEAST v.1.10.4 program using the Bayesian Interference statistical method with the elongation factor gene (*Tef-1 α*). For this purpose, sequence alignment was performed using the Clustal-W method, executing a total of 100,000 million iterations. The results revealed that the isolate G13 is grouped within the *Fusarium triseptatum* clade. This was the predominant phytopathogen, causing 100% infection in inoculated plants in greenhouse trials. In greenhouse pathogenicity tests in the floriculture farm was 16% infectivity, suggesting that there may be microbial interactions between different fungal pathogens that could aggravate symptoms. This finding underlines the need to implement appropriate management strategies to mitigate losses in *Gypsophila* crops.

Key words: *Gypsophila paniculata*, *Fusarium triseptatum*, amplicon metagenomics, pathogenicity tests, fungi.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	11
2. MÉTODOS	15
2.1 Antecedentes y Muestreo	15
2.2 Metagenómica de amplicón de la región ITS2	15
2.3 Aislamiento fúngico.....	16
2.4 Pruebas de patogenicidad	16
2.5 Identificación de los aislados usando herramientas de ADN.....	17
2.6 Construcción de arboles filogenéticos	17
3. RESULTADOS	18
3.1 Análisis de metagenómica de amplicón de la región ITS2.....	18
3.2 Aislamiento y caracterización de los aislados obtenidos.....	18
3.3 Pruebas de patogenicidad en plantas sanas de <i>Gypsophila paniculata</i>	19
3.4 Identificación molecular	20
3.5 Análisis filogenético	20
4. DISCUSIÓN	21
5. CONCLUSIONES	25
6. TABLAS	26
7. FIGURAS	28
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9. ANEXOS	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Caracterización macro y microscópica de 18 aislados fúngicos y 2 oomicetos obtenidos de plantas enfermas de <i>Gypsophila paniculata</i>	26
Tabla 2. Porcentaje de plantas infectadas en las pruebas de patogenicidad usando el aislado G13.....	27
Tabla 3. Condiciones de las amplificaciones por PCRs usadas para las regiones ITS y Tef-1 α	27

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Características de plantas sanas y enfermas de *Gypsophila paniculata* de muestras recogidas en la Floricola Florisol..... 28
- Figura 2.** Resultados del análisis de Metagenómica de amplicón de la región ITS2 de plantas sanas y enfermas.....29
- Figura 3.** Principales variantes de secuencia de amplicón (ASV, por sus siglas en inglés) asociados con hongos fitopatógenos en plantas enfermas.....30
- Figura 4.** Resultados de ensayos de patogenicidad con el aislado G13 correspondiente a *Fusarium triseptatum*30
- Figura 5.** Resultados de la sintomatología observada en campo, ensayos de patogenicidad e identificación macro y microscópica de *Fusarium triseptatum*31
- Figura 6.** Árbol filogenético del complejo FOOSC del aislado G13 utilizando el marcador *TEF-1 α*32

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Composición de los medios de cultivo (PDA, V8 y Dox-Czapek) utilizados para la siembra de hongos y oomicetos.....	38
Anexo 2. Composición de la solución Hoagland utilizada como medio nutritivo para el crecimiento de las plantas.....	39
Anexo 3. Árbol filogenético de los complejos de <i>Fusarium</i> sp., del aislado G13 utilizando el marcador <i>TEF-1α</i>	40

INTRODUCCIÓN

El género *Gypsophila* pertenece a la familia de las Caryophyllaceae, este género tiene alrededor de 125 especies de plantas perennes originarias de Turquía, Ucrania e Irán. Entre las especies más conocidas están *Gypsophila elegans* y *Gypsophila paniculata* mejor conocida como “aliento de bebé”, las cuales se usan comúnmente para los arreglos florales (Wolcan et al., 2018). *Gypsophila* es una planta de entre 90 y 120 cm de altura y se caracteriza por tener inflorescencias en panícula de flores pequeñas de color blanco o rosado (García, 2011). Este cultivo es de gran importancia económica para Ecuador debido a que genera una producción que representa el 70% de la producción mundial. Ecuador posee las condiciones propicias para el crecimiento de este cultivo, al encontrarse en la línea ecuatorial goza de temperaturas de entre 5°C a 27°C y luz perpendicular que permite tener entre 12 a 15 horas de luz (Cacuango, 2024; Haro et al., 2019). Del total de exportaciones de ornamentales, *gypsophila* genera el 8 % de las mismas, convirtiéndola en la segunda flor más exportada luego de la rosa (Ulcuango, 2013). Para 2023, esta inflorescencia fue exportada a 78 destinos diferentes, entre ellos a la Unión Europea con un 38 %, USA con un 20% y Kazajistán con un 10% con una ganancia de alrededor de 73 MM de dólares (Expoflores, 2023). Sin embargo, *gypsophila* está expuesta a factores abióticos como sequía, salinidad del suelo, temperaturas extremas, suelo compacto, estancamiento de agua y prácticas de cultivo adversas (Hernández, 2006). También el cultivo se ve afectado por agentes bióticos como insectos, bacterias, hongos u oomicetos que causan pérdidas enormes en los cultivos (Aguilar, 2020).

Por otro lado, entre las principales enfermedades bacterianas registradas tenemos: *Agrobacterium tumefaciens*, *Rhodococcus fascians* y *Pantoea agglomerans* las cuales generan tumores y producción de agallas en la corona, hojas y tallos de la planta, causando debilitamiento en las plantas, defoliación, y en última instancia, la muerte de la planta. En

menor incidencia se ha observado que *Gypsophila* es susceptible a los nemátodos formadores de nudos en las raíces como; *Meloidogyne arenaria* raza 1 y 2 en donde se observa raíces con agallas (Wolcan et al., 2018).

Se han descrito también oomicetos patógenos que causan infecciones en *Gypsophila* como *Phytophthora nicotianae*, que puede infectar a la planta en cualquier etapa de crecimiento, causando pudrición en raíces y corona, lo que genera marchitamiento de hojas y tallos. La descomposición de la planta se da de forma rápida cuando existen las condiciones propicias, como; abundante humedad, temperaturas cálidas y suelo saturado (Wolcan et al., 2018).

Pythium ultimum, es otro fitopatógeno, el cual durante el enraizamiento causa pudrición parcial o total de las plantaciones. En plantas adultas se ha visto que causa un crecimiento reducido, menor rendimiento y calidad de hojas (Wolcan et al., 2018).

Por otra parte, los hongos fitopatógenos son los principales causantes de las enfermedades en plantas debido a que, poseen características que les permiten adaptarse a diferentes condiciones y hospedadores. Pueden penetrar los tejidos vegetales por medio de la producción de esporas y adaptarse a diferentes ambientes (Recalde, 2021). Los síntomas característicos de una enfermedad causada por hongos son, marchitamiento y clorosis de follaje, pudrición de los tejidos del cuello de la planta y pudrición de raíces, las cuales generan manchas de color marrón, y finalmente la planta muere (Fernández, 2013).

Entre los principales hongos descritos que afectan el cultivo de *Gypsophila* tenemos a *Rhizoctonia solani*, causando aspecto seco y pudrición en la base del tallo, donde el rizoma se parte longitudinalmente. En un estudio realizado en el valle del Callejón de Huaylas-Ancash se observó plantas de *Gypsophila* que presentaban pudrición en la base del tallo, en donde se identificó por medio de ensayos de patogenicidad realizados en campo e *in vitro* a *Rhizoctonia solani* como el agente causal de esta enfermedad (Aguilar, 2020). Por último, *Fusarium* sp., causa podredumbre del tallo. Los primeros síntomas incluyen decoloración en la base del tallo

y ligero marchitamiento, que posteriormente se transforman en la podredumbre de corona y raíz, marchitamiento severo y plantas moribundas. Estos síntomas son producidos durante todas las etapas de crecimiento, en donde la enfermedad se ve favorecida por altas temperaturas, condiciones de humedad y el mal drenaje del suelo (Wolcan et al., 2018). *Fusarium oxysporum* Di Pietro es una de las especies que causa mayor infección a diferentes cultivos. Para *Gypsophila* se ha visto que provoca síntomas como amarillamiento de follaje, marchitez, pudrición de tallo y raíces por medio de una coloración café u rosada y posteriormente la muerte de la planta (Recalde, 2020). De igual forma, se ha registrado en un estudio realizado en invernaderos de Corea del Sur a *Fusarium proliferatum* como uno de los agentes causales del marchitamiento severo en esta planta causando la podredumbre de la corona del tallo (Lee et al., 2010)

Finalmente, dentro del género *Fusarium*, se ha descrito a *Fusarium triseptatum* como el agente asociado con la enfermedad de la podredumbre de cultivos de arroz causando marchitamiento vascular en la planta, lo cual inicia con un amarillento y marchitez de las hojas. Este hongo provoca decoloración marrón en los tejidos del xilema lo que causa podredumbre de raíces, tallos y frutos. En casos más severos genera la muerte de la planta y el suelo puede quedar infértil por mucho tiempo (Afolabi, 2023).

Para abordar estos problemas, una metodología utilizada para establecer la diversidad fúngica en plantas sanas y enfermas es el metagenoma de amplicón (Hernández, 2021). Esta técnica consiste en la amplificación y secuenciamiento de la región intergénica ITS (Espaciador del transcrito interno), que presenta variaciones suficientes entre especies para su identificación a nivel taxonómico de hongos (Suárez, 2022). Los primers ITS86F y ITS4 son ampliamente usados para estos análisis, ya que se ha demostrado que son altamente eficiente en la amplificación de la región ITS2 de una amplia gama de taxones fúngicos de muestras ambientales (Gao et al., 2021). La tecnología de secuenciamiento Illumina genera millones de

lecturas de ADN simultáneamente. A través del análisis bioinformático de variantes de secuencias de amplicón (ASVs), se estudia la diversidad genética de las especies. Esto facilita la comprensión de las relaciones evolutivas en los ecosistemas (Palanides et al., 2022). Además, la construcción de árboles filogenéticos es fundamental para identificar el género y especie, al mostrar las relaciones evolutivas entre ellas (Bocanegra, 2012). El proceso de construcción de un árbol filogenético implica varios pasos clave. Primero, se selecciona los marcadores adecuados que pueden ser secuencias de nucleótidos o proteínas. Luego, se realiza un alineamiento de estas secuencias para identificar similitudes y diferencias. A continuación, se escoge un modelo evolutivo que describa el cambio de las secuencias a lo largo del tiempo. Posteriormente, se determina un método para construir el árbol, ya sea utilizando métodos basados en distancias o en caracteres. Finalmente, es crucial verificar la fiabilidad del árbol construido mediante pruebas estadísticas. El método estadístico más utilizado para la construcción de árboles filogenéticos es el método de interferencia bayesiana debido a su flexibilidad para incorporar información previa, permitiendo inferencias más robustas. Por otro lado, el método GTR (General Time Reversible) es un modelo de sustitución de nucleótidos, lo que mejora la estimación de árboles filogenéticos. La combinación de la interferencia bayesiana con el método GTR permite realizar análisis filogenéticos más precisos y confiables (Páez et al., 2011). Por lo cual, el objetivo de este trabajo es identificar el agente causal de la pudrición y decoloramiento del cuello del tallo en plantas enfermas en *Gypsophila paniculata*.

MÉTODOS

2.1 Antecedentes y Muestreo

Las muestras fueron colectadas en la Florícola Florisol, ubicada en San José de Minas (0, 17133° N, 78, 41120° O), Pichincha-Ecuador. Las muestras de *Gypsophila paniculata* se colectaron con síntomas como descoloramiento, marchitamiento de tallo a nivel del cuello y obstrucción de haces vasculares. El agente causal de esta sintomatología era desconocido. Entre octubre y noviembre del 2023 se recolectaron 25 plantas enfermas de la variedad million de 5 semanas. Estas plantas fueron utilizadas para el aislamiento de posibles fitopatógenos responsables de la sintomatología. Se recolectaron además 5 plantas enfermas y 5 plantas sanas para el análisis del metagenoma de amplicón de la región ITS2 (espaciador transcrito interno). Las muestras fueron colocadas en fundas de plástico etiquetadas y transportadas al laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad San Francisco de Quito para su procesamiento.

2.2 Metagenómica de amplicón de la región ITS2

Cada muestra se trató de forma independiente, se desinfectaron porciones de 5 cm de tallo de plantas sanas y enfermas con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% por 2 minutos y se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril. Seguidamente, se realizó la maceración del tejido con nitrógeno líquido, las muestras obtenidas se utilizaron para extraer ADN utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil (Qiagen, 2013). Se midió la concentración de ADN con el equipo Nanodrop. Se estandarizó la concentración de cada muestra de ADN a 50 ng/ul. Las muestras se secuenciaron con la tecnología Illumina en la empresa Biosequence, utilizando la región ITS2 que se amplificó con los primers ITS86F-ITS4 (Biosequence, 2024).

2.3 Aislamiento de hongos y oomicetos

Diez plantas enfermas se usaron para el aislamiento de hongos y oomicetos. Primero, se lavó las plantas con agua de la llave para eliminar partículas de suelo y se cortaron fragmentos de tallo de 5cm de largo. Luego, en la cámara de flujo laminar se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1% durante dos minutos, seguido por un lavado con agua destilada estéril, posteriormente, se sumergieron en etanol (C₂ H₆ O) al 70% por 2 minutos y se realizaron tres enjuagues con agua destilada estéril por tres minutos. Se sembraron cuatro fragmentos de 5 mm² por caja Petri correspondientes a regiones del cuello del tallo que presentaban sintomatología (Ramirez et al.,2023). Se usaron tres medios de cultivo, Papa dextrosa agar (PDA), medio con jugo de vegetales V8 y agar Dox-Czapek, suplementados con gentamicina (160 mg/litro) (Anexo 1). Los tejidos se incubaron a 28°C por 7 días y se realizó una revisión diaria de acuerdo con la metodología descrita por Muñoz et al (2020). En el día 7, se observaron 20 morfologías diferentes de hongos, las cuales fueron aisladas en cultivos puros utilizando el método de aislamiento de punto de hifa. El cual, implica transferir micelio de una colonia existente a un nuevo medio para obtener cultivos puros. De cada cultivo puro de los hongos aislados se realizó identificación macroscópica (observación de características distintivas) y microscópica (observación en microscopio con un aumento 400X).

2.4 Pruebas de patogenicidad

Se utilizaron diez plantas sanas de *Gypsophila paniculata* de dos semanas de edad obtenidas de la Florícola Florisol. Las plantas fueron trasplantadas en macetas (1 litro) en sustrato suelo: arena en proporción (1:1) previamente autoclavado (121 °C, 1 atm, 1 h). Se inocularon cinco plantas por cada tratamiento. Para *Fusarium* sp. (aislado G13) se usaron cajas con micelio de 14 días de crecimiento en medio PDA+G. Para la inoculación se colocó sobre algodón estéril una solución de 1×10^6 conidios/ml. El algodón se colocó alrededor del tallo y se retiró al tercer día. Para el control se utilizaron 5 plantas en donde se realizó el mismo procedimiento, pero solo con agua destilada (Chu et al., 2024). Las plantas se colocaron en una cámara húmeda a

25-29°C, con fotoperiodo 12h/12h, luz/oscuridad; el riego se realizó cada semana con solución nutritiva de Hoagland (Riera et al.,2019) (Anexo 2). La sintomatología relacionada con la enfermedad se observó en el día 20 post inoculación y se realizó el re-aislamiento de hongos para dar cumplimiento a los postulados de Koch. Finalmente, los cultivos de hongos se incubaron a 28°C por 7 días. En la Florícola Florisol, con la misma metodología descrita anteriormente, se realizaron bioensayos con el aislado G13, utilizando 12 plantas por tratamiento. Los tratamientos usados fueron: suelo autoclavado + *Fusarium* aislado G13, suelo autoclavado sin el patógeno y suelo vivo (suelo de plantas con enfermedad). Se revisaron las plantas inoculadas diariamente hasta el día 21.

2.5 Identificación de los aislados usando herramientas de ADN

Del aislado fúngico G13 que dió positivo en las pruebas de patogenicidad se realizó la extracción de ADN genómico con el kit DNeasy PowerSoil (Qiagen). La integridad del ADN se verificó por medio de electroforesis con agarosa al 2%. Posteriormente, se amplificó la región ITS y la región que codifica para el factor de elongación de la transcripción (*TEF-1 α*) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tabla 3) (Tziros et al.,2022). Los productos obtenidos fueron enviados a MACROGEN Corea, para su secuenciación Sanger. Finalmente, las secuencias obtenidas fueron comparadas en NCBI BLAST (centro Nacional de Información Biotecnológica).

2.6 Construcción de árboles filogenéticos

A partir de las secuencias obtenidas se usó el programa MEGA 11 para el alineamiento con ClustalW (Tamura,2021). Para la construcción del árbol filogenético se usó el programa BEAST (V10.5.0) que implementa una metodología de inferencia Bayesiana, con el modelo de sustitución General Time Reversible (GTR). Además, se realizaron 100 millones de iteraciones para evaluar la robustez y confiabilidad del árbol filogenético obtenido (Figura 6).

RESULTADOS

3.1 Análisis de metagenómica de amplicón de la región ITS2

En el análisis metagenómico de amplicón de las muestras analizadas de plantas sanas y enfermas se identificaron varios grupos funcionales fúngicos, que desempeñan un papel fundamental en el ecosistema de la planta. En la figura 1. se observa la abundancia relativa obtenida del total de ASVs, en plantas sanas y enfermas. En plantas enfermas se obtuvo que los cinco principales taxones fueron; *Fusarium* sp, *Thanatephorus* sp (Estado sexual de *Rhizoctonia solani*), *Plectosphaerella* sp., *Gibeberella* sp., y *Gibellulopsis* sp (*Verticillium* sp.). Teniendo mayor porcentaje de abundancia relativa en *Fusarium* sp., representando alrededor del 50%, y *Thanatephorus* sp., con un 30% de abundancia relativa en plantas enfermas. En plantas sanas se obtuvo menor porcentaje de abundancia relativa en los cinco taxones observados en plantas enfermas (Figura 2). De igual forma, se identificaron 7 ASVs que correspondieron al 90% de la abundancia total de plantas enfermas, teniendo mayor porcentaje de lecturas *Fusarium oxysporum* con 1341 lecturas, seguidas de ASVs de *Thanethoporus* sp., con 7538 lecturas (Figura 3).

3.2 Aislamiento y caracterización de los aislados obtenidos

Se obtuvieron 20 aislados puros, 5 aislados que, por sus características morfológicas, corresponden a *Fusarium* sp. Se observó micelio de color morado con crecimiento circular y textura algodonosa (Acevedo, 2014). Macroconidas alargadas con septos y microondas pequeñas con forma elíptica (Sánchez et al., 2024). De igual forma, se obtuvieron 9 aislados que por sus características morfológicas se asemejan a *Gibellulopsis* sp., con micelio de color amarillo y blanco con textura plana, con estructuras ramificadas y conidios irregulares unicelulares sin septos (Leon-Ttacca et al., 2019). Dos aislados que por sus características distintivas se catalogaron como correspondientes a *Phytium* sp., con micelio de color blanco

con textura algodonodosa y con oogonios característicos de este oomiceto (Paviotti et al., 2018). Por último, se obtuvieron, 4 aislados con características similares a las descritas para *Thanatephorus* sp., con micelio de color marrón oscuro con textura plana, y en su microscopia se observó células hifales ramificadas (Niebles et al., 2022) (Tabla 1).

3.3 Pruebas de patogenicidad en plantas sanas de *Gypsophila paniculata*

Se realizaron pruebas de patogenicidad con los 18 aislados fúngicos y 2 de oomicetos. Se obtuvo 100% de sintomatología relacionada con la enfermedad únicamente con el aislado G13 correspondiente a *Fusarium* sp, al día 20 post-inoculación (Tabla 2). Las plantas usadas como control no presentaron ninguna sintomatología. Para observar detalladamente la sintomatología se realizó un corte transversal al tallo en la zona del cuello sitio donde la sintomatología se presentó inicialmente. Se observó la obstrucción de los haces vasculares que se manifestó con una decoloración y podredumbre severa en tallo (Figura 4). Del re-aislamiento se obtuvo crecimiento de micelio en medio PDA + Gentamicina en el día 7. Se observó crecimiento de micelio de color morado con las mismas características observadas del aislado G13.

En los ensayos realizados en la Floricola Florisol se obtuvo sintomatología relacionada con la enfermedad en el día 21. En el primer tratamiento (suelo autoclavado+G13) se obtuvo un porcentaje de infección del 16% en donde las plantas presentaron pudrición y decoloramiento de tallos y raíces. De igual forma, en el suelo vivo (suelo sin autoclavar proveniente de plantas enfermas) se obtuvo un porcentaje de infección del 25% presentando la planta afectación en el cuello del tallo debido a la obstrucción de los haces vasculares. El control negativo (suelo autoclavado) no presentó sintomatología. Finalmente, estas muestras fueron llevadas al laboratorio de Agrobiotecnología en donde se realizó un re-aislamiento de los tejidos infectados en medio PDA+G, los cuales fueron dejados en incubación a 28°C por 7 días. En el día 7 se observó crecimiento de micelio de color morado y textura algodonosa y macroconidias alargadas con septos y microconidias pequeñas.

3.4 Identificación molecular

A partir de las secuencias obtenidas del secuenciamiento Sanger realizado en MAGROGEN-Corea, se generó una secuencia consenso de la región ITS que presentó una banda de 549 pb y del gen *TEF 1 α* con una banda de 647 pb. Posteriormente, se realizó un análisis BLAST, donde se encontró que la secuencia de la región de ITS mostró un 100% de identidad con la secuencia de *Fusarium oxysporum* (MK850398.1). De manera similar, con la secuencia del gen *TEF 1 α* se obtuvo un 100% de identidad con la secuencia de *Fusarium triseptatum* (PQ434664.1) (Figura 5).

3.5 Análisis filogenético

En el árbol filogenético generado, el aislado G13 se alineó dentro del complejo FOOSC, sin embargo, no se agrupó en un clado en específico (Anexo 3). Por lo cual, fue necesario realizar un segundo análisis filogenético enfocado exclusivamente en el complejo FOOSC. Para ello, se incorporaron secuencias adicionales pertenecientes a este complejo con el objetivo de mejorar la resolución del árbol y facilitar la identificación del clado al que pertenece el aislado G13. En este segundo árbol se identificó que el aislado G13 se agrupó dentro del clado de *Fusarium triseptatum* con un posterior de 1, este valor nos indica que el grupo en cuestión es monofilético, es decir, que incluye a un ancestro común y a sus descendientes. De igual forma, al tener un valor de 1 proporciona claridad sobre las relaciones evolutivas entre las especies (Figura 6) (Castillo et al.,2007).

DISCUSIÓN

La especie *Gypsophila paniculata*, comúnmente conocida como “aliento de bebé”, es ampliamente utilizada en arreglos florales. Sin embargo, *Gypsophila* enfrenta desafíos tanto abióticos como bióticos incluyendo plagas y enfermedades causadas por hongos y oomicetos que afectan su producción. Por lo tanto, este estudio es crucial para identificar agentes fitopatógenos responsables de la pudrición y decoloración de tallos y raíces en *Gypsophila paniculata* en Pichincha-Ecuador.

En consecuencia, el análisis metagenómico de amplicón basado en la región ITS2 es una herramienta esencial para la identificación y caracterización de la composición microbiana, incluyendo los patógenos asociados a sintomatologías específicas. Este enfoque, independiente del cultivo, permite detectar y analizar comunidades fúngicas de manera precisa, siendo ampliamente utilizado en diversos sistemas agrícolas y ecosistemas naturales (Tedersoo et al., 2015).

En este estudio los resultados de metagenómica de amplicón ITS permitieron identificar los principales ASVs relacionados con plantas sanas y enfermas. Al analizar la composición de los ASVs predominantes en plantas enfermas se encontró un predominio de ASVs correspondientes a *Fusarium oxysporum*, seguida de *Thanetophorus* dos conocidos patógenos fúngicos. Estos hallazgos confirman que las enfermedades en plantas no solo están determinadas por la presencia de patógenos, sino también por el desequilibrio en la composición del microbioma. Estudios previos han reportado patrones similares en otras especies ornamentales, destacando la relevancia de comprender las interacciones microbianas en el contexto de la salud vegetal (IPM Illinois, 2023).

El análisis metagenómico no solo confirmó la presencia de *Fusarium* sp. como patógeno predominante, sino que también destacó la coexistencia de otros microorganismos en las

plantas enfermas, cuya abundancia es significativamente mayor que en las plantas sanas. Esta diferencia en la cantidad y diversidad de patógenos resalta la importancia de analizar el microbioma completo en lugar de enfocarse en un solo agente causal, ya que estos patógenos secundarios podrían amplificar la severidad de la enfermedad (Wolcan et al., 2005).

En este contexto, se ha documentado la interacción de múltiples hongos fitopatógenos en cultivos de clavel (*Dianthus caryophyllus*), lo que puede incrementar la severidad de las enfermedades. Según Martínez (2008), en un estudio relacionado a ornamentales realizado en México identificó cuatro hongos patógenos: *Fusarium* sp., *Botrytis* sp, *Alternaria* sp., y *Rhizoctonia* sp., responsables de diversas enfermedades que pueden causar pérdidas significativas en la producción de clavel. Se ha observado que, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* pueden provocar un efecto sinérgico, intensificando los síntomas de marchitamiento y pudrición basal de cultivos de clavel, lo que dificulta su manejo y control (Martínez, 2008).

De igual forma, se ha evidenciado que en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) actúan dos fitopatógenos, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*. Los cuales actúan de forma sinérgicamente, causando una mayor severidad en la enfermedad que puede resultar en pérdidas de cultivo de entre el 60 y 100%. Estos fitopatógenos prosperan cuando las plantas se encuentran bajo condiciones de estrés, provocando marchitamiento y tizón tardío, lo que lleva a la muerte de la planta (López, 2018).

Para conocer el agente causal de la sintomatología es necesario realizar una identificación macro y microscópica de los hongos fitopatógenos. Se llevó a cabo el aislamiento y la caracterización morfológica de 20 microorganismos, lo que permitió identificar cinco géneros fúngicos: *Fusarium* sp., *Gibellulopsis* sp., *Pythium* sp. y *Thanatephorus* sp. Las características distintivas observadas en estos géneros coinciden con descripciones taxonómicas previamente

documentadas, respaldando la metodología empleada en este estudio. Sin embargo, aunque estas observaciones son valiosas para una identificación inicial, es evidente la importancia de complementar el análisis de todos los aislados con técnicas moleculares. Esto no solo confirmaría la identidad de los aislados, sino que también permitiría diferenciar con mayor certeza entre especies patógenas y saprófitas, optimizando así su clasificación y estudio (Díaz et al., 2019).

Las pruebas de patogenicidad realizadas demostraron que, de los 20 aislados obtenidos, solo *Fusarium triseptatum* (aislado G13) fue capaz de causar enfermedad en *Gypsophila paniculata*. La infección se manifestó como una decoloración y podredumbre severa en los tallos, asociada con la obstrucción de los haces vasculares, lo que es característico de los patógenos vasculares del género *Fusarium* (Severo et al., 2024). La confirmación de la identidad del aislado G13 a través de un re-aislamiento y su coincidencia con las características microscópicas iniciales refuerzan su papel como agente causal. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que, aunque *Fusarium triseptatum* ha sido reportado en cultivos de zanahoria (*Daucus carota* L. subsp. *sativus*) causando podredumbre a los cultivos (Favaro et al., 2024), y cultivos de tomate causando podredumbre de raíz y marchitamiento (Fernández et al., 2013). La asociación de *Fusarium triseptatum* con *Gypsophila paniculata* representa un hallazgo novedoso para la región de Pichincha, Ecuador.

Para corroborar esta identificación inicial, se realizó un análisis molecular del aislado G13 mediante PCR, lo que confirmó la presencia de *Fusarium* sp., en los aislados patógenos. Se amplificaron fragmentos de 549 pb con los primers ITS1-ITS4 y 647 pb con los primers EF1-EF2, lo que corroboró su identificación como *Fusarium triseptatum*. Los tamaños de las bandas amplificadas coincidieron con lo reportado en la literatura, lo que valida el protocolo empleado (Salazar et al., 2020). El análisis filogenético se realizó utilizando el marcador *TEF-1 α* , comúnmente utilizado por su alto nivel de secuencias polimórficas, lo cual ayuda a clasificar

especies que están estrechamente relacionadas entre sí (Salazar et al., 2016). En este estudio el uso del marcador *Tef-1 α* situó al aislado dentro del complejo *Fusarium oxysporum* (FOOSC) y, específicamente, en el clado de *F. triseptatum*, proporcionando una resolución taxonómica robusta para diferenciar especies dentro del complejo FOOSC, que incluye numerosos patógenos de importancia agrícola como lo descrito por (Uribe et al., 2020).

La identificación de *Fusarium triseptatum* como agente causal de la enfermedad en *Gypsophila paniculata* tiene implicaciones significativas para la floricultura en la región de Pichincha, dada la relevancia económica de este cultivo ornamental. Los síntomas vasculares observados podrían conducir a pérdidas significativas en calidad y rendimiento si no se implementan medidas de manejo adecuadas. Estrategias como el monitoreo del microbioma, el uso de prácticas culturales como la rotación de cultivos, estrategias que reduzcan la humedad en el suelo, y la aplicación de fungicidas específicos podrían ser útiles para mitigar el impacto de este patógeno, así como el uso de agentes de control biológico dirigidas hacia *Fusarium triseptatum* (Rios et al., 2021). En este contexto, se ha documentado la eficiencia de la cepa CACIS-1.15CA (*Streptomyces* sp.), que se destaca por su capacidad de producir metabolitos de color amarillo que ejercen un efecto inhibitorio sobre diversos hongos patógenos del género *Fusarium* sp. (Rios et al., 2021). Por lo cual, esta investigación es una base para estudios futuros que permitan desarrollar estrategias sostenibles para el manejo de enfermedades en plantas ornamentales.

CONCLUSIONES

Gypsophila paniculata es de gran importancia económica para el Ecuador, sin embargo, sus cultivos se ven amenazados por diversas enfermedades causadas por patógenos, en especial por hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp. El análisis metagenómico de amplicón basado en ITS reveló diferencias significativas en la composición microbiana entre plantas sanas y enfermas, destacando un aumento en la abundancia relativa de *Fusarium oxysporum* en plantas con síntomas de enfermedad. A partir de los aislamientos obtenidos, se caracterizaron morfológicamente 20 microorganismos, clasificándolos preliminarmente en los géneros *Fusarium* sp., *Gibellulopsis* sp., *Pythium* sp. y *Thanatephorus* sp. Las pruebas de patogenicidad realizadas confirmaron que el aislado G13, identificado molecularmente como *Fusarium triseptatum*, es un patógeno agresivo capaz de infectar los tallos de *Gypsophila paniculata* y causar una decoloración y podredumbre severa en los tejidos vasculares. El uso de marcadores ITS y *TEF-1 α* , junto con un análisis filogenético, permitió confirmar la identidad del aislado G13 como *Fusarium triseptatum* dentro del complejo *Fusarium oxysporum* (FOOSC), destacando la importancia de estas herramientas para la identificación precisa de especies. Este estudio resalta la importancia de combinar técnicas metagenómicas, morfológicas, moleculares y filogenéticas para identificar patógenos de plantas ornamentales, específicamente en *Gypsophila paniculata*. A medida que se profundiza en el entendimiento de los patógenos involucrados y sus interacciones, se podrán implementar estrategias de control y prevención para asegurar la salud y productividad de este cultivo ornamental.

TABLAS

Tabla 1. Caracterización macroscópica y microscópica de los 20 microorganismos aislados obtenidos de plantas enfermas de *Gypsophila paniculata*

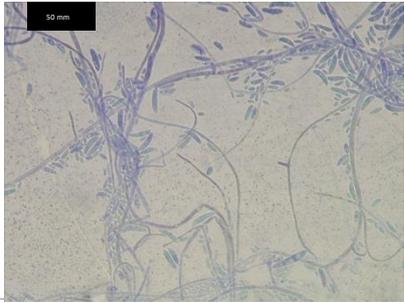
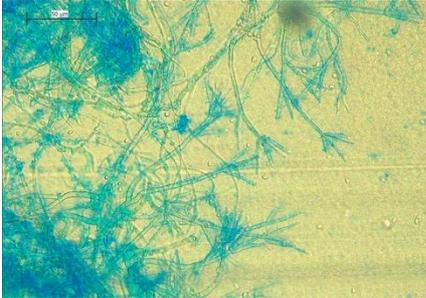
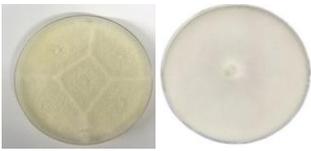
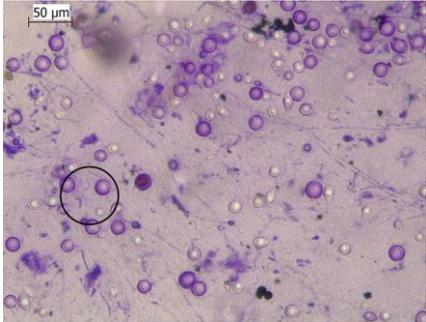
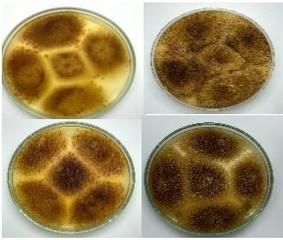
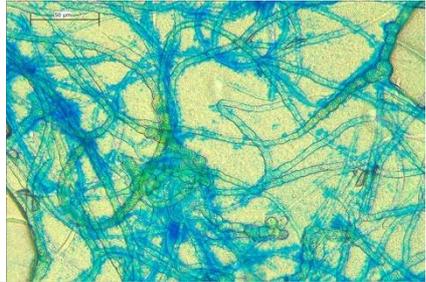
Código	Identificación macroscópica	Identificación microscópica
G1	Posible <i>Fusarium</i> sp. 	
G4.1		
G10		
G11		
G13		
G4.2	Posible <i>Verticillium</i> sp. 	
G5		
G6		
G9.3		
G2.2.2		
G2.2.3		
G2.6.2		
G2.6.3		
2.8.1	Posible <i>Phythium</i> sp. 	
G0		
G12	Posible <i>Rhizoctonia</i> sp. 	
2.5.2		
2.5.3		
2.7.1		
2.7.2		

Tabla 2. Porcentaje de plantas infectadas en las pruebas de patogenicidad usando el aislado

G13

Aislado	Condiciones	Metodología	Resultados en invernadero
<i>Fusarium triseptatum.</i>	Fotoperiodo: (12h/12h), (luz/oscuridad) Temperatura: (25-28°C). Suelo: suelo: arena (1:1)	Se colocó algodón con una solución de 1×10^6 conidios/ml alrededor del tallo y se retiró al tercer día (Chu et al.,2024).	Se obtuvo un porcentaje de infección del 100% en donde las plantas presentaron pudrición y decoloramiento de tallos y raíces

Tabla 3. Condiciones de las PCRs primers usados *Fusarium triseptatum.*

Primer	Secuencia (5'-3')	Condiciones	(pb)	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	94°C a 3min 94°C a 1min	600 pb	(White,1990)
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	58°C a 1min 72°C a 1min 72°C a 10min		
EF1	ATGGGTAAGGARGACAAGAC	95°C a 2min 95°C a 30s	700 pb	(O'Donell et al.,1998)
EF2	GGARGTACCAGTSATCATGTT	57°C a 30s 72°C a 2min 72°C a 10min		

FIGURAS

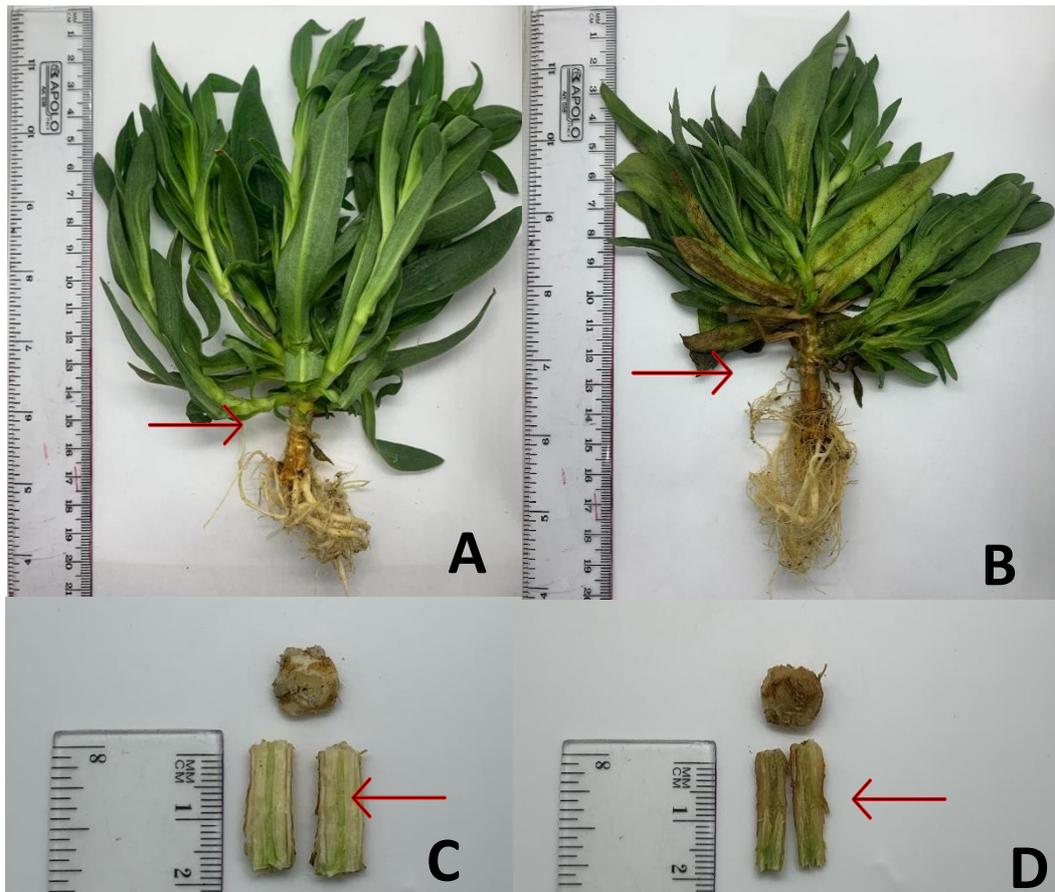


Figura 1. Planta sana y enferma de *Gypsophila paniculata*, **A**, Planta sana; **B**, Planta enferma (marchitamiento y podredumbre en el tallo); **C** y **D**, cortes transversales y longitudinales (planta sana y planta enferma)

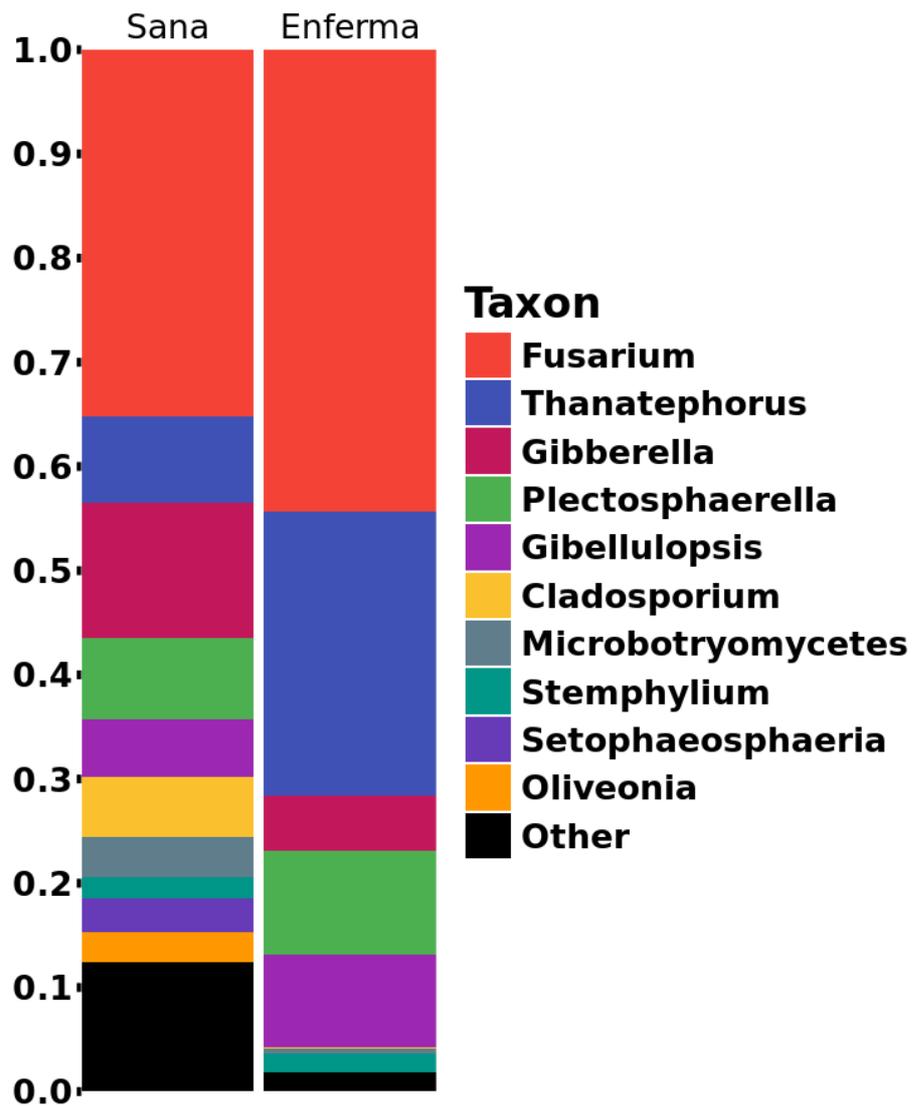


Figura 2. Resultados del análisis de Metagenómica de amplicón, se observa la abundancia relativa en planta sana y enferma. Sin embargo, en los resultados de plantas enfermas se observa mayor porcentaje de abundancia relativa, sobresaliendo *Fusarium* sp.

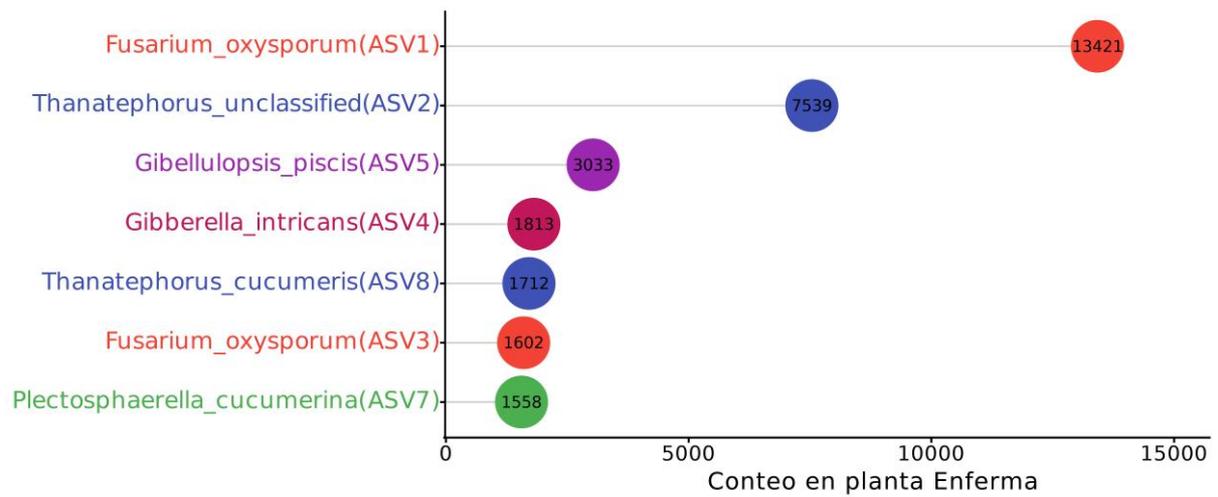


Figura 3. Top 7 Amplicon Sequence Variant (ASV) de plantas enfermas, se observa 7 ASV que representan el 90% de abundancia total en plantas enfermas.



Figura 4. Resultados de ensayos de patogenicidad aislado G13, A. resultados de los ensayos de patogenicidad de las plantas control, B. resultados de los ensayos de patogenicidad de la planta inoculada, C y D. corte transversal del tallo de plantas control y plantas inoculadas con el aislado G13.

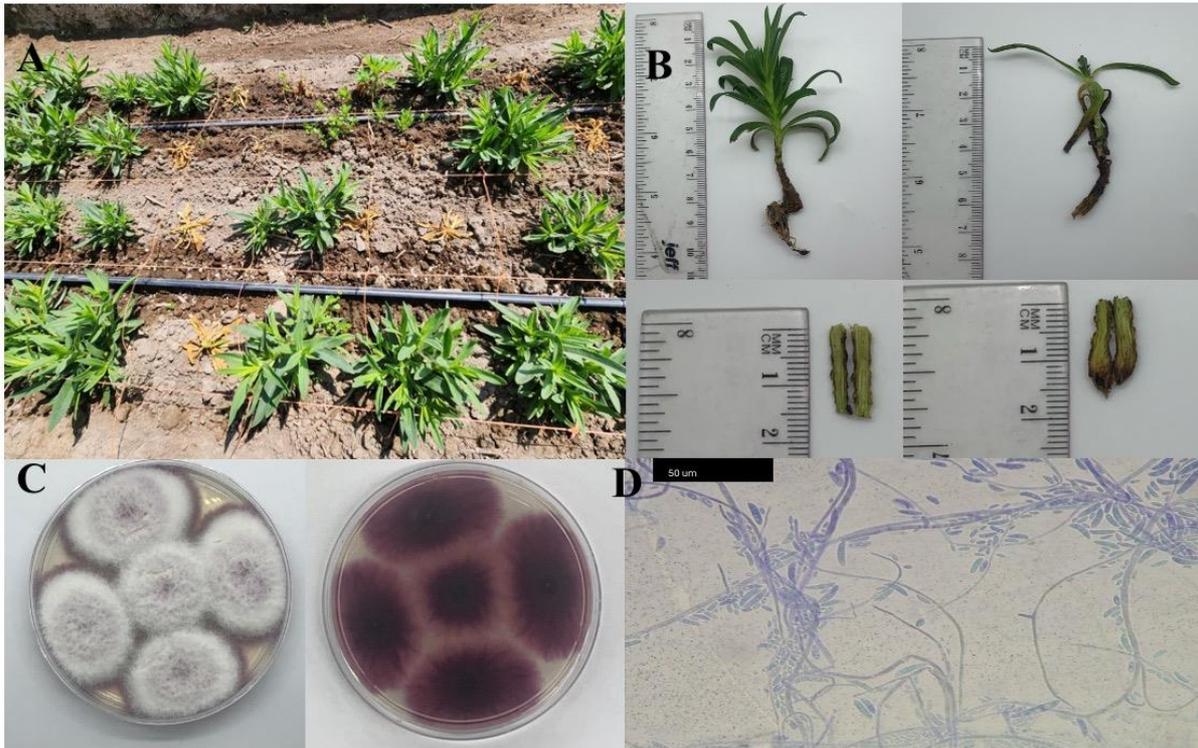


Figura 5. Resultados de *Fusarium triseptatum*, A. foto de la enfermedad en campo, B. resultados de los ensayos de patogenicidad del control y la planta inoculada, C y D. macroscopia y microscopia (40x) de *Fusarium triseptatum*.

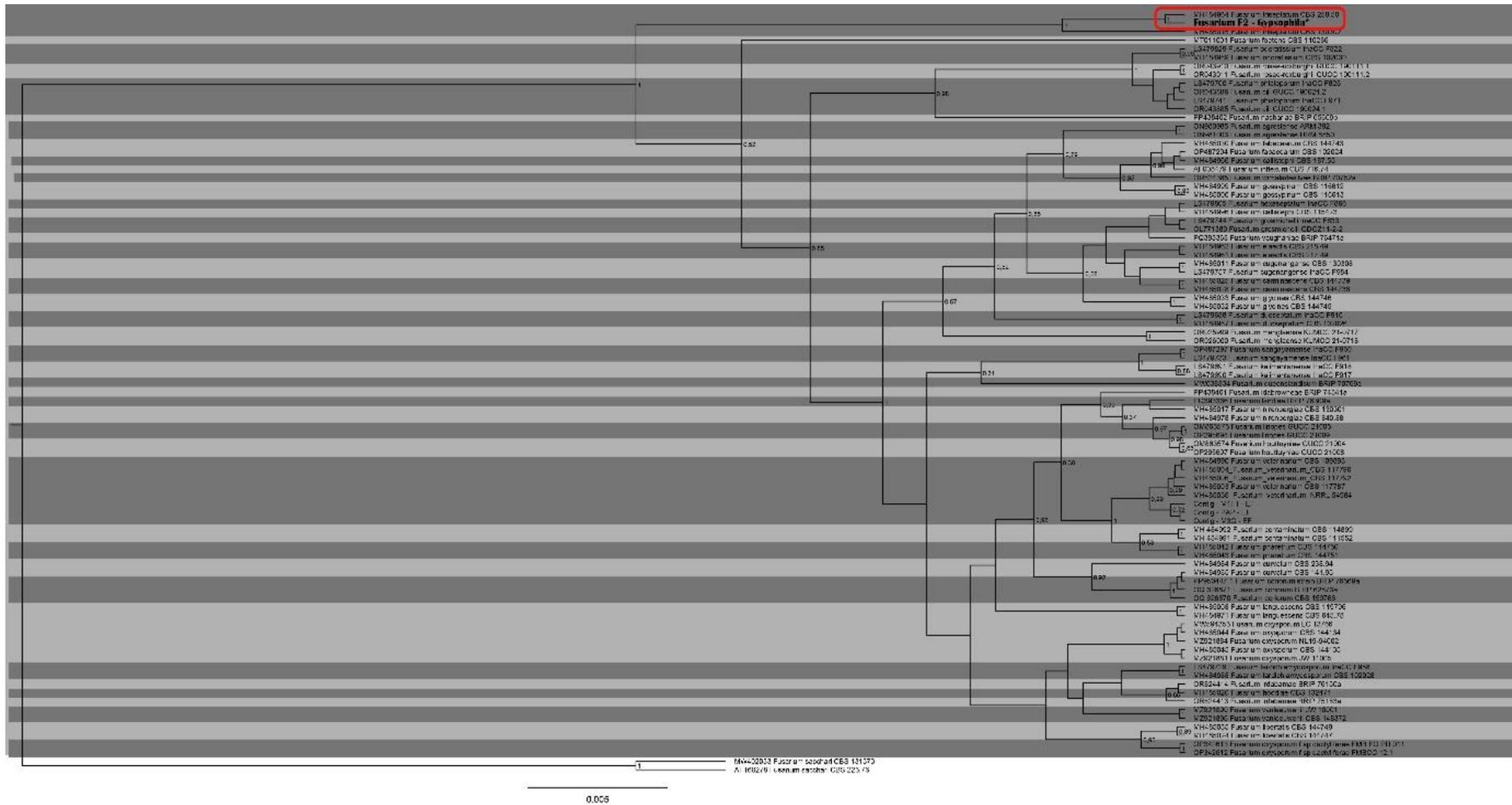


Figura 6. Árbol filogenético del aislado G13 utilizando el marcador *TEF-1α*, a partir del análisis bayesiano de las secuencias de referencia de la base de datos FUSARIOID-ID (Westerdijk FungalBio, Diversity Institute, The Netherlands), usando Clustal W bajo el software de MEGA11, y con 100.000 réplicas de bootstraps. Se muestra que el aislado G13 pertenece al complejo FOCS en donde se agrupa dentro del clado de *Fusarium triseptatum*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acevedo Granados, Y. F. (2014). Taxonomía molecular de aislamientos de fusarium obtenidos a partir de muestras clínicas [Tesis de Maestría]. Universidad Nacional de Colombia. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/21024>
- Afolabi, O. O., Bigirimana, V. D. P., Hua, G. K. H., Oni, F. E., Bertier, L., Onwughalu, J., & Höfte, M. (2023). Fusarium and Sarocladium species associated with Rice Sheath Rot disease in sub-Saharan Africa. *Diversity*, 15(10), 1090. <https://doi.org/10.3390/d15101090>
- Aguilar Ancota, R. (2020). Etiología y control de la pudrición del cuello en el cultivo de *Gypsophila paniculata* en el Valle de Caraz, Ancash. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. <https://hdl.handle.net/20.500.12996/4399>
- BioSequence Ecuador. (2024). *BIOSEQUENCE* – Biología Molecular. <https://biosequenceec.com/>
- Bocanegra Moreno, L. A. (2012). Identificación de complejos de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* en pacientes con onicomycosis [Tesis de Pregrado]. Universidad de Los Andes, Colombia. <https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/c7769029-8b74-4f80-9364-8306c279119c/content>
- Cacuango, A. (2024). Evaluación del comportamiento de dos cultivares de *Gypsophila paniculata*. en combinación con cuatro cultivares de *Rosa hybrida* L. en bouquets para exportación. Universidad Politécnica Salesiana, Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/26964>
- Castillo-Cerón, J. M., & Goyenechea, I. (2007). Conceptos básicos en sistemática filogenética: los deuterostomados como ejemplo. De: *La sistemática base del conocimiento de la biodiversidad*. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México, 145-158. https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/icbi/LI_SistBioAnimal/Irene_Mayer/CG2007_Conceptos.pdf
- Chu, L., Li, D., Hou, W., Dan, Z., Wang, X., & Dong, C. (2024). First Report of *Fusarium falciforme* Causing Root and Rhizome Rot of *Epimedium sagittatum* in China. *Plant Disease*, 108(5), PDIS-01. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-24-0185-PDN>
- Díaz, C. I. E., Zambrano, A. D. L. Á. M., Cordero, P. D. M., Placencia, X. M. P., Guerrero, J. E. T., Córdova, H. S. C., & Molina, J. A. M. (2019). Caracterización de pacientes con onicomycosis en organizaciones campesinas de la provincia de Los Ríos, Ecuador. *AVFT–Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 38(1).
- Expoflores. (2023). Reporte estadístico mensual 2023. <https://expoflores.com/wp-content/uploads/2023/12/Expoflores-diciembre-2023.pdf>

- Favaro, M. A., Maumary, R. L., Lutz, A., Soressi, M. C., Del Valle, E., & Fernandez, L. N. (2024). Fusarium Species Causing Dry Rot of Carrot in Central Argentina. *Journal of Phytopathology*, *172*(5), e13396. <https://doi.org/10.1111/jph.13396>
- Fernández-Herrera, E., Ruiz, J. G., Puente, E. R., & Ramos, M. A. (2013). Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Texcoco México. *Biotecnia*, *15*(3), 46-50. <https://www.redalyc.org/pdf/6729/672971124007.pdf>
- Gao, B., Chi, L., Zhu, Y., Shi, X., Tu, P., Li, B., & Schnabl, B. (2021). An introduction to next generation sequencing bioinformatic analysis in gut microbiome studies. *Biomolecules*, *11*(4), 530. <https://doi.org/10.3390/biom11040530>
- García Casanova, M. (2011). Germinación de semillas, desarrollo de plántulas y niveles de prolina en dos especies del género *Gypsophila*. Universitat Politècnica de València. <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/10347/Marta%20Garc%c3%ada%20Casanova.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Haro, P. (2019). Análisis prospectivo y comparativo de la exportación de gypsophilas frente a las rosas. Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE. <https://repositorio.espe.edu.ec/items/925b129a-e1b9-433e-ae4-f7b81467b5bf>
- Hernández García, V. (2006). Factores abióticos y su relación con el síndrome de la punta morada de la papa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Navarro, México. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/3827>
- Hernández, J. (2021). Análisis comparativo de las comunidades microbianas endófitas en poblaciones silvestres y comerciales de *Vainilla planifolia* y establecimiento de una metodología de aclimatación. Centro de Investigación Científica de Yucatán, México. <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1999>
- IPM Illinois. (2023). *Fusarium Wilt Diseases of Herbaceous Ornamentals*. Recuperado de: <https://ipm.illinois.edu>
- Lee, H. B., Kim, C. J., Mun, H. Y., Choi, H. S., Lee, Y. H., & Yun, H. O. (2010). First Report of Crown Rot on Gypsophila (*Gypsophila paniculata*) Caused by *Fusarium proliferatum* in Korea. *Plant Disease*, *95*(2), 220. <https://doi.org/10.1094/pdis-05-10-0376>
- Leon-Ttacca, B., Arévalo-Gardini, E., & Bouchon, A. S. (2019). Muerte repentina de *Theobroma cacao* L. causado por *Verticillium dahliae* Kleb. en el Perú y su biocontrol In vitro. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, *20*(1), 117-148. https://doi.org/10.21930/rcta.vol20_num1_art:1251
- López Pérez, M. C. (2018). Inducción de tolerancia al estrés por Fusarium sp. y Phytophthora infestans en tomate mediante la aplicación de silicio [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/handle/123456789/45461>

- Martínez-Fernández, E. (2008). Hongos patógenos del cultivo de clavel (*dianthus caryophyllus* L.) en el Estado de Morelos, México. *Investigación agropecuaria*, 5(1), 1-8.
- Muñoz, V., Cisterna, V., France, A. (2020). *Aislamiento de microorganismos fitopatógenos* [en línea]. Chillan: Boleetín INIA – Instituto de Investigaciones Agropecuarias, N° 428, 77-91. <https://hdl.handle.net/20.500.14001/67165>
- Niebles, J. S., Escobar, J. P., Centeno, K. V., Cotrina, D. C., Gómez, R. M., Abanto, R. L., & Quispe, R. C. (2022). Control de *Colletotrichum* “agente causal de la antracnosis en el fruto del mango (*Mangifera indica* L.)” aplicando metabolitos de *Trichoderma*. *Revista Ciencias Biológicas y Ambientales*, 1(1). <https://doi.org/10.33326/29585309.2022.1.1597>
- O’Donnell, K., H. Kistler, E. Cigelnik, and R. Ploetz. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:2044-2049.
- Páez, L. O. M., Lozano, M. R., & Davila, J. A. R. (2011). Descripción general de la Inferencia Bayesiana y sus aplicaciones en los procesos de gestión. *La simulación al Servicio de la Academia*, 2, 1-28.
- Paviotti, S., Fernandez, L., Maumary, R., & Favaro, M. A. (2018). *Caracterización e impacto de patógenos de suelo en el cultivo de zanahoria en el albardón costero santafesino*. https://ica.bdigital.uncu.edu.ar/objetos_digitales/13331/27-agroalimentos-paviotti-sofia-unl.pdf
- Qiagen. (2013). *DNeasy PowerSoil Pro Kit*. <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/microbial-dna/dneasy-powersoil-pro-kit>
- Ramirez-Villacis, D. X., Barriga-Medina, N., Llerena-Llerena, S., Pazmino-Guevara, C., & Leon-Reyes, A. (2023). First Report of *Alternaria alternata* Causing Leaf Spot on Broccoli in Ecuador. *Plant Disease*, 107(9), 2866. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0598-PDN>
- Riera, N., Ramirez-Villacis, D., Barriga-Medina, N., Alvarez-Santana, J., Herrera, K., Ruales, C., & Leon-Reyes, A. (2019). First report of banana anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Ecuador. *Plant Disease*, 103(4), 763-763. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0069-PDN>
- Rios-Hernández, T. A., Uc-Varguez, A., & Evangelista-Martínez, Z. (2021). Control biológico de *Fusarium oxysporum*, agente causal de la pudrición del corno en gladiolo, mediante estreptomicetos. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(3), 391-413. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2105-3>

- Salazar González, C., Lagos Mora, L. E., Díaz Rodríguez, V., Mora Chaves, S., & Betancourth Garcia, C. (2020). Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 23(1). <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1471>
- Salazar-González, C., Serna-Cock, L., & Gómez-López, E. (2016). Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*). *Agronomía Mesoamericana*, 27(2), 277-285. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v27i2.21269>
- Sánchez Castell, K. J. (2024). Aislamiento y selección de cepas de *Trichoderma* spp. Antagonistas a *Fusarium oxysporum* causante de la necrosis en la raíz de la agave angustifolia [Tesis de Pregrado]. Universidad Autónoma del estado de Morelos, México. <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/4587>
- Severo, R., Soki Shibusani, L. J., da Silva, G. F., da Silva Costa Guimarães, S., de Alcântara Neto, F., Beserra Jr, J. E. A., & de Melo, M. P. (2024). *Fusarium* species causing root rot and wilt in tomato in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 172(1), e13261. <https://doi.org/10.1111/jph.13261>
- Suárez-Contreras, L. Y., & Peñaranda-Figueroa, F. A. (2022). Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 20(1), 194-206.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Tedersoo, L., Anslan, S., Bahram, M., Põlme, S., Riit, T., Liiv, I., ... & Abarenkov, K. (2015). Shotgun metagenomes and multiple primer pair-barcode combinations of amplicons reveal biases in metabarcoding analyses of fungi. *MycoKeys*, 10, 1-43. <http://mycokeys.pensoft.net>
- Tziros, G. T., Samaras, A., & Karaoglanidis, G. S. (2022). *Fusarium equiseti* as an emerging foliar pathogen of lettuce in Greece: Identification and development of a real-time PCR for quantification of inoculum in soil samples. *Pathogens*, 11(11), 1357. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111357>
- Uribe-Cortés, T. B., Silva-Rojas, H. V., Mendoza-Onofre, L. E., Velázquez-Cruz, C., & Rebollar-Alviter, Á. (2020). Identificación de especies de *Fusarium* aisladas de semillas sintomáticas y asintomáticas de maíz con base en el gen TEF-1 α . *Revista Fitotecnia Mexicana*, 43(1), 79-88. <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.1.79>

- White, T. J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics*. PCR Protocols: A guide to methods and applications/Academic Press, Inc.
- Wolcan, S. M., Mourellos, C. A., Sisterna, M. N., Del P González, M., Alippi, A. M., Nico, A., & Lori, G. A. (2018). *Diseases of gypsophila*. In Handbook of plant disease management (pp. 561–582). https://doi.org/10.1007/978-3-319-39670-5_19
- Wolcan, S. M., Ronco, L., & Lori, G. A. (2005). *Podredumbres basales de Gypsophila paniculata (Caryophyllaceae): Agentes causales y su patogenicidad potencial sobre Dianthus caryophyllus*. Centro de Investigaciones de Fitopatología, UNLP.
Recuperado de: https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722007000200002&lang=es

ANEXOS

Anexo 1: Composición de los medios de cultivo (PDA, V8 y Czapek) utilizados para la siembra de hongos y oomicetos.

PDA	
Extracto de patata	4.0g/L
Dextrosa	20.0g/L
Agar-Agar	15.0g/L
V8	
Jugo V8	200ml/L
Maltosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	20g/L
Asparagina (C ₄ H ₈ N ₂ O ₃)	1g/L
Extracto de malta (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	10g/L
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	3g/L
Agar	15g/L
Czapek	
Scarosa (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	30g/L
Nitrato de sodio (NaNO ₃)	3g/L
Fosfato dipotásico (K ₂ HPO ₄)	1g/L
Sulfato de Magnesio (MgSO ₄)	0.5g/L
Cloruro de potasio (KCl)	0.5g/L
Sulfato ferroso (FeSO ₄)	0.01g/L
Agar	21g/L

Anexo 2: Composición de la solución Hoagland utilizada como medio nutritivo para el crecimiento de las platas.

Nutrientes	Cantidad por litro
<i>Macronutrientes</i>	
Nitrato de Potasio (KNO ₃)	6 g
Nitrato de Calcio Ca (NO ₃) ₂	4 g
Fostato Diácido de Amonio (NH ₄ H ₂ PO ₄)	1 g
Sulfato de Magnesio Heptahidratado MgSO ₄	2 g
<i>Micronutrientes</i>	
Boro (B)	0.5 mg
Cobre (Cu)	0.02 mg
Hierro (Fe)	1.0 mg
Manganeso (Mn)	0.5 mg
Molibdeno (Mo)	0.01 mg
Zinc (Zn)	0.05 mg

Anexo 3: Árbol filogenético de los complejos de *Fusarium* sp., del aislado G13 utilizando el marcador *TEF-1a*.

