

**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de  
Patogenicidad de *Alternaria* spp. sobre botones de Rosa  
(*Rosa* sp) y plantas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*)  
Trabajo de Investigación**

**Fernando Andrés Herrera León**

**Ingeniería en Procesos Biotecnológicos**

Trabajo de titulación presentado como requisito  
para la obtención del título de  
Ingeniero en Procesos Biotecnológicos

Quito, 14 de diciembre de 2016

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ  
COLEGIO CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**HOJA DE CALIFICACIÓN  
DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

**Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de  
*Alternaria* spp. sobre botones de Rosa y plantas de Brócoli**

**Fernando Andrés Herrera León**

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León Reyes, PhD.

Firma del profesor

---

Quito, 14 de diciembre de 2016

## 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 el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante: \_\_\_\_\_

Nombres y apellidos: Fernando Andrés Herrera León

Código: 00106979

Cédula de Identidad: 1724401466

Lugar y fecha: Quito, 14 diciembre de 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero empezar agradeciendo a mis padres y hermano quienes han sido un pilar fundamental durante toda esta etapa ya que gracias a su apoyo incondicional he logrado alcanzar esta meta. Por otro lado, quiero agradecer a Antonio León, PhD por su guía y consejos durante la elaboración de este proyecto. Por último, a los miembros del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco: Noelia Barriga, Karen Herrera y Darío Ramírez por su ayuda y compañía.

## RESUMEN

El sector florícola en el Ecuador representa la segunda fuente de ingresos no petroleros para el país por lo que una correcta identificación y adecuados controles fitosanitarios de dichos cultivos es de vital importancia. El género *Alternaria* comprende a una serie de hongos saprofitos y patogénicos los cuales tienen un gran impacto en los cultivos de todo el mundo. Especies de *Alternaria* pueden ser encontradas en casi todo el mundo y debido a su gran rango de hospederos se los considera como patógenos generalistas. Por el momento, no se ha reportado la presencia de infecciones por parte del género *Alternaria* en cultivos de rosas de exportación. En esta investigación se demostrará que a pesar que las rosas no son un hospedero tradicional para *Alternaria alternata* y *Alternaria japonica*, estos pueden causar infección y es probable que sea confundida con infecciones de *Botrytis cinerea*, un patógeno ampliamente descrito en los cultivos de rosas y flores ornamentales. Para corroborar esta hipótesis, se realizaron ensayos de patogenicidad en botones de rosas de la variedad Vendela con dos aislados de *A.alternata* y dos aislados de *A. japonica* obtenidos de hojas de brócoli de plantas en haciendas brocoloreas de la provincia de Cotopaxi. Adicionalmente, se realizó la infección de hojas de brócoli con los mismos aislados como control. Los cuatro aislados fueron capaces de infectar tanto los botones de rosa como también las hojas de brócoli. De esta manera se evidencia que *A. alternata alternata* y *A.japonica* aislados de brócoli pueden estar causando infecciones en rosas, indicando un cambio de hospedero.

**Palabras clave:** Patogénico, saprofito, regiones ITS, bioensayos, patógenos generalistas.

## ABSTRACT

The flower sector in Ecuador represents the second non-oil related income source for the state that's why a correct identification and control of the pathogens for these crops is important. The genre *Alternaria* comprehends a series of saprophytic and pathogenic fungi that have a great impact in crops all over the world. *Alternaria* species can be found in almost all over the world and because their great range of host they are considered as generalists pathogens. At the moment, it hasn't been reported the presence of *Alternaria* infections in rose crops. In this investigation I'll prove that despite the roses are not a common host for *Alternaria alternata* and *Alternaria japonica* they can cause infection and it is likely that it's mistaken for *Botrytis cinerea* infections, a widely known rose pathogen.

To prove the hypothesis, pathogenicity bioassays in rose petals of the variety Vendela with two isolates of *Alternaria alternata* and *Alternaria japonica* obtained from broccoli leaves from broccoli farms of the Cotopaxi province were performed. Additionally, bioassays in broccoli leaves were also performed with the same isolates as control. The four isolates were capable of infecting rose petals and broccoli leaves as well. Proving that the isolates: *Alternaria alternata* and *Alternaria japonica* might be infecting roses indicating a host shift.

**Key words:** Pathogenic, saprophytic, ITS regions, bioassays, generalist pathogens.

## TABLA DE CONTENIDO

Agradecimientos .....	4
Introducción .....	11
Sector Florícola en el Ecuador .....	11
Plagas y Enfermedades de las Rosas .....	12
Sector Brocolero en el Ecuador .....	13
Plagas y Enfermedades de las Brassicaceas .....	13
Generalidades del Género <i>Alternaria</i> .....	15
.....	15
Factores que influyen en la infección de <i>Alternaria</i> .....	16
Mecanismos de Control de <i>Alternaria</i> .....	17
Mecanismos de Identificación de Patógenos en cultivos agrícolas. ....	17
Justificación .....	19
Área de estudio .....	20
Objetivos .....	21
Objetivo General .....	21
Objetivos Específicos.....	21
Materiales.....	22
Recolección del Material Vegetal para el Aislamiento del Patógeno .....	22
Preparación del Medio de Cultivo .....	22
Desinfección del Material Vegetal.....	23
Cultivo del material vegetal en medio PDA .....	23
Identificación microscópica de <i>Alternaria</i> spp .....	23
Preparación del Inóculo de <i>Alternaria</i> spp, <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium</i> spp .....	24
Preparación de los Bioensayos en rosas y brócoli con los inóculos de <i>Alternaria</i> spp, <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium</i> spp.....	24
Extracción de ADN genómico de <i>Alternaria</i> spp.....	26
Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	27
Purificación del producto de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas .....	27
Secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas .....	27
MÉTODOS .....	28
Recolección del material vegetal para el aislamiento del patógeno .....	28
Aislamiento de <i>Alternaria</i> spp a partir del material vegetal .....	28
Desinfección del material vegetal.....	28
Cultivo del material vegetal en medio PDA. ....	29
Identificación microscópica de <i>Alternaria</i> spp.....	29
Preparación del inóculo de <i>Alternaria</i> spp, <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium</i> spp.....	29
Preparación de los bioensayos o pruebas de patogenicidad en rosas y brócoli con los inóculos de <i>Alternaria</i> spp, <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium</i> spp. ....	30
Análisis estadístico de los bioensayos en rosas y brócoli con los inóculos de <i>Alternaria</i> spp, <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Fusarium</i> spp.....	31

Extracción de ADN genómico de <i>Alternaria</i> spp. ....	31
Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). ....	32
Purificación y secuenciación del producto de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas.....	33
RESULTADOS.....	34
Aislamiento e Identificación del Fitopatógeno <i>Alternaria</i> spp.....	34
Caracterización molecular del fitopatógeno .....	35
Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.....	36
Secuenciación y análisis de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.....	36
Bioensayos y análisis de Patogenicidad de <i>Alternaria alternata</i> y <i>Alternaria japonica</i> sobre botones de rosa y brócoli.....	38
Discusiones .....	43
Conclusiones .....	50
Recomendaciones .....	51
Bibliografía .....	52



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones ITS de hongos. ..	32
Tabla 2: Protocolo empleado para la PCR de las regiones ITS del ARN ribosomal 5.8s de hongos. ....	33
Tabla 3: Se muestran los resultados una vez que las secuencias de ADN han sido analizadas se generó una secuencia consenso de la región ITS1 e ITS4 para cada aislado y las secuencias fueron introducidas en el programa bioinformático BLAST .....	37
Tabla 4: Estadística descriptiva de las mediciones de la infección de los diferentes ensayos sobre los pétalos de rosas en el día 5 del experimento (Herrera, 2016).....	58
Tabla 5: Estadística descriptiva de las mediciones de la infección de los diferentes ensayos sobre las hojas de brócoli en el día 5 del experimento (Herrera, 2016).....	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ilustración de la estructura de las conidias del género <i>Alternaria</i> (Woudenberg & al, 2013).....	15
Figura 2: Cultivo de los 4 aislados de <i>Alternaria</i> spp en medio PDA y observación microscópica de las conidias. A-H observación macroscópica de los aislados; I-L observación microscópica. ....	35
Figura 3: Gel de agarosa al 2% donde se visualizan las regiones ITS amplificadas de los 4 aislados de <i>Alternaria</i> spp por duplicado: se espera que las bandas obtenidas tengan un tamaño de 600pb aproximadamente.....	36
Figura 4: Fragmento de un cromatogramas de la región ITS1 del ADN ribosomal 5.8S del fitopatógeno desde 250pb hasta 340pb (Herrera, 2016). ....	36
Figura 5: Comparación entre los bioensayos de patogenicidad de aislados de <i>Alternaria japonica</i> y <i>Alternaria alternata</i> sobre botones de rosa y hojas de brócoli, además del control <i>Botrytis cinerea</i> y medio PDB .....	39
Figura 6: Gráfica de barras de evaluación de crecimiento por días del halo de infección sobre pétalos de rosa de: <i>A. Japonica</i> (cepa 1 y 2), <i>A. alternara</i> (cepa 3 y 4) <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Fusarium</i> spp, <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , y medio PDB en el día. Se muestra la desviación estándar en las barras. Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tuckey. ....	41
Figura 7: Gráfica de barras de evaluación de crecimiento por días del halo de infección sobre hojas de brócoli de: <i>A. Japonica</i> (cepa 1 y 2), <i>A. alternara</i> (cepa 3 y 4) <i>Botrytis cinerea</i> , y medio PDB en el día. Se muestra la desviación estándar en las barras. Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tuckey. ....	42

# INTRODUCCIÓN

## Sector Florícola en el Ecuador

En el Ecuador el sector florícola se ha convertido en la segunda fuente de ingresos no petroleros, con una renta anual de aproximadamente \$700 millones según estadísticas del año 2014 (Infoagro, 2014). El Ecuador es uno de los países que cuenta con la mayor diversidad de oferta de flores, en donde el producto estrella son las rosas (PROECUADOR, 2013). El mercado ecuatoriano oferta aproximadamente 250 variedades de rosas además flores de verano, flores tropicales, claveles, entre otros (PROECUADOR, 2013). Dentro de la década comprendida entre el 2002 y el 2012 las exportaciones de flores del país han tenido un crecimiento del 11.21% donde los principales mercados son: Estados Unidos con un 38%, seguido por Rusia y la Unión Europea con un 30%, dejando al resto del mercado distribuido a compradores pequeños (Expoflores, 2014).

En el territorio ecuatoriano para el año 2013 se contabilizaron 571 fincas que cubrían una extensión aproximada de 4000 hectáreas distribuidas a lo largo de la región Sierra pero concentrándose mayoritariamente en las provincias de Pichincha y Cotopaxi (Infoagro, 2014). Las condiciones naturales presentes en dichas provincias y en la mayoría de la sierra ecuatoriana permiten que el cultivo de flores, y especialmente de rosas, sea tan exitoso. Entre estas ventajas están: 12 horas de luz todo el año, temperaturas de cultivo adecuadas entre los 15 y 25°C con una fluctuación de +/- 1°C al año, abundantes cantidades de agua, entre otras (Expoflores, 2014). La suma de estas características permite a las flores desarrollar características apetecidas en los mercados como son: su color, tamaño del botón, largo del tallo y textura del pétalo (FLACSO y MIPRO, 2015).

## Plagas y Enfermedades de las Rosas

Entre los principales problemas en el cultivo de *Rosa* sp. dentro del sector florícola en general, se encuentra la gran cantidad de plagas y enfermedades que pueden afectar al producto final. Entre las principales plagas y enfermedades de las rosas se encuentran: la araña roja, los pulgones, el mildiu veloso, y por sobre todo *Botrytis cinerea*. La araña roja o *Tetranychus urticae* es un artrópodo que se desarrolla cuando existe una baja de humedad en el ambiente y temperaturas elevadas. Una planta infectada por esta araña presenta manchas finas o punteadas de color amarillo o blanco en las hojas, además de presentar telarañas en el envés de las mismas lo que ocasiona la pérdida de hojas (Caiza, 2013). Por otro lado, los pulgones o *Macrosiphum rosae* se desarrollan en ambientes secos y calurosos, esta plaga ataca a hoja, y a los tallos jóvenes además de brotes de yemas florales lo que produce una coloración amarillenta en las partes infectadas (Arcos, 2011). En tercer lugar, el mildiu veloso o tizón (*Peronospora sparsa*) se desarrolla en ambientes en donde la humedad supera el 50% y con temperaturas que oscilan entre los 25-30°C. Esta enfermedad provoca manchas irregulares de color morado o café en el haz de las hojas, tallos, peciolo y demás partes de la planta, además que puede ocurrir una rápida defoliación de la misma (Caiza, 2013).

*Botrytis cinerea* es una de las enfermedades que más pérdidas causa en los cultivos de rosas, especialmente en procesos de pos-cosecha y distribución. Es un hongo fitopatógeno y necrótrfico que afecta un estimado de 200 plantas de interés comercial (Martinis, 2013). La infección de *B. cinerea* se manifiesta como manchas pardas en hojas y botones, además impide la apertura de los botones, pérdida de la coloración natural, caída de hojas y desecamiento de la planta mayor parte de las especies del género *Botrytis* pueden ser encontradas en regiones tropicales y subtropicales (Díaz, 2012). Las conidias de *Botrytis* se

liberan fácilmente cuando existe un ambiente húmedo y son esparcidas por el viento. Una vez que las conidias comienzan a desarrollarse en la planta huésped se produce la muerte celular debido a la liberación de compuestos tóxicos por parte del patógeno (Van Kan, 2005). Los tejidos senescentes son especialmente susceptibles a ser atacados por *Botrytis*, además que ciertas condiciones ambientales deben estar presentes para que se da la infección como son: una alta humedad relativa, temperaturas entre 15-25°C y heridas en los tejidos de la planta (Van Kan, 2005).

### **Sector Brocolero en el Ecuador**

Se estima que el origen del brócoli (*Brassica oleracea* var. itálica), como el de la gran mayoría de las especies del género *Brassica*, es cerca de oriente medio o del oeste de Europa de clima mediterráneo (Fernández, 2012). Esta planta es de tipo anual, como un color verde azulado y una cabeza conformada por una masa compacta de botones florales (Fernández, 2012). En el año 2009 la producción mundial de brócoli fue de más de 21 millones de toneladas donde el principal exportador fue España con un 24.51% del mercado y ubicando al Ecuador séptimo con un 5.03% (CORPEI, 2009) . Según reportes de la FLACSO y el MIPRO el brócoli se desarrolla en condiciones óptimas en los valles interandinos de la sierra ecuatoriana donde los climas moderados y gran humedad permiten su desarrollo (FLACSO y MIPRO, 2015). La producción total de brócoli en el Ecuador en el año 2012 fue de 70 mil toneladas con una tasa de crecimiento de 3.85% anual, siendo uno de los productos de exportación no tradicionales estrella en el país. La superficie cosechada de brócoli en el Ecuador para el año 2012 fue de 3693 ha, concentrándose en un 82% en las provincias de Pichincha y Cotopaxi, siendo esta última la más productiva con 1919 ha de cultivo (MAGAP, 2013).

### **Plagas y Enfermedades de las Brassicaceas**

Los cultivos de Brassicaceas, familia donde se encuentra el brócoli, se ven afectados por una gran variedad de plagas y enfermedades por bacterias, virus, nemátodos y hongos (CLEMENSON, 2002). Las enfermedades bacterianas están causadas en su mayoría por *Pseudomonas*, *Xanthomona* y *Streptomyces* las cuales son bacterias halladas comúnmente en suelos donde el material vegetal de las cosechas pasadas no ha sido recolectado en su totalidad y sirve como fuente de inóculo. Los síntomas son similares entre ellas pero destacan manchas de color amarillo y negro en las hojas e inflorescencias, además de un lento crecimiento de la planta y una textura gelatinosa en las hojas (Conn, 2013).

Las enfermedades por virus en los cultivos de la familia de las Brassicaceas son muy comunes. El más conocido es el Virus Mosaico de la Coliflor (CaMV) el cual produce una clorosis a lo largo de las venas de las hojas además del apareamiento de lesiones necróticas foliares (CLEMENSON, 2002). Otros virus como el Virus Mosaico del Rábano (TuMR) y del Nabo (TuMV) también producen enfermedades de interés en cultivos de Brassicaceas aunque en una menor magnitud en cultivos de brócoli (Conn, 2013).

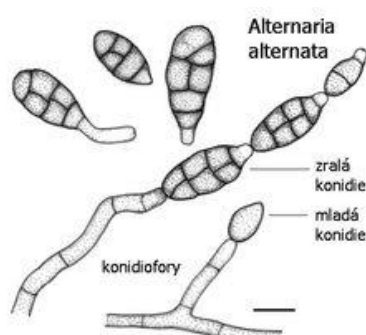
Las enfermedades por nemátodos también causan significativas pérdidas en los cultivos de Brassicaceas. Entre los principales nematodos parásitos están *Heterodera cruciferae* y *Meloidogyne* spp los cuales causan síntomas similares entre ellas en las plantas como son un crecimiento lento, hojas curvadas y raíces completamente infectadas con nódulos llenos de nemátodos (Conn, 2013).

Por último, las enfermedades por hongos en la familia de las Brassicaceas generan las mayores pérdidas en este tipo de cultivos siendo las infecciones por el género *Alternaria* las de mayor importancia (Conn, 2013). Estas enfermedades se caracterizan por causar manchas en tejidos viejos que generalmente comienza con una pequeña lesión circular. Estas lesiones se expanden y desarrollan anillos concéntricos con halos cloróticos. En condiciones de alta humedad en el centro del halo necrótico se forma una masa de esporas que pueden ser

esparcidas fácilmente por el viento (CLEMENSON, 2002). Una vez que la enfermedad se ha arraigado en el cultivo se estima que las pérdidas pueden llegar a ser superiores al 50%, además que las lesiones no están limitadas a las hojas sino que pueden encontrarse en todas las partes de la planta. La principal fuente de inóculo del género *Alternaria* en cultivos de Brassicaceas son residuos del cultivo anterior que pueden llegar a sobrevivir hasta dos años en condiciones de latencia, además que las conidias pueden fácilmente ser transportadas por el viento y agua (Bart & Thomma, 2003).

### Generalidades del Género *Alternaria*

El género *Alternaria* comprende a una serie de hongos saprofitos y patógenos de plantas, como *Alternaria brassicicola*, *Alternaria japonica* y *Alternaria alternata*. Cuando *Alternaria* ataca a sus hospedadores, morfológicamente produce una serie de anillos concéntricos alrededor del sitio inicial de ataque lo que ocasiona un foco de entrada para *Alternaria* causando la enfermedad de tizón temprano o “*early blight*” en una serie de cultivos (Mamgain, 2013). Las especies de este género son sumamente cosmopolitas y pueden sobrevivir tanto como saprofitas como parásitos débiles en el interior de planta. El género *Alternaria* se caracteriza por la formación de conidios polimórficos ya sean individuales o en cadenas cortas o largas, las cuales pueden ser transportadas por el aire, agua y permanecer en latencia en el suelo (Pattanamahakul, 1999). Las conidias son de forma alargada, pequeñas y segmentadas, de forma elipsoide y septadas. El cuerpo de las conidias puede estrecharse gradualmente hasta alcanzar la forma de un pico cónico (Woudenberg & al., 2013)



**Figura 1:** Ilustración de la estructura de las conidias del género *Alternaria* (Woudenberg & al, 2013)

### **Factores que influyen en la infección de *Alternaria***

Los factores más importantes que influyen en la infección de *Alternaria* en los cultivos es una humedad alta, mayor al 50%, y una temperatura que oscile entre los 20-27°C. Sin embargo, otros factores que generan susceptibilidad son la presencia de tejidos senescentes, tejidos con quemaduras solares, daños por heladas, heridas, daños por el viento o insectos, entre otros. (Conn, 2013).

### **Ciclo de infección de *Alternaria***

*Alternaria* puede transmitirse tanto en las semillas, suelos y por acción del viento. Las semillas pueden estar contaminadas en su cubierta exterior o estar infectadas internamente. Estas conidias pueden permanecer viables por un período de hasta dos años, además las conidias pueden ser llevadas por el viento distancias considerables (Gorny, 2012). Sin embargo, y como se mencionó anteriormente la fuente más común de infección es material vegetal infectado en el suelo. Una vez que las conidias entran en contacto con la superficie de la planta huésped se da la germinación de la conidias cuando existen las condiciones adecuadas de humedad y temperatura (Conn, 2013).

Una vez que las conidias han germinado comienza la penetración dentro de los tejidos de la planta. En el caso de *Alternaria*, al ser un hongo necrótico que mata y absorbe los nutrientes de los tejidos muertos de la planta su mecanismo de patogénesis puede ser descrito en dos pasos: el primero es la muerte de las células de la planta hospedadora mediante la inyección de toxinas para subsecuentemente poder romper los tejidos muertos con una serie de enzimas por ejemplo: melanina, enzimas cutinolíticas, enzimas citotóxicas, inhibidores de la división celular, entre otras (Cho, 2015).

### **Métodos de aislamiento y propagación de *Alternaria in vitro***

*Alternaria* es un género de hongos que causa grandes pérdidas a nivel mundial. A pesar de esto, no existe un medio de cultivo selectivo para este hongo (Mamgain, 2013). Un medio de



cultivo es una sustancia o solución que cuenta con los nutrientes esenciales para que un microorganismo se desarrolle (Zhu, 2010). En el caso de hongos, el medio de cultivo debe contener fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, vitaminas y oligoelementos. Además, el pH debe ser de 7 o ligeramente ácido. Por otro lado, se debe incluir sustancias que inhiban el crecimiento de microorganismos no deseados como bacterias y levaduras. El medio de cultivo más utilizado para el aislamiento y cultivo de *Alternaria* es el medio PDA (potato dextrose agar) (Nicot, 2013). Sin embargo, cada autor propone modificaciones al mismo dependiendo de las condiciones experimentales.

### **Mecanismos de Control de *Alternaria***

Debido a que *Alternaria* es un patógeno que genera importantes pérdidas económicas se han desarrollado una serie de métodos para su control en los cultivos agrícolas. El método tradicional y más efectivo para el control y erradicación del patógeno es el método químico mediante fungicidas. Existen una serie de fungicidas en el mercado que resultan en la obtención de cultivos libres de *Alternaria* los cuales son: cimoxanilo, folpet, fosetil Aluminio. Oxiclورو de cobre, Mancozeb. No obstante, es muy importante conocer la especie de *Alternaria* con la cual se está lidiando, ya que cada especie responde diferente a los tratamientos químicos (CLEMENSEN, 2002).

Existen métodos de prevención como la siembra de variedades de cultivos resistentes a *Alternaria* además que se debe eliminar los residuos de variedades susceptibles en el suelo. El tratamiento de las semillas es también una estrategia de prevención, donde las semillas son sometidas a un baño en agua a 50°C por 30min o son colocadas en soluciones de fungicidas (Ellis, 1968)

### **Mecanismos de Identificación de Patógenos en cultivos agrícolas.**

La identificación de patógenos en los cultivos agrícolas es de vital importancia para garantizar un buen manejo agrícola de la enfermedad y evitar pérdidas económicas. Los métodos tradicionales para la identificación de patógenos consisten en la observación de la planta en busca de síntomas o anomalías. Una vez que se han detectado posibles patógenos, para confirmar se procede con pruebas de laboratorio donde se cultiva el material vegetal infectado hasta lograr aislar el patógeno en medios de cultivo *invitro* y mediante microscopía se lo identifica. Sin embargo, existen nuevas técnicas que permiten una identificación más rápida y precisa del patógeno en los cultivos (Ristaino & al, 1998).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) consiste en la amplificación *in vitro* de regiones de ADN para su posterior análisis. Estas regiones posteriormente deberán ser analizadas en detalle para conocer la identidad del patógeno. La hibridación fluorescente *in situ* se utiliza ampliamente para la identificación de patógenos, esta consiste en colocar una sonda complementaria al RNAr del patógeno (Fang & Ramasamy, 2015). Si la sonda se ha hibridado completamente esta desprende fluorescencia que será detectada mediante un escáner. Por otro lado, las pruebas de ELISA son otras pruebas de diagnóstico de patógenos en cultivos basada en anticuerpos y cambios de color en el ensayo. Se generan anticuerpos específicos contra el patógeno en cuestión, cuando estos anticuerpos se unen a las proteínas del patógeno o antígenos se desprende un color que puede ser medido en equipos especializados (Clement & al, 2011).

## JUSTIFICACIÓN

La industria de las flores en el Ecuador es de suma importancia ya que después del banano es la segunda fuente de ingresos no petroleros, por lo que una correcta identificación de las plagas y enfermedades que afecta su cultivo, es necesaria para un correcto manejo agrícola. Por otro lado, el Ecuador es el séptimo exportador de brócoli a nivel mundial por lo que el control efectivo de sus plagas enfermedades es de suma importancia (FLACSO y MIPRO, 2015) . En esta investigación se probará que especies del género *Alternaria* son capaces de moverse tanto entre cultivos de rosas y brócolis suponiendo un potencial perjuicio para ambos sectores.

*Alternaria* es un género de patógenos el cual en rosas no ha sido reportado como hospedero. Sin embargo, se ha visto un posible cambio de hospedador el patógeno hacia cultivos de rosas en la provincia de Cotopaxi en la Sierra ecuatoriana. Esto pudo observarse en el trabajo de investigación de Bermudez en 2013 donde se logró aislar exitosamente *Alternaria* spp. a partir de botones de rosa indicando una posible infección (Bermúdez, 2013).

El cambio de hospedador de este patógeno significaría que habría que reconsiderar el manejo de enfermedades en las florícolas cercanas a cultivos de brócoli para evitar bajas en el rendimiento de los cultivos. Una correcta identificación de los patógenos en los cultivos deriva en un mejor rendimiento de los mismos, además de reducción de pérdidas económicas y un menor uso de pesticidas (CORPEI, 2009).

Estudios acerca de nuevos patógenos en los cultivos en el Ecuador deberían considerarse una prioridad. El Ecuador es un país que depende en gran medida de la agricultura por lo que esta información no sólo ahorrará dinero ya que se evitarán pérdidas sino que permitirá al país ampliar su oferta de productos al mundo generando así nuevas rentas para el estado.

## **ÁREA DE ESTUDIO**

Las muestras para el estudio fueron recolectadas en las haciendas brocoleras Quisinche y Cumilinche, ubicadas en el sector de Mulaló, en la Parroquia Mulaló, cantón Latacunga-provincia de Cotopaxi. Por otro lado, todos los análisis de patogenicidad y moleculares de los aislados obtenidos del material vegetal fueron realizados dentro del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito, Cumbaya, Quito, Pichincha.

# OBJETIVOS

## Objetivo General.

Aislar, caracterizar molecularmente y analizar la patogenicidad de cepas de *Alternaria* spp. , sobre botones de rosa y plantas de brócoli para comprobar un posible cambio de hospedero.

## Objetivos Específicos

- Aislar e identificar por microscopia cepas de *Alternaria* spp de hojas de brócoli de cultivos en la provincia de Cotopaxi- Ecuador.
- Generar un protocolo de purificación de aislados de *Alternaria* spp para su posterior uso en análisis moleculares y de patogenicidad.
- Extraer ADN total de las cepas aisladas de *Alternaria* spp para posteriores análisis moleculares.
- Amplificar usando PCR y secuenciar la región ITS del ribosoma de los aislados de *Alternaria* spp.
- Identificar la especie de los aislados de *Alternaria* spp. por medio de la herramienta Basic Logical Alignment Search Tool (BLAST) (BLAST) del National Institute of Biotechnology (NCBI).
- Generar un protocolo de esporulación para los aislados de *Alternaria* spp para su uso en bioensayos de infección en botones de rosa y hojas de brócoli.
- Determinar el nivel de infección causado por los aislados de *Alternaria* spp en los botones de rosa y hojas de brócoli.

# MATERIALES

## **Recolección del Material Vegetal para el Aislamiento del Patógeno**

- Hojas de brócoli
- Tijeras metálicas
- Fundas plásticas estériles
- Rotuladores
- Alcohol al 70% v/v

## **Preparación del Medio de Cultivo**

- Medio de cultivo PDA, DIFCO™
- Frascos pírax
- Agitador magnético
- Agua destilada
- Plancha de calor BOECO MSH-420
- Gentamicina MK 160MG/2mL
- Autoclave MRC, modelo UTKBS-50LV
- Cajas Petri Plásticas

### **Desinfección del Material Vegetal**

- Explantes de hojas de brócoli
- Agua destilada estéril
- Solución de hipoclorito de sodio al 2.5% v/v
- Solución de etanol al 70% v/v
- Recipientes de vidrio estériles
- Pinzas estériles
- Autoclave MRC, modelo UTKBS-50LV

### **Cultivo del material vegetal en medio PDA**

- Explantes de material vegetal desinfectados
- Medio de cultivo PDA DIFCO™
- Cajas Petri
- Parafilm “M”®
- Pinzas estériles
- Incubadora INCUBATOR, modelo 6

### **Identificación microscópica de *Alternaria* spp**

- Microscopio marca Radical, modelo RXL-4T
- Porta y cubre objetos
- Azul de metileno
- Cinta adhesiva
- Micelio de la muestra

### **Preparación del Inóculo de *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium spp***

- Cámara de luz negra
- Medio de cultivo PDB, DIFCO™
- Cajas Petri con la muestra de hongo
- Azas triangulares estériles
- Embudos de cristal estériles
- Algodón estéril
- Tubos Eppendorf de 1ml
- Micropipeta de 1ml LABNET™
- Vórtex, marca *Scientific Industries Inc.*
- Microcentrífuga, marca Wisd Laboratory Instruments, modelo CF-10
- Cámara de Neubauer, marca BODECO
- Microscopio marca Radical, modelo RXL-4T
- Azul de metileno

### **Preparación de los Bioensayos en rosas y brócoli con los inóculos de *Alternaria spp*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium spp***



- 30 rosas por ensayo de la variedad *Vendela*
- Inóculo del hongo
- Micropipeta de 0,5-10 $\mu$ l, LABNET™
- Papel toalla
- Agua destilada estéril
- Fundas plásticas transparentes de 20cmx30cm
- Ligas de goma.

**Extracción de ADN genómico de *Alternaria* spp.**

- Papel filtro estéril
- Vasos de precipitación
- Morteros estériles
- Nitrógeno líquido
- Tubos Eppendorf de 1ml
- Buffer CTAB
- Cámara de baño maría, marca Fisher Scientific
- Solución de fenol:cloroformo:isoamilico (25:24:1)
- Centrífuga, marca Wisd Laboratory Instruments, modelo CF-10
- Solución de isopropanol al 98% v/v
- Solución de etanol al 70% v/v
- Agua destilada estéril.
- Nanodrop THERMO SCIENTIFIC 2000
- Blue Juice INVITROGEN©
- Gel de agarosa LE ANALYTICAL GRADE
- Buffer TAE1X
- SYBR® SAFE DNA
- Cámara electroforética ENDURO LABNET
- Foto documentador ENDURO™ GDS

**Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

- Buffer GO TAQ® INVITROGEN (10 X)
- MgCl<sub>2</sub> INVITROGEN® (25,0 mM)
- dNTPs (10mM) INVITROGEN®
- Primer ITS1 (10 pmol) INVITROGEN
- Primer ITS4 (10 pmol) INVITROGEN
- Taq DNA Polimerasa GO TAQ® INVITROGEN (5,0 U/μl)
- Microtubos de PCR QSP®
- Termociclador LABNET M MULTIGENE GRADIENT 1011020

**Purificación del producto de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas**

- Kit comercial PURELINK® GENOMIC DNA para purificación de ADN genómico (INVITROGEN®)
- THERMO SCIENTIFIC NANODROP 2000

**Secuenciación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas**

- Herramienta bioinformática BLAST
- Programa informático Mega 7

# MÉTODOS

## **Recolección del material vegetal para el aislamiento del patógeno**

Se recolectó hojas de brócoli que presentaban los síntomas clásicos de una infección por *Alternaria* spp. La recolección se realizó en las haciendas brocolera Quisinche y Cumilínche, ubicadas en el sector de Mulaló, en la Parroquia Mulaló, cantón Latacunga-provincia de Cotopaxi, con las siguientes coordenadas: longitud: 78°35'34.80" O y latitud: 0°48'11.33" S. Se tomaron un aproximad de 30 hojas infectadas por lote de terreno.

Las hojas que presentaban síntomas de infección por *Alternaria* fueron cortadas, colocadas en bolsas de plástico individuales previamente marcadas y transportadas en una hielera con geles de hielo para su preservación al laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos en la Universidad San Francisco de Quito.

## **Aislamiento de *Alternaria* spp a partir del material vegetal**

Durante la realización del proyecto se procedió a utilizar medio de cultivo PDA ya que es un medio general para hongos y se ha reportado un buen crecimiento de especies de *Alternaria* (Ellis, 1968). Se tomaron 49 gramos de medio y se lo disolvió en agua destilada. Posteriormente se autoclavó la mezcla a 121°C por 20 minutos. Posterior al proceso de autoclavado se colocó gentamicina, en una proporción de 160 mg/L de medio. El medio fue dispensado en cajas Petri plásticas y por último se agregó una gota de ácido láctico al 10% v/v al medio una vez solidificado.

## **Desinfección del material vegetal**

Las hojas colectadas en el campo se sometieron a un proceso de desinfección para lo cual se utilizó el protocolo desarrollado en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ. Brevemente, se cortó las hojas en pedazos de aproximadamente 5 mm por lado,

donde la mitad del explante presente lesión y la otra debe estar sana. Dentro de la cámara de flujo laminar se sumergen estas explantes en agua destilada estéril por un minuto. Los explantes fueron sumergidos en una solución de etanol al 70% v/v por 1 minuto, luego por 1 minuto en agua destilada estéril para eliminar residuos de etanol, posteriormente en la solución de hipoclorito de sodio por 1 minuto y finalmente por 2 minutos en agua destilada estéril. Los explantes una vez desinfectados estuvieron listos para ser sembrados en el medio PDA.

### **Cultivo del material vegetal en medio PDA.**

Los explantes previamente desinfectados deben ser colocados en el medio PDA. La mitad de cada explante debe introducirse dentro del medio dejando la otra mitad libre. La caja Petri debe ser sellada con doble cinta *parafilm* para evitar contaminación. Se deja incubar por a 30°C en una incubadora hasta que el hongo ya ha ocupado toda la superficie de la caja (aproximadamente 8 días) y se almacena a 4° hasta su posterior uso.

### **Identificación microscópica de *Alternaria* spp.**

Se utilizó una cinta adhesiva la cual se presiona ligeramente sobre el hongo deseado para que se logre pegar una pequeña cantidad de micelio y conidias. Posteriormente se coloca sobre un portaobjeto una gota de azul de metileno y sobre esta se pega la cinta adhesiva. La placa se observa en el microscopio en un aumento de 40X y mediante una clave se identifican los hongos presentes.

### **Preparación del inóculo de *Alternaria* spp, *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp**

Los hongos en medio PDA en cajas Petri fueron sometidos a luz negra dentro de la cámara por un período de 12 horas para asegurar su esporulación (**Shahin, 1978**).

Se colocó 3 ml de medio PDB autoclavado y con la ayuda de una aza triangular plástica estéril se raspó todo el micelio del hongo. La solución obtenida fue filtrada a través de un algodón estéril que se encontraba en un embudo de cristal estéril. Estas acciones se repitieron hasta que se obtuvo el máximo del inóculo posible de la caja Petri. El inóculo que se obtuvo fue colocado en un vórtex durante tres minutos. Y posteriormente centrifugado a 13000 rpm durante 5 minutos. Se extrajo la mayoría del sobrenadante dejando un poco de medio PDB y el hongo con el cuál se estaba trabajando. A partir de esta solución se realizó en conteo de conidias dentro de la cámara de Neubauer (Bastidas, 2008). A partir de este conteo se preparó un inóculo con al menos  $10^5$  conidias/ml (Saskia, 2013).

**Preparación de los bioensayos o pruebas de patogenicidad en rosas y brócoli con los inóculos de *Alternaria* spp, *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp.**

Se tomó con una micropipeta 5- $\mu$ l de la suspensión de conidias preparada anteriormente y se los colocaron en la parte central del pétalo en el caso de las rosas o sobre una hoja en el caso del brócoli. Mientras tanto se preparó una cámara húmeda colocando papel de cocina húmedo dentro de una funda plástica de 15cm x 30cm para crear una humedad relativa del 100%. Las rosas y las plantas de brócoli infectadas con el inóculo fueron colocadas dentro de la cámara húmeda por un período de 7 días en los cuales se evaluó la presencia o ausencia de infección, además del diámetro de crecimiento de la infección en el pétalo u hoja si es que existiese. El procedimiento se llevó a cabo con 30 rosas y 30 plantas de brócoli por inóculo de hongo obtenido (Saskia, 2013). El proceso de infección se realizó con todos los aislados de *Alternaria* además de los controles negativos (*Fusarium* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, y medio PDB) y el control positivo de *Botrytis cinerea*. Los controles negativos fueron utilizados para demostrar que los pétalos de rosa no son un medio adecuado de crecimiento para cualquier tipo de fitopatógeno o microbio de origen fúngico. Se midió los halos de

infección sobre los pétalos de rosa y hojas de brócoli cada 24 horas por 7 días usando un calibrador.

**Análisis estadístico de los bioensayos en rosas y brócoli con los inóculos de *Alternaria* spp, *Botrytis cinerea* y *Fusarium* spp.**

Los datos de las pruebas de patogenicidad o bioensayos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) para todos los días, y adicionalmente la una prueba de Tukey para comparación de las medias del día 5 usando el programa estadístico SPSS 22®.

**Extracción de ADN genómico de *Alternaria* spp.**

El hongo se inoculó en 50 ml de medio PDB a una temperatura de 27°C sin agitación durante 7 días, una vez transcurrido este tiempo se procedió a separar el micelio del medio PDB con la ayuda de un papel filtro estéril.

Para la extracción de ADN, se utilizó el método descrito por Colombo y colaboradores (1998), modificado por la Facultad de Química de la Universidad de Uruguay (2011).

El micelio del hongo se pulverizó en un mortero con ayuda de nitrógeno líquido. El material resultante se recolectó en un tubo de polipropileno de 1,5 ml de capacidad nominal con tapa clip. Se agregó 500 µl de CTAB y se incubó en baño maría a 65°C durante 1 hora. Luego, se añadió un volumen de 500 µl de la solución fenol:cloroformo: isoamílico en una proporción 25:24:1 respectivamente, y se centrifugó durante 10 minutos a 10000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo microtubo. Se añadieron 500µl de etanol frío al 98%. La muestra fue almacenada por 2 horas a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 100 µl de etanol al 70% por dos ocasiones. Se procedió a secar el Pellet durante 24 horas, dejando los microtubos boca abajo sobre un papel. El pellet fue re-suspendido con un volumen de 50 µl de agua de PCR. Se

agregaron 5 µl de la enzima RNAsa, y se incubó a 37°C por 1 hora. La muestra de ADN genómico se almacenó a -20°C hasta su utilización (Colombo, 1998).

Para corroborar la eficiencia de la extracción, se corrió un gel de agarosa al 1.5 %, adicionando 0.7 µl de Syber Green. Se depositó 2µl de la muestra en los pocillos del gel y se corrió en una cámara de electroforesis horizontal gel xL ENDURO Labnet a 80 voltios durante 45 minutos. Las muestras en el gel fueron visualizadas en el transiluminador WCV – M20 de luz ultravioleta.

### **Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

La amplificación mediante PCR convencional de las regiones ITS1, ITS4 y 5.8 ARN ribosomal, se realizó utilizando los primers universales ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC -3') (Hermosa, y otros, 2000). La técnica utilizada de amplificación fue estandarizada en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito según las condiciones que se detallan en las Tablas 1 y 2.

**Tabla 1:** Programa de PCR utilizado para la amplificación de las regiones ITS de hongos.

Programa	T°	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización previa	95 °C	5 minutos	
Desnaturalización	94 °C	1 minuto	} 35CICLOS
Hibridación	62.3°C	2 minutos	
Polimerización	72 °C	2 minutos	
Extensión Final	72 °C	10 minutos	
Reposo	10 °C	10 minutos	



**Tabla 2:** Protocolo empleado para la PCR de las regiones ITS del ARN ribosomal 5.8s de hongos.

<b>Reactivos</b>	<b>Volumen para 1x</b>
Buffer 10 X	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50mM	4 $\mu$ l
dNTPs(10mM)	2 $\mu$ l
Primer ITS1(10 $\mu$ mol)	2 $\mu$ l
Primer ITS4(10 $\mu$ mol)	2 $\mu$ l
Taq polimerasa	1 $\mu$ l
ADN 50ng/mL	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	32 $\mu$ l
Volumen total	50 $\mu$ l

**Purificación y secuenciación del producto de PCR de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8s amplificadas**

Los productos amplificados fueron purificados empleando el Kit de purificación de Intritrogen: *Pure Gel Extraction & PCR Purification Combo Kit* siguiendo las indicaciones del fabricante. Ver Anexo 1.

Se midió la concentración de DNA de las muestras amplificadas mediante el uso del Nanodrop Thermo Scientific 2000. Las muestras fueron empacadas y enviadas a la compañía *Macrogen* (Seúl, Corea del Sur) para su secuenciación.

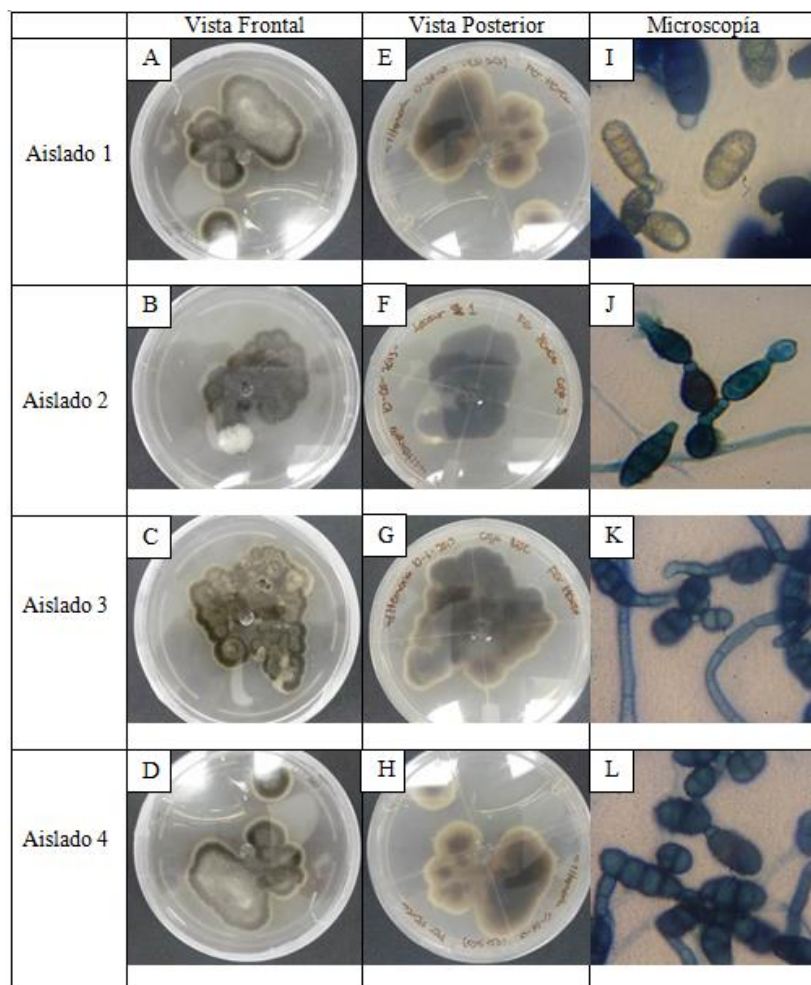
Las secuencias recibidas de la región ITS1 e ITS4 del ADN ribosomal 5.8S fueron alineadas en programa Mega 7© y se generó una secuencia consenso la cual fue analizada en la base de datos del NCBI© con la herramienta BLAST la cual arrojó la identidad de los aislados.

## RESULTADOS

### **Aislamiento e Identificación del Fitopatógeno *Alternaria* spp.**

Luego del proceso de aislamiento, se obtuvieron cuatro aislados con colonias de tipo compacta, afelpadas y filamentosas de borde irregular. En la parte frontal de la caja Petri se observó una coloración verde con filamentos de color blanco (Fig. 1 A-D). Mientras que en el reverso de la caja petri se observó un color mucho más oscuro (Fig. 1 E-H). Por otro lado, las conidias fueron teñidas con azul de metileno y se presentan una forma alargada con segmentaciones horizontales como verticales (Fig. 1 I-L). Lo cual concuerda con lo esperado para especies de *Alternaria* (Ellis, 1968).

Se encontraron conidias de forma alargada, pequeñas y segmentadas, de forma elipsoide y septadas. El cuerpo de las conidias puede estrecharse gradualmente hasta alcanzar la forma de un pico cónico (Woudenberg & al., 2013). Esto concuerda con la descripción para el género *Alternaria* descrita en el estudio de Woudenberg & al (2013). Como se puede observar en la Figura 1 por lo que se identificó a los aislados como pertenecientes al género *Alternaria*.



**Figura 2:** Cultivo de los 4 aislados de *Alternaria* spp en medio PDA y observación microscópica de las conidias. A-H observación macroscópica de los aislados; I-L observación microscópica.

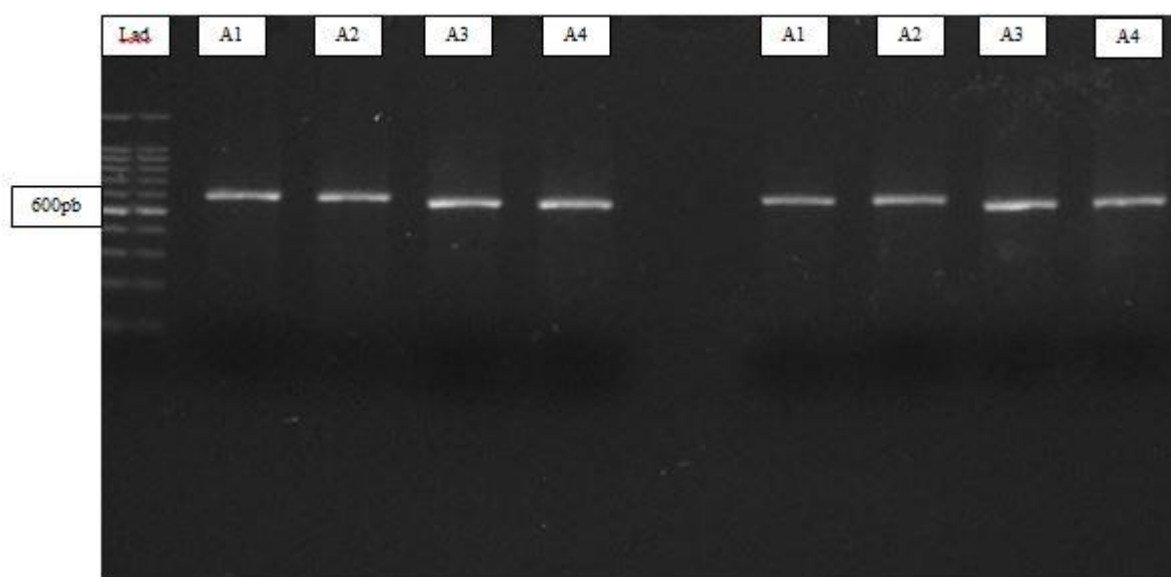
### Caracterización molecular del fitopatógeno

Una vez realizada la extracción de ADN de los aislados de *Alternaria* spp, se visualizó las muestras en un gel de agarosa al 1.5% para verificar la integridad del ADN. A su vez los productos de extracción de ADN fueron cuantificados empleando el Nanodrop (ThermoScientific 2000 ©). Luego de esto se diluyeron hasta obtener una concentración de

50ng/μl, que es la concentración recomendada para la amplificación de las regiones ITS. (Salgado, 2011)

### Amplificación de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S.

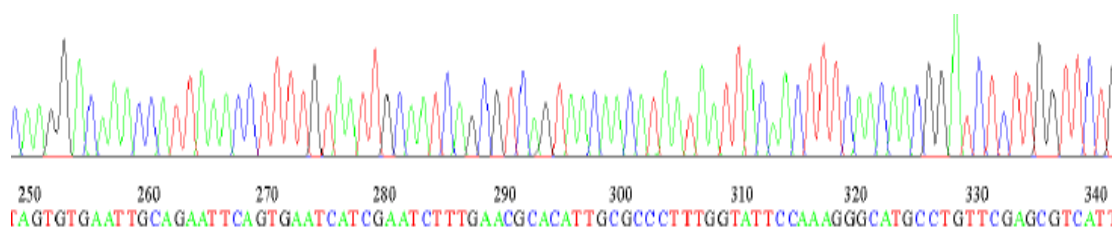
Todos los productos amplificados se visualizaron en gel de agarosa al 2 %, y se obtuvieron bandas de 600 pb (Fig. 5), De acuerdo al protocolo estandarizado en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ



**Figura 3:** Gel de agarosa al 2% donde se visualizan las regiones ITS amplificadas de los 4 aislados de *Alternaria* spp por duplicado: se espera que las bandas obtenidas tengan un tamaño de 600pb aproximadamente.

### Secuenciación y análisis de las regiones ITS del ADN ribosomal 5.8S

Los productos amplificados de la región ITS fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Los cromatogramas completos se encuentran en el Anexo C.



**Figura 4:** Fragmento de un cromatogramas de la región ITS1 del ADN ribosomal 5.8S del fitopatógeno desde 250pb hasta 340pb (Herrera, 2016).

Las secuencias recibidas fueron editadas, se eliminó el ruido generado durante la secuenciación generalmente al inicio y al final, y las secuencias resultantes (lado izquierdo y derecho) fueron alineadas con la ayuda del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). La secuencia consenso obtenida fue introducida en el mismo programa para conseguir la identificación a nivel de especie, en base al porcentaje de similitud con las secuencias de los organismos que se encuentran en la base de datos del Gen Bank de la NCBI. En la Tabla 5 se muestran los resultados de la secuenciación una vez que se ha quitado el ruido y las secuencias fueron introducidas en el programa BLAST.













**Tabla 3:** Se muestran los resultados una vez que las secuencias de ADN han sido analizadas se generó una secuencia consenso de la región ITS1 e ITS4 para cada aislado y las secuencias fueron introducidas en el programa bioinformático BLAST

Aislado	Región Amplificada	Resultado del Secuenciamiento	Max SCORE	Total Score	Query Cover	E-value	Ident	Accesion
Aislado 1	Región ITS1 e ITS4	<i>Alternaria japonica</i>	623	623	100%	1,00E-174	98%	AY154703.1
Aislado 2	Región ITS1 e ITS4	<i>Alternaria japonica</i>	623	1014	98%	0.0	99%	AY154703.1
Aislado 3	Región ITS1 e ITS4	<i>Alternaria alternata</i>	584	682	97%	0.0	99%	KU645989.1
Aislado 4	Región ITS1 e ITS4	<i>Alternaria alternata</i>	623	623	94%	1,00E-174	99%	KU645989.1

**Bioensayos y análisis de Patogenicidad de *Alternaria alternata* y *Alternaria japonica* sobre botones de rosa y brócoli.**

Una vez que se obtuvieron los cultivos de puros de *Alternaria alternata* y *Alternaria japonica* spp se procedió a la preparación de los inóculos de los aislados de *Alternaria*. Como controles se utilizó: *Botrytis cinerea*, control positivo, *Fusarium* spp y *Saccharomyces cerevisiae*, control negativo, como se describe en la sección de métodos. Los aislados de *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp y *Saccharomyces cerevisiae* fueron conseguidos de aislados almacenados en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito de estudios anteriores. Estos aislados fueran previamente identificados molecularmente.

Los bioensayos fueron realizados inoculando 5 µl del inóculo sobre pétalos de rosa sanos, y hojas de brócoli, además se inoculó 5 µl de medio PDB como blanco. Se midió el diámetro de los halos de infección sobre los pétalos de rosa y las hojas de brócoli durante 7 días. Se muestran únicamente los datos del día 5 debido a que se podía observar y medir de mejor manera los halos de infección, además que transcurrido el día 5 el control positivo de *Botrytis cinerea* invadía el pétalo completo imposibilitando una correcta medición. En la Figura 2 se pueden observar las lesiones producidas por las 2 diferentes especies de *Alternaria* como también el control positivo de *Botrytis* y el control negativo de medio PDB.

Inóculos de <i>Alternaria japonica</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y medio PDB sobre botones de rosa					
Aislado 1 <i>A.japonica</i>	Aislado 2 <i>A. japonica</i>	Aislado 3 <i>A.alternata</i>	Aislado 3 <i>A.alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	PDB
					
Inóculos de <i>Alternaria japonica</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Botrytis cinerea</i> y medio PDB sobre hojas de brócoli					
Aislado 1 <i>A.japonica</i>	Aislado 2 <i>A. japonica</i>	Aislado 3 <i>A.alternata</i>	Aislado 3 <i>A.alternata</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	PDB
					

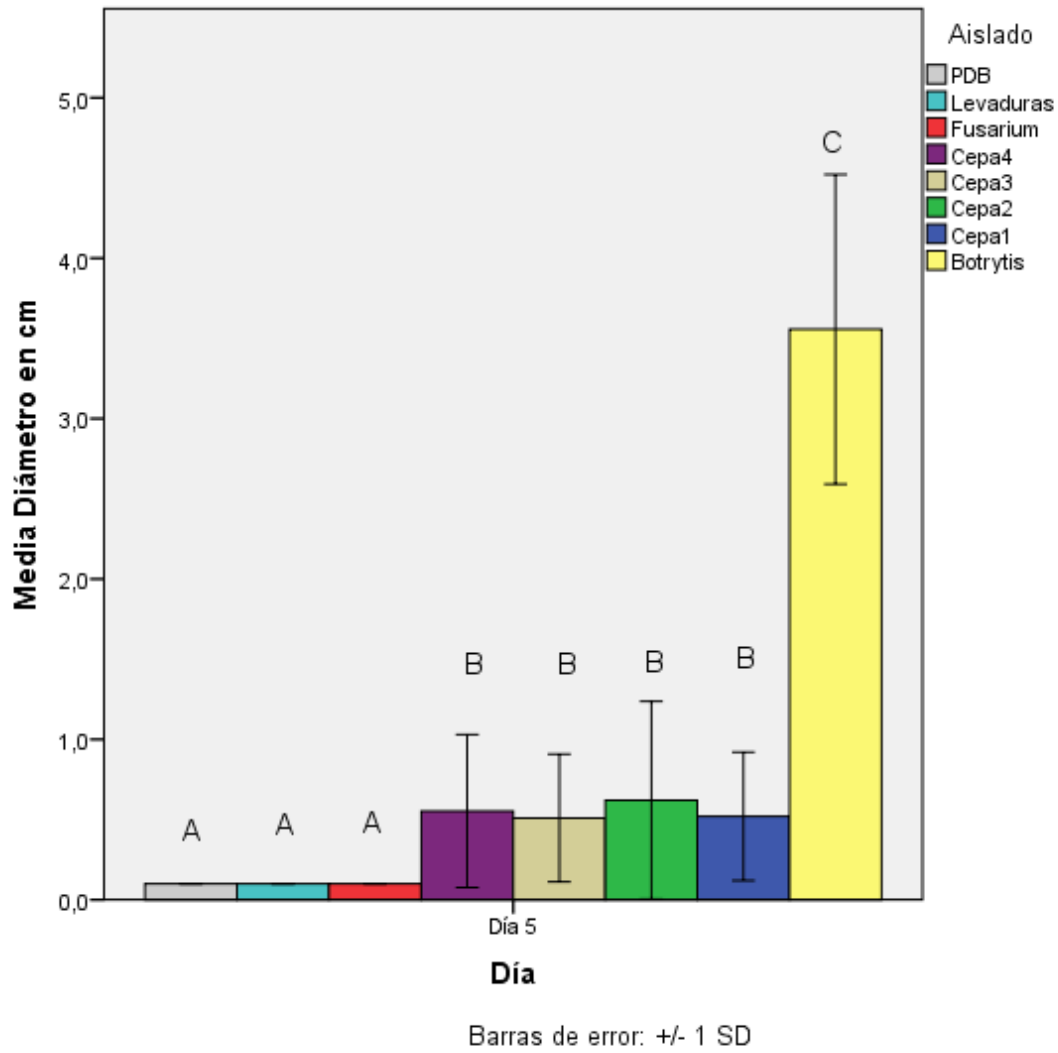
**Figura 5:** Comparación entre los bioensayos de patogenicidad de aislados de *Alternaria japonica* y *Alternaria alternata* sobre botones de rosa y hojas de brócoli, además del control *Botrytis cinerea* y medio PDB

Para el día 5, el diámetro promedio de los controles negativos (PDB y *Fusarium* spp.) tanto en botones de rosa como en plantas de brócoli fue de 0 cm demostrando que los pétalos de rosa no son medios de cultivo aptos para todos los hongos patogénicos. Los diámetros promedio de infección para cada aislado y el control positivo (*Botrytis*) pueden observarse en el Anexo 2.

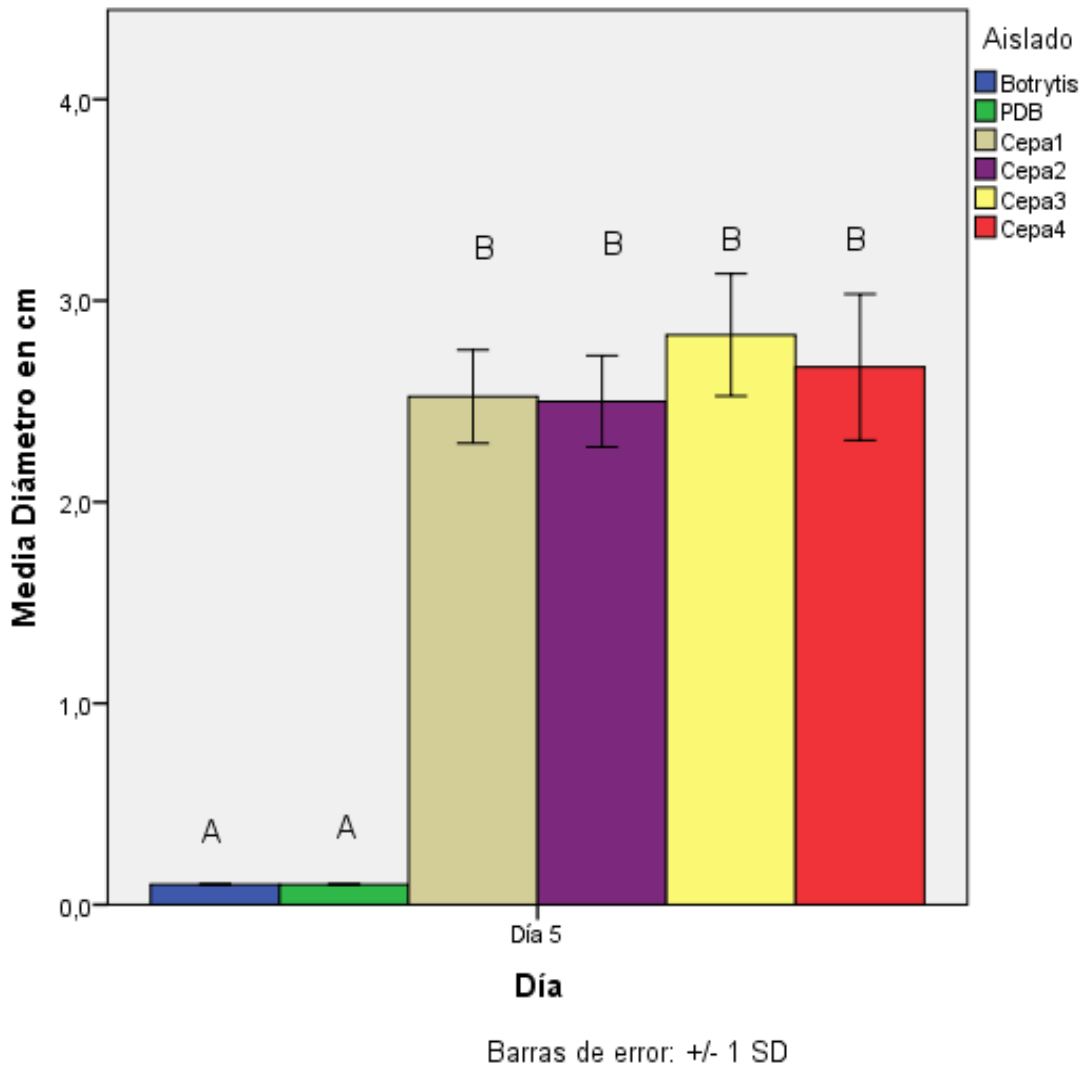
Se realizó una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey al 5% mediante el programa es SPSS © 22 donde se compararon las medias de los halos de infección para cada aislado y los controles tanto para los botones de rosa como para las plantas de brócoli.

Se compararon las medias de los diámetros de infección para los ensayos con botones de rosas y con plantas de brócoli y se los presentó en forma de gráficas de barras como se puede observar en la Figuras 3 y 4 respectivamente. Las letras A, B, y C en las gráficas representan que dichos conjuntos de barras son estadísticamente iguales.





**Figura 6:** Gráfica de barras de evaluación de crecimiento por días del halo de infección sobre pétalos de rosa de: *A. Japonica* (cepa 1 y 2), *A. alternara* (cepa 3 y 4) *Botrytis cinerea*, *Fusarium* spp, *Saccharomyces cerevisiae*, y medio PDB en el día. Se muestra la desviación estándar en las barras. Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tuckey.



**Figura 7:** Gráfica de barras de evaluación de crecimiento por días del halo de infección sobre hojas de brócoli de: *A. Japonica* (cepa 1 y 2), *A. alternara* (cepa 3 y 4) *Botrytis cinerea*, y medio PDB en el día. Se muestra la desviación estándar en las barras. Medias seguidas por las mismas letras no difieren entre sí al 5% de probabilidad por la prueba de Tuckey.

## DISCUSIONES

La mayoría de las especies del género *Alternaria* son hongos saprofitos comúnmente encontrados en suelos y en tejidos de plantas senescentes. Por otro lado, algunas especies son patógenos oportunistas que en conjunto causan una serie de enfermedades con un impacto económico considerable en una gran variedad de cultivos de importancia como son cereales, plantas ornamentales, vegetales como brócolis, y frutas. Este género es muy conocido a su vez por ser patógenos post-cosecha en los tipos de plantas antes mencionados. Una de las características más relevantes de las especies patogénicas del género *Alternaria* es su capacidad de producir toxinas, específicas para su hospedador como también toxinas no específicas lo que le permite parasitar un gran rango de hospedadores (Chauhan & al, 2009).

En el presente estudio, se logró aislar 4 cepas diferentes de *Alternaria*, desde hojas de brócoli colectadas en dos haciendas brocoleras en la provincia de Cotopaxi. Las hojas colectadas presentaban la lesión típica descrita para especies patogénicas del género *Alternaria*, manchas negras en las hojas que derivan en lesiones necróticas de forma circular. La identificación inicial de los aislados se los hizo mediante microscopía identificándose que los 4 aislados pertenecían al género *Alternaria*, pero debido a que las diferencias entre las conidias de las diferentes especies de este género son casi imperceptibles se procedió a su identificación molecular. Luego de realizar el análisis BLAST, de las secuencias obtenidas se obtuvo que dos aislados corresponden a *Alternaria japonica* y dos a *Alternaria alternata* (Tabla 3).

*Alternaria alternata* es un patógeno que puede ser encontrado en una gran cantidad de hospedadores, es de gran impacto en las plantaciones de tomate aunque también puede ser encontrado en una gran variedad de frutas y verduras entre las que se encuentran especies de Brassicaceas como es el brócoli. Se han reportado casos de *Alternaria alternata* identificados en el Ecuador aislados desde tomates, sandías y coliflores (Espinoza, 2009). Por otro lado,

*Alternaria japonica* es un patógeno oportunista, es decir un microorganismo que aprovecha la infección de otro patógeno para atacar a la planta, que puede ser encontrado comúnmente en cultivos de rábano, coliflores, brócolis y demás miembros de la familia Brassicaceas (Chalkley, 2016). Tanto *A. alternata* y *A. japonica* generan una lesión necrótica en las hojas de la planta infectada (Espinoza, 2009).

Durante el inicio de la investigación se esperaba obtener aislados de la especie *A. brassicicola* ya que es el patógeno más común en los cultivos de brócoli y existen reportes de este patógeno en los campos ecuatorianos (Infoagro, 2014). Sin embargo, y como se menciona anteriormente se logró aislar *Alternaria japonica* y *A. alternata*. Ambas especies están presentes en cultivos de Brassicaceas en forma de patógenos oportunistas y tienen una distribución global (Chauhan & al, 2009).

Uno de los cultivos de mayor relevancia económica en el Ecuador son las flores. Este producto es exportado a Estados Unidos (24%) Europa (17%) y los países de la ex Unión Soviética (63%) generando 728 millones de dólares de ingreso anual para el Ecuador, según datos del Banco Central del Ecuador (2012). Sin embargo en años pasados las exportaciones se vieron afectadas por la presencia de enfermedades y plagas los cuales no permitía el crecimiento adecuado de este cultivo (Telegrafo, 2012).

Se han descrito algunas afecciones microbiológicas que afectan considerablemente a los rosales. Entre los fitopatógenos reportados con mayor frecuencia se describe al Mildiu vellosa o tizón (*Peronospora sparsa*), Oidio (*Oidium* sp), Roya (*Phragmidium disciflorum*), Moho gris (*Botrytis cinerea*) y Agallas (*Agrobacterium tumefaciens*) (Castro, 2010). El género *Alternaria* no se encuentra descrito como un patógeno de los cultivos de rosas. Sin embargo, en esta investigación se demostró que las especies del género *Alternaria*, *A. alternata* y *A. japónica*, son capaces de infectar y desarrollarse en pétalos de rosa de la variedad Vendela.

Como se puede observar en el Figura 5 la infección de los aislados de *Alternaria japonica* y *Alternaria alternata* presenta una gran similitud con la infección de *Botrytis cinerea*. *B. cinerea* como se describe en la sección introducción es un patógeno oportunista que ataca a las rosas, principalmente, en la post-cosecha (Rodríguez, 2006). La lesión es de un color café oscuro con un centro negro necrótico tanto para los aislados de *Alternaria* como para los aislados de *Botrytis cinerea*. Ya que, no se han reportado casos de infecciones a cultivos de rosas a causa de *Alternaria* es probable que las lesiones de ambos patógenos sean en muchos casos tratadas, solamente, como infecciones de *Botrytis cinerea*.

Por otro lado, se utilizaron dos controles negativos en los bioensayos con botones de rosa, *Fusarium* spp. y *Saccharomyces cerevisiae*, donde *Fusarium* spp. no es un patógeno descrito para rosas ni para cultivos de brócoli y *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo no patógeno. Como se puede observar en la Figura 5 nuevamente estos hongos no fueron capaces de infectar pétalos de rosa a pesar de estar sometidos a las mismas condiciones experimentales que los aislados de *Alternaria* y *Botrytis cinerea*. A pesar que el género *Fusarium* tiene un gran rango de hospedadores no se han reportado casos de aislamiento de *Fusarium* en cultivos de rosas (Li-ju, 2013).

En la provincia de Cotopaxi, donde las muestras fueron recolectadas, las haciendas brocoleras están sumamente cerca de las haciendas florícolas. El agua que ambas industrias utilizan proviene de la misma fuente y esta no tiene un tratamiento previo antes que riegue los campos (Le Gall, 2008). Las especies del género *Alternaria* tienen la capacidad de distribuirse bajo un gran abanico de medios, entre ellos las corrientes de agua (Cho, 2015). Las conidias pueden llegar a los pétalos de las flores, desarrollarse o mantenerse en latencia. Es probable, que al igual que las infecciones por *Botrytis cinerea* las especies infectivas de *Alternaria*, en este caso *A. japónica* y *A. alternata*, sean patógenos oportunistas y se

desarrollen en la fase de post-cosecha cuando el sistema inmune de las rosas se ha visto debilitado (Vivanco, 2005).

En la Figura 5 como también en la Tabla 4, se observan los datos obtenidos de los bioensayos una vez que se inocularon esporas de los aislados de *Alternaria* en los botones de rosa. *A.japonica* y *A. alternata* fueron capaces de infectar los botones de rosa, mientras que *Fusarium*, *Saccharomyces cerevisiae* y medio PDB no generaron infección alguna. La infección con medio PDB sin inóculo se realizó como medio de comprobación de que el vehículo que lleva el inóculo no genera ninguna infección, por lo que es una lesión biológica y no física. Una vez que se realizó un ANOVA de los datos para el día 5 de la infección, se pudo constatar que no existe diferencia estadística significativa entre los 4 aislados de *Alternaria*, pero sí al compararlos con los diferentes controles negativos y positivos.

La falta de diferencia estadística entre los diferentes aislados indica que estos infectan tanto botones de rosa como hojas de brócoli a rangos muy similares, es decir que lo hacen a tiempos iguales y el tamaño y seriedad de la lesión no diferentes entre sí. Estadísticamente esto se comprobó al comparar la media de los aislados con una prueba de Tuckey al 5%, donde ninguno de los aislados de *Alternaria* tuvo un valor alfa menor al 0,05. Por otro lado, los diferentes controles tanto en botones de rosas como en hojas de brócoli difieren significativamente entre los aislados de *Alternaria*. Existe una gran diferencia entre los 4 aislados de *Alternaria* y los controles negativos con *Fusarium* spp. *S. cerevisiae* y medio PDB ya que estos controles no presentaron lesión alguna sobre botones de rosa ni en hojas de brócoli. Por otro lado, el control de *Botrytis* supera en gran medida a los ensayos con *Alternaria* ya que este es un patógeno descrito para rosas y durante el transcurso del experimento su diámetro de infección fue superior a los ensayos con *Alternaria*. Los valores del análisis de Tuckey y el ANOVA pueden observarse en el Anexo B.

El género *Alternaria* es un género de hongos muy extenso y sus respectivas especies tienen un rango de hospedadores sumamente variado (Conn, 2013). A pesar que el hospedador más común de *A. japonica* y *A. alternata* no es el brócoli, de donde fueron aislados, estos pueden causar infecciones como patógenos oportunistas en una gran variedad de especies de plantas debido a que este género es considerado como generalista (Heather, 2010). Las especies de *Alternaria* que son capaces de infectar plantas cuentan con una serie de proteínas no-específicas de hospedador, además de diferentes factores de virulencia generales con los cuales pueden causar infecciones en diferentes tipos de plantas (Bart & Thomma, 2003) (Hiroshi & al, 1995).

Adicionalmente, en un estudio realizado por Mathleu y colaboradores en la Universidad de Wageningen (1997) se estipula que mediante la delección de una base en el codón que dará origen al aminoácido N-terminal de una proteína de virulencia, el rango de hospedador como la agresividad de la infección de *Alternaria alternata* puede verse sumamente afectado (Mathleu & al., 1997). En consecuencia, un pequeño cambio en las proteínas de virulencia puede derivar en cepas más agresivas y con un rango de hospedador más amplio.

Las dos más grandes ventajas que tiene el género *Alternaria* para poder infectar a una gran cantidad de hospedadores es la producción de melanina en sus esporas y la producción de toxinas no específicas (Bart & Thomma, 2003). La melanina es un pigmento de color oscuro de alto peso molecular y que está distribuido en desde animales superiores pasando por plantas en muchos microorganismos (Bell & Wheeler, 1986). La gran mayoría de las melaninas producidas por hongos se forman mediante el precursor 1,8 dihidroxinaftaleno (Bell & Wheeler, 1986). La melanina en las esporas de los hongos y especialmente en las esporas de *Alternaria* parece tener una función directa como indirecta en la incidencia de virulencia en ciertas cepas (Bart & Thomma, 2003). En primer lugar actúa como armadura protegiendo a las esporas de la desecación, radiación UV y ataques de compuestos

antagonistas. Por otro lado, la melanina tiene un rol en la penetración de las membranas de celulosa al momento del contacto de las esporas con el tejido vegetal.

El género *Alternaria* produce una serie de proteínas que les permiten infectar a una gran variedad de cultivos. Entre estas están las enzimas cutinolíticas las cuales degradan la cutícula de las hojas y pétalos permitiendo la entrada del patógeno (Fan & Koller, 1998). Adicionalmente, cuentan con lipasas que degradan la capa cerosa de las hojas (Trail & Koller, 1993). Ambas enzimas comienzan a sintetizarse una vez que el patógeno ha entrado en contacto con su hospedador (Bart & Thomma, 2003).

Sin embargo, en el género *Alternaria* se encuentran una serie de proteínas no específicas las cuales mediante diversas investigaciones se ha demostrado que están sumamente involucradas en la infección de diversas especies vegetales (Bart & Thomma, 2003), aunque el mecanismo de acción de muy pocas ha sido estudiado a detalle. Por ejemplo, la proteína brefeldin A tiene actividad fitotóxica y actúa desmantelando el aparato de Golgi causando la inhibición de la secreción de sustancias fuera de célula (Fujiwara, Yokots, Takatsuki, & Ikehara, 1998). Por otro lado existen otras proteínas como: la curvalarina que es un inhibidor de la división celular debido a que impide el correcto ensamblaje de los microtúbulos, el ácido tenuazonico que inhibe la síntesis de proteínas y el zinniol que afecta la permeabilización de las membranas celulares (Meronuck & al., 1972). Mientras que la tentoxina actúa como un inhibidor de la fotofosforilación mediante la unión a la sintasa de ATP del cloroplasto causando la inhibición de la hidrólisis y síntesis de ATP. Las toxinas descritas anteriormente atacan a componentes y procesos celulares muy conservados en todas las plantas por lo que son micotoxinas muy poderosas (Steele & al, 1978).

Por otro lado, como se observan en la Figura 6 los 4 aislados de *Alternaria* no tuvieron ningún problema en infectar a las pantas de brócoli, ya que estas especies son patógenos descritos del brócoli (Chauhan & al, 2009). Los aislados de *Alternaria* que fueron aislados de



plantas de brócoli no perdieron su capacidad de infectar plantas de brócoli y además fueron capaces de infectar botones de rosa como se ha descrito a lo largo de la investigación. No existe diferencia estadística representativa cuando se compara a los aislados entre sí, por lo que se presume que tienen una capacidad infectiva muy similar. El caso de *Botrytis cinerea* y medio PDB como control negativo representa que las hojas de brócoli no son un medio de cultivo adecuado para cualquier tipo de patógeno, además que la infección en hojas de brócoli es una característica de las especies del género *Alternaria* y no de cualquier hongo.

## CONCLUSIONES

En esta investigación se aislaron dos cepas patogénicas de *Alternaria japonica* y dos de *A. alternata* a partir de hojas de brócoli que presentaron síntomas de la infección por *Alternaria*, el fitopatógeno fue identificado por sus características morfológicas macroscópicas, microscópicas y fue caracterizado molecularmente usando la secuenciación de la región ITS.

Se evaluó la capacidad infectiva en botones de rosa de la variedad Vendela de dichas especies mediante bioensayos controlados. Se presume que *Alternaria japonica* y *A. alternata* son capaces de infectar pétalos de rosa debido a la presencia de proteínas y enzimas capaces de dañar a una gran variedad de hospedadores.

No existió diferencia estadística significativa entre los 4 aislados. Se puede presumir que la infección se llevó a cabo mediante dichas proteínas compartidas por diversas especies del género *Alternaria*.

Mediante el uso de diversos controles negativos, se demostró que los pétalos de rosa no son un medio de cultivo idóneo para el crecimiento de todo tipo de patógenos.

En rosas, la forma y color de la lesión en el pétalo que causan *Alternaria japonica* y *A. alternata* es muy similar a la que produce *Botrytis cinerea* en sus primeras etapas por lo que muchas veces pueden ser confundidas.

## RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar pruebas en campo de infecciones de *Alternaria japonica* y *A. alternata* en botones de rosa para confirmar la capacidad infectiva de dichas especies en campo y no solo bajo condiciones de laboratorio.

Realizar nuevas pruebas con un número mayor de aislados de *Alternaria japonica* y *A. alternata*.

Realizar ensayos de patogenicidad de *Alternaria japonica* y *A. alternata* sobre diferentes variedades de rosa.

Realizar ensayos de patogenicidad sobre botones de rosa con diferentes especies del género *Alternaria*.

Comprobar la presencia de infecciones de *Alternaria* en las fincas florícolas cercanas a cultivos de brócoli.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arcos, M. (2011). *Obtención y evaluación de cepas nativas de Trichoderma spp. en el biocontrol de Botrytis cinerea en el cultivo de rosas*. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
- Bart, P., & Thomma, J. (2003). *Alternaria spp.: from general saprophyte to specific parasite. Molecular Plant Pathology*, 225-236.
- Bastidas, O. (2008). *Conteo Celular con Hematocitómetro*. Celeromics.
- Bell, A., & Wheeler, M. (1986). Biosynthesis and functions of fungal malinins. *Annual Revision. Phytopathology*, 411-451.
- Bermúdez, A. (2013). EVALUACIÓN DE LA RESISTENCIA SISTÉMICA DE *Arabidopsis thaliana* AL FITOPATÓGENO *Alternaria spp.* MEDIANTE LA INOCULACIÓN DE *Trichoderma spp.* Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Caiza, V. (2013). *Colección, identificación y pruebas de eficacia in vitro de (Trichoderma sp). en el control biológico de (Botrytis cinerea) en la finca florícola Picasso Roses*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Castro, J. (2010). *Evaluación del control biológico que ejerce la simbiosis del hongo entomopatógeno (Paecilomyces fusoroseus) junto con el organismo quitinolítico aislado a partir de cascarilla de camarón sobre el ácaro (Tetranychus urticae) fitopatógeno de rosas*. Quito: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- Chalkley, D. (2016 de 10 de 2016). *Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*.  
Obtenido de <http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/factsheets/index.cfm?thisapp=Alternariajaponica>
- Chauhan, J., & al, e. (2009). Effect of *Alternaria* on Some Members of Family Brassicaceae of Garhwal Himalaya. *New York Science Journal*, 1554-0200.

- Cho, Y. (2015). How the necrotrophic fungus *Alternaria brassicicola* kills plant cells remains an enigma. *American Society for Microbiology*, 363-883.
- CLEMENSON. (2002). Cabbage, Broccoli & Other Cle Crop Diseases. *Home & Garden Information Center*, 1888-1892.
- Clement, K., & al, e. (2011). Molecular techniques for pathogen identification and fungus detection in the environment. *IMA Fungus*, 177-189.
- Colombo, C. e. (1998). Genetic diversity characterization of cassava cultivars by RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 105-113.
- Conn, K. (2013). Crucifer Disease Guide. *Seminis*, 1-51.
- CORPEI. (11 de 2009). *PUCESI*. Recuperado el 06 de Diciembre de 2015, de <http://www.pucesi.edu.ec/pdf/brocoli.pdf>
- Díaz, N. (2012). Obtención y Evaluación in vitro de la eficiencia de extractos con principios activos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), ajo (*Allium sativum*) y crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) como fungicidas naturales para el control de *Botrytis cinerea*. Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Ellis, M. (1968). *Alternaria brassicae*. In: Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *Commonwealth Mycological Institute (CMI)*, 162-171.
- Espinoza, L. e. (2009). Conservación de Agentes Patógenos y Epífitos Presentes en los Cultivos de Tomate, Sandía y Banano y sus Beneficios para la Investigación. *Revista Tecnológica ESPOL*, 51-56.
- Expoflores. (2014). Exportación general de flores enero-febrero 2014. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Fan, C., & Koller, W. (1998). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: differential and sequential expression of cutinolytic esterases by *Alternaria brassicicola*. *FEMS Microbiology*, 33-38.

- Fang, Y., & Ramasamy, P. (2015). Current and Prospective Methods for Plant Disease Detection. *Biosensors*, 537-561.
- Fernández, M. (2012). *Dehesa.une.mex*. Recuperado el 2015 de 12 de 06, de [http://dehesa.unex.es:8080/xmlui/bitstream/handle/10662/415/TDUEX\\_2012\\_Fern%C3%A1ndez\\_Le%C3%B3n.pdf?sequence=1](http://dehesa.unex.es:8080/xmlui/bitstream/handle/10662/415/TDUEX_2012_Fern%C3%A1ndez_Le%C3%B3n.pdf?sequence=1)
- FLACSO y MIPRO. (2015). *FLACSO*. Obtenido de <https://www.flacso.edu.ec/portal/pnTemp/PageMaster/k23wo5fko3cq1nhkc0mqf8bd8jutu5.pdf>
- Fujiwara, T., Yokots, S., Takatsuki, A., & Ikehara, Y. (1998). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem*, 1854-18552.
- Gorny, A. (2012). Alternaria Leaf Spot of Cabbage. *Department of Plant Pathology and Plant-Microbe Biology*, 20-23.
- Heather, C. K. (2010). All Mold Is Not Alike: The Importance of Intraspecific Diversity in Necrotrophic Plant Pathogens. *PLoS Pathog*, 1-3.
- Hiroshi, O., & al, e. (1995). Alternaria toxins and their effects on host plants. *Can J. Bot*, 453-458.
- Howard, R., & Valent, B. (1996). Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Revision Microbiology* , 491-512.
- Infoagro. (2014). El cultivo de las rosas para corte. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Kawamura, C., Tsujimoto, T., & Tsuge, T. (1999). Targeted disruption of a melanin biosynthesis gene affects conidial development and UV tolerance in the Japanese pear pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 59-63.
- Le Gall, J. (2008). El brócoli en Ecuador : la fiebre del oro verde. Cultivos no tradicionales estrategias campesinas y globalización. *Anuario Americanista Europeo*, 261-288.

- Li-ju, M. (2013). Fusarium Pathogenomics. *Annual Reviews Further*, 399-416.
- MAGAP. (2013). *Sinagap*. Recuperado el 06 de diciembre de 2015, de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/phocadownloadpap/BoletinesCultivos/Brocoli.pdf>
- Mangain, A. e. (2013). Alternaria pathogenicity and its strategic controls . *Research Journal of Biology*, 1-9.
- Martinis, T. (2013). *Caracterización fisiológica y genética de las poblaciones naturales de Botrytis cinerea de los viñedos de Castilla y León*. Salamanca: Universidad de Salamanca.
- Mathieu, H., & al., e. (1997). Host resistance to a fungal tomato pathogen lost by a single base-pair change in an avirulence gene. *Nature*, 367-381.
- Meronuck, R., & al., e. (1972). Tenuazonic acid, a toxin produced by Alternaria alternata. *Applied Microbiology*, 613-617.
- Nicot, P. (2013). *Efecto de los tratamientos de gel de Aloe, aplicados en pre- o post - recolección sobre la calidad de frutos de hueso y uva de mesa*. Orihuela: Universidad Miguel Hernández de Elche.
- Pattanamahakul, P. S. (1999). Identification and toxicity of Alternaria brassicicola, the causal agent of dark leaf spot disease of Brassica species grown in Thailand. *Plant Pathology*, 749-755.
- PROEQUADOR. (2013). *Análisis Sectorial de Flores* . Quito: Inteligencia Comercial e Inversiones.
- Ristaino, J., & al, e. (1998). PCR Amplification of Ribosomal DNA for Species Identification in the Plant Pathogen Genus Phytophthora. *Applied and Environmental Microbiology* , 948-954.
- Rodríguez, R. (2006). Plagas y Enfermedades de un Rosal. *Servicios agrícolas*, 1-4.

- Salgado, C. (2011). Identificación molecular de especies de molinilla spp. que afectan la producción de durazno, *Prunus pérsica*, en las provincias de Carchi, Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Quito, Pichincha, Ecuador.
- Saskia, C. e. (2013). Bioassays for assessing jasmonate-dependent defenses triggered by pathogens, herbivorous insects, or beneficial rhizobacteria. En A. P. Goossens, *Jasmonate Signaling Methods and Protocols* (págs. 35-49). Humana Press.
- Shahin, E. e. (1978). An Efficient Technique for Inducing Profuse Sporulation of *Alternaria* Species. *Phytopathology*, 618-620.
- Steele, J., & al, e. (1978). Tentoxin— uncompetitive inhibitor of lettuce chloroplast coupling factor-1. *Biochim. Biophys*, 561-572.
- Telegrafo, E. (20 de 12 de 2012). Exportación de flores creció 11% este año. *El Telegrafo*.
- Trail, F., & Koller, W. (1993). Diversity of cutinases from plant pathogenic fungi: purification and characterization of two cutinases from *Alternaria*. *Molecular Plant Pathology*, 205-220.
- Van Kan, J. (2005). Infection Strategies of *Botrytis cinerea*. *Acta Horti*, 77-90.
- Vivanco, J. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y Ciencia*, 68-77.
- Woudenberg, J., & al., e. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Microbiology*, 171-212.
- Zhu, H. (2010). *Strategies to Improve the Post-Harvest Characteristics of the Cut Rose Flower: Botrytis Susceptibility, Transgenic Resistance, and Differential Gene Expression during the onset of Bent Neck and Petal Bluing*. Raleigh: North Carolina State University.



## **ANEXO A: METODOLOGÍA DE LA PURIFICACIÓN DE LAS REGIONES ITS DEL ADN RIBOSOMAL 5.8S AMPLIFICADAS**

1. Se colocó la columna de filtración dentro del tubo eppendorf.
2. En el centro de la membrana se depositó, 50 $\mu$ l del producto amplificado con 200 $\mu$ l de la solución buffer de unión a la membrana.
3. Se incubó durante 1minuto a temperatura ambiente.
4. Se centrifugó por 1minuto a 10000rpm.
5. Se descartó el desecho recolectado en el tubo eppendorf.
6. Se agregó 650 $\mu$ l de solución buffer de lavado de la membrana con etanol, sobre la muestra que se encuentra en la columna de filtración.
7. Se centrifugó por 1min a 10000 rpm y nuevamente descartando el desecho del tubo recolector.
8. Se centrifugó nuevamente a 10000 rpm, por 3 minutos.
9. Al final se añadió 50 $\mu$ l de buffer de elución en la columna de filtración.
10. Se incubó durante 1minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 10000 rpm durante 2 minutos.
11. Se descartó la columna de filtración.
12. El volumen obtenido en el tubo eppendorf constituye el producto amplificado y purificado

## ANEXO B: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA DE LAS MEDICIONES EN LSO DIFERENTES BIOENSAYOS EN EL DÍA 5 DEL EXPERIMENTO PARA BOTONES DE ROSAS Y BRÓCOLI.

**Tabla 4:** Estadística descriptiva de las mediciones de la infección de los diferentes ensayos sobre los pétalos de rosas en el día 5 del experimento (Herrera, 2016).

Descriptivos								
Diámetro	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Cepa1	30	,520	,4003	,0731	,371	,669	0,0	1,4
Cepa2	30	,620	,6167	,1126	,390	,850	0,0	1,9
Cepa3	30	,510	,3977	,0726	,361	,659	0,0	1,2
Cepa4	30	,553	,4761	,0869	,376	,731	0,0	1,4
Botrytis	30	3,557	,9648	,1761	3,196	3,917	1,4	5,1
Fusarium	30	,100	,0000	,0000	,100	,100	,1	,1
Levaduras	30	,100	,0000	,0000	,100	,100	,1	,1
PDB	30	,100	,0000	,0000	,100	,100	,1	,1
Total	240	,758	1,1806	,0762	,607	,908	0,0	5,1

**Tabla 5:** Estadística descriptiva de las mediciones de la infección de los diferentes ensayos sobre las hojas de brócoli en el día 5 del experimento (Herrera, 2016).

Descriptivos								
Diámetro	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Cepa1	30	2,523	,2315	,0423	2,437	2,610	2,0	2,9
Cepa2	30	2,500	,2274	,0415	2,415	2,585	2,0	2,8
Cepa3	30	2,830	,3042	,0555	2,716	2,944	2,1	3,5
Cepa4	30	2,670	,3631	,0663	2,534	2,806	2,1	3,5
Botrytis	30	,100	,0000	,0000	,100	,100	,1	,1
PDB	31	,100	,0000	,0000	,100	,100	,1	,1
Total	181	1,778	1,2263	,0912	1,598	1,958	,1	3,5