

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Aislamiento e identificación molecular de agentes fúngicos
de la frutilla (*Fragaria* sp.) de Pichincha-Ecuador**

Trabajo de investigación

Andrés Mauricio Núñez Zambrano

Ingeniería de Procesos Biotecnológicos

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

Quito, 30 de abril de 2017

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
AMBIENTALES

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Aislamiento e identificación molecular de agentes fúngicos de la frutilla
(*Fragaria* sp.) de Pichincha-Ecuador**

Andrés Mauricio Núñez Zambrano

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, PhD.

Firma del profesor

Quito, 30 de abril de 2017

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: Andrés Mauricio Núñez Zambrano

Código: 00108627

Cédula de Identidad: 1714839584

Lugar y fecha: Quito, 30 de abril de 2017

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al profesor y amigo Antonio León, por su acertada guía académica, paciencia y confianza en todo. También, retribuir al Ing. Walter Zarria, por su respeto, ayuda y motivación a seguir trabajando en el proyecto. Además, quiero reconocer a todos mis amigos en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos por sus innumerables correcciones y enseñanzas. Finalmente, quiero agradecer a mi compañera de vida, amiga y asistente Karen Balladares, por apoyarme siempre con su amor, ayuda incondicional y apoyo en tiempos difíciles. Le agradezco a mi madre, Nelly Zambrano, por su fortaleza, amor humano y esfuerzo diario. También, quiero reconocer a mi padre, Mauricio Núñez, por su valor, carisma y preocupación por las demás personas. Además, le agradezco a mi hermano, Cristian Núñez, por su amistad, cariño y honorabilidad. Al final, le dedico este trabajo a mi hijo, Nicolás Núñez, por ser mi constante inspiración.

RESUMEN

La frutilla (*Fragaria* sp.) es una de las frutas más cotizadas por su valor nutritivo y comercial a nivel mundial. Actualmente, en la parroquia de Yaruquí, provincia de Pichincha (Ecuador) existe una enfermedad no reportada que provoca una disminución considerable en la producción y rendimiento de los cultivos de frutilla. Se estima que el 70% de los fungicidas y pesticidas son mal utilizados, debido a que los pequeños agricultores de la zona de Yaruquí desconocen qué patógenos afectan a sus cultivos, generando problemas ambientales, a la salud humana y aumentando los costos de producción. Determinando el agente causal de esta enfermedad, se puede crear futuros planes de manejo y de control de este problema fitosanitario. Los síntomas encontrados en plantas de frutilla son: marchitamiento del follaje, secado y un color café en las hojas más viejas, lento crecimiento, coloración café anaranjada en los tejidos vasculares y de raíces, y atrofia general de la planta. En esta investigación, a partir de los cuellos de las plantas enfermas de frutilla, se aisló y se identificó a 12 diferentes aislados de hongos con fenotipos diferentes en base al análisis morfológico y microscópico. Mediante el uso de técnicas moleculares y la caracterización ITS ribosomal, se identificó molecularmente 7 especies: *Clonostachys rosea*, *Clonostachys byssicola*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus fumigatus*, *Xylaria venosula*, *Fusarium solani* y *Bionectria ochroleuca*. De estos, *Penicillium pinophilum*, *Fusarium solani* y *Bionectria ochroleuca* han sido reportados anteriormente como patógenos y los otros 4 hongos aislados fueron reportados anteriormente como benéficos o saprófitos. Se necesita realizar futuras investigaciones usando pruebas de patogenicidad para definir si estos hongos son los responsables de la muerte basal de las plantas en condiciones de campo.

Palabras claves: *Clonostachys rosea*, *Clonostachys byssicola*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus fumigatus*, *Xylaria venosula*, *Fusarium solani*, *Bionectria ochroleuca*, PCR, región ITS.

ABSTRACT

The strawberry (*Fragaria* sp.) is one of the fruits most valued worldwide for its nutritional and commercial value. Currently, in the parish of Yaruquí, province of Pichincha (Ecuador) there is an unidentified disease that causes a considerable decrease in production and yield of strawberry crops. It is estimated that 70% of fungicides and pesticides are misused, because the local farmers in the Yaruquí area are unaware of what pathogens are affecting their crops, causing environmental problems, human health problems and increasing production costs. By determining the causal agent of this disease, future plans of management and control of this phytosanitary problem can be created. The symptoms found in strawberry plants are: foliage wilting, drying and a brown color on older leaves, slow growth, orange brown coloration on vascular and root tissues, and general atrophy of the plant. In this research, 12 different fungal isolates with different phenotypes were isolated from the crowns of diseased strawberry plants, based on morphological and microscopic analysis. By using molecular techniques and the ITS ribosomal characterization, 7 species were identified molecularly: *Clonostachys rosea*, *Clonostachys byssicola*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus fumigatus*, *Xylaria venosula*, *Fusarium solani* and *Bionectria ochroleuca*. Of these, *Penicillium pinophilum*, *Fusarium solani* and *Bionectria ochroleuca* have been previously reported as pathogens and the other 4 isolated fungi were previously reported as beneficial or saprophytes. Further research is needed using pathogenicity tests to determine if these fungi are responsible for the basal death of plants under field conditions.

Key words: *Clonostachys rosea*, *Clonostachys byssicola*, *Penicillium pinophilum*, *Aspergillus fumigatus*, *Xylaria venosula*, *Fusarium solani*, *Bionectria ochroleuca*, PCR, ITS region.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	12
1.1	Características generales del género <i>Fragaria</i>	12
1.2	Producción y manejo agronómico del género <i>Fragaria</i>	13
1.3	Panorama mundial sobre la producción del género <i>Fragaria</i>	13
1.4	Panorama del Ecuador sobre la producción del género <i>Fragaria</i>	15
1.5	Variedad Albion	16
1.6	Enfermedades de las plantas de frutilla	17
1.6.1	Enfermedades de las raíces en plantas de frutilla.....	18
1.7	Técnicas de aislamiento e identificación de microorganismos causantes de enfermedades vegetales.....	18
1.7.1	PCR (Polymerase Chain Reaction)	19
1.7.2	Región ITS	20
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo general	21
2.2	Objetivos específicos	21
3	JUSTIFICACIÓN	21
4	ÁREA DE ESTUDIO	22
5	MATERIALES	23
5.1	Recolección y desinfección de las muestras.....	23
5.2	Preparación de los medios de cultivo	24

5.3	Siembra del material en medios de cultivo	24
5.4	Identificación microscópica de hongos con azul de metileno	24
5.5	Extracción de ADN.....	25
5.6	Amplificación de la región ITS mediante PCR	25
5.7	Purificación y cuantificación de productos de PCR del ADN fúngico	26
6	MÉTODOS.....	26
6.1	Recolección y desinfección de las muestras.....	26
6.2	Preparación de medios de cultivo	27
6.3	Siembra del material en medios de cultivo	28
6.4	Identificación microscópica de hongos con azul de metileno	29
6.5	Extracción de ADN.....	29
6.6	Amplificación de la región ITS mediante PCR	29
6.7	Purificación y cuantificación de productos de PCR del ADN fúngico	31
6.8	Preparación de muestras para secuenciación y análisis bioinformático.....	31
6.9	Revisión bibliográfica de cada uno de los microorganismos fúngicos aislados.	31
7	RESULTADOS	32
7.1	Recolección y desinfección de la muestra.....	32
7.2	Identificación morfológica y microscópica de hongos con azul de metileno.....	34
7.3	Identificación molecular mediante la amplificación del ADN ribosomal con los primers ITS1 e ITS4.....	39
8	DISCUSIÓN	45

8.1	Análisis de la sintomatología y del aislamiento de los microorganismos encontrados.....	45
8.2	Análisis de la identificación molecular de los microorganismos encontrados...46	46
8.3	Análisis bibliográfico de los microorganismos fúngicos obtenidos con las técnicas moleculares.....	47
9	CONCLUSIONES	58
10	RECOMENDACIONES	59
11	BIBLIOGRAFÍA.....	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de los medios de cultivos PDA, Czapek y V-8.....	28
Tabla 2. Componentes para la preparación del master mix de PCR.....	30
Tabla 3. Programación de termociclador para realizar PCR de primers ITS.....	30
Tabla 4. Identificación fenotípica y microscópica de los microorganismos encontrados en los medios de cultivos Czapek, V-8 y PDA.	35
Tabla 5. Identificación molecular de los hongos aislados utilizando los primers ITS1 e ITS4.	40
Tabla 6. Revisión bibliográfica de cada uno de los hongos aislados encontrados en las muestras de frutilla estudiadas.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Porcentaje de producción de frutillas a nivel continental, entre los años 2004 y 2014 (FAOSTAT, 2017).....	14
Figura 2. Número de toneladas de frutillas producidas por los mayores países productores a nivel mundial, entre los años 2004 y 2014 (FAOSTAT, 2017).....	15
Figura 3. Número de toneladas de frutillas producidas y número de hectáreas utilizadas como áreas cosechadas para la producción de frutillas en el Ecuador, entre los años 2004 y 2014 (FAOSTAT, 2017).....	16
Figura 4. Fotografías de las plantas de frutilla enfermas y sanas con el mismo tiempo de crecimiento: A) Foto de plantas enfermas en el campo, B) Foto de plantas sanas en el campo, C) Foto cercana de la sintomatología de una planta enferma, D) Foto cercana de una planta sana, E) Foto de planta enferma tomada en laboratorio, y F) Foto de planta sana tomada en laboratorio.	33
Figura 5. Fotografías del proceso de desinfección e inoculación de cuellos de frutilla en los medios de cultivo: A) Foto de corte transversal de la región del cuello de una planta enferma, B) Foto de corte transversal de la región del cuello de otra planta enferma, C) Foto de varios explantes de cuello de una planta enferma listos para ser desinfectados, y D) Foto de varios explantes de cuello de otra planta enferma listos para ser desinfectados.	33
Figura 6. Fotografía del gel de agarosa para comprobación de la amplificación de ADN ribosomal con los primers ITS1 e ITS4 para los fenotipos F1, F2, F3, F4, F6, F7, F8, F9, F10, F11 y F12 (L = Ladder).	39

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales del género *Fragaria*

Fragaria es un género de plantas rastreras perennes que pertenece a la clase Magnoliopsida, orden Rosales, familia Rosaceae y subfamilia Rosoideae. A nivel mundial, existen más de 160 especies dentro del género *Fragaria*; sin embargo, las especies más importantes en el continente americano son: *Fragaria chiloensis* que se cultiva en Chile, Argentina y California (Estados Unidos), *Fragaria virginiana* que se cultiva en Ecuador, Perú y Bolivia, y *Fragaria ananassa* que es una variedad híbrida resultante del cruzamiento entre las dos especies previamente mencionadas (Angulo, 2009). Las especies *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* son generalmente diocas, y se cree que son originarias de Asia Oriental que diseminaron hacia Norteamérica a través del estrecho de Bering (Angulo, 2009). La planta tiene un sistema radicular fasciculado, el cual se caracteriza por hacer que la planta renueve sus raíces secundarias conocidas también como raicillas. Las raicillas tienen un color más claro que las raíces primarias, y se caracterizan por tener un período corto de vida en comparación de las raíces primarias. La planta está conformada por varias hojas pecioladas verdes, un tallo rastrero herbáceo de donde salen los peciolo, y unas flores que contienen cinco pétalos blancos, cinco sépalos, cientos de estambres y un gineceo amarillo. Las plantas del género *Fragaria* tienen una vida corta entre 24 meses a 30 meses, aunque su vida comercial útil es de 12 a 18 meses; a partir de este tiempo se vuelve muy susceptible a enfermedades y baja su calidad de frutos y rendimiento en general (Vizcaino, 2011).

1.2 Producción y manejo agronómico del género *Fragaria*

La planta del género *Fragaria* es muy apetecida por su fruto comestible dulce denominado frutilla o fresa. La planta debe alcanzar un tamaño óptimo de 40 a 50 centímetros de profundidad para sacar un excelente fruto, ya que a esta profundidad se obtiene mayor cantidad de nutrientes (Vizcaino, 2011). Sin embargo, su alta tasa de respiración y su epidermis turgente la vuelve muy susceptible a daños mecánicos y al ingreso de microorganismos patogénicos. Estos dos factores pueden provocar grandes pérdidas comerciales en la post-cosecha, pese a que es un fruto que no continúa su proceso de maduración después de haber sido cosechado. Su sensibilidad a los daños físicos y a las pudriciones por hongos y pseudohongos incrementa con las altas temperaturas que se encuentran en el campo durante la etapa de transporte y comercialización. Los métodos de control para reducir las enfermedades en la pre y post-cosecha son: el uso de variedades tolerantes, fungicidas y cubiertas plásticas que evitan que el fruto este en contacto con los microorganismos patógenos del suelo (Fraire et al., 2003).

1.3 Panorama mundial sobre la producción del género *Fragaria*

Según los datos de la FAOSTAT (2017), Asia es el continente líder en producción de frutillas a nivel mundial desde el año 2004 al año 2014 con un porcentaje promedio global de 46%, mientras que el continente americano ocupa un segundo puesto con un porcentaje promedio global de 25,3% y dejando a Europa en un tercer puesto con 22,7%.

Proporción de producción de Fresas por región

Promedio 2004 - 2014

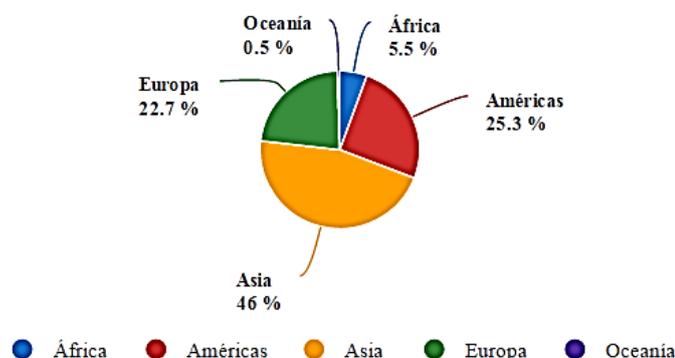


Figura 1. Porcentaje de producción de frutillas a nivel continental, entre los años 2004 y 2014 (FAOSTAT, 2017).

A nivel país, entre los años 2004 y 2014, China continental es el líder absoluto con una producción global de 2'273.233,91 toneladas de frutillas, mientras que en segundo lugar se encuentra Estados Unidos con una producción global de 1'233.375,36 toneladas y un tercer puesto muy por debajo esta España con 294.240,45 toneladas. Sin embargo, es importante destacar que el único país latinoamericano que está dentro de los diez países productores de frutillas a nivel mundial es México en quinto lugar con 254.821,91 toneladas de frutillas (FAOSTAT, 2017).

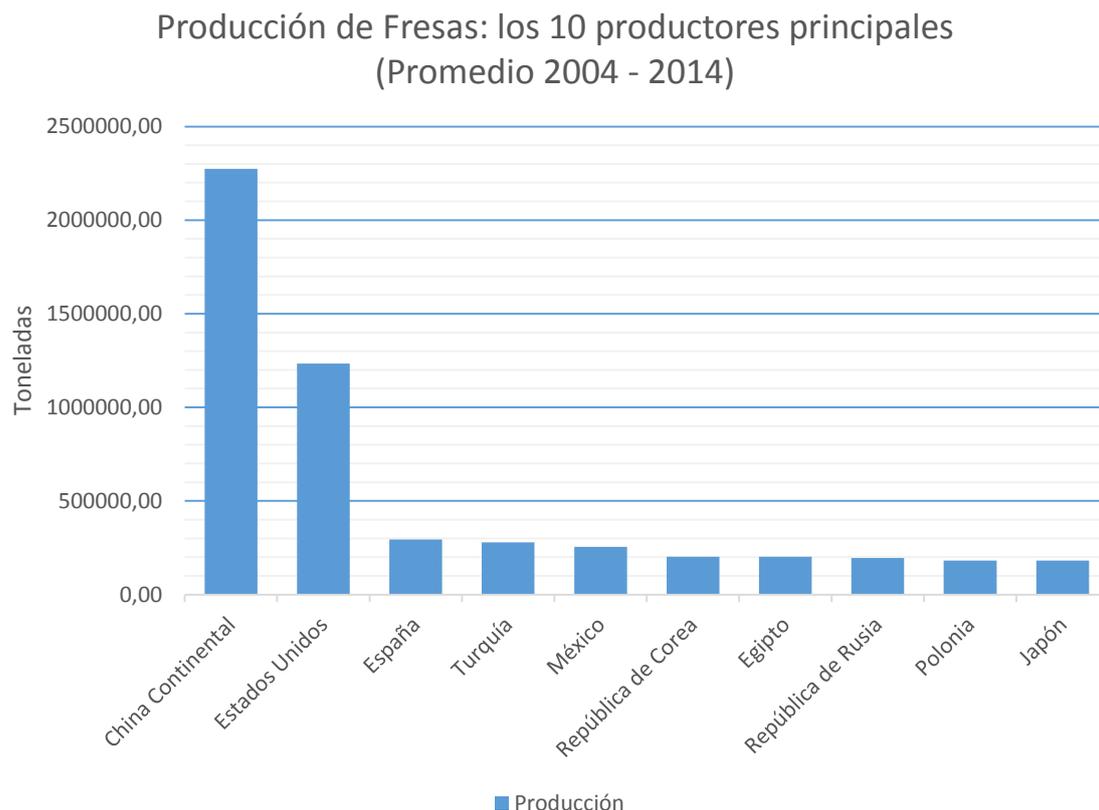


Figura 2. Número de toneladas de frutillas producidas por los mayores países productores a nivel mundial, entre los años 2004 y 2014 (FAOSTAT, 2017).

1.4 Panorama del Ecuador sobre la producción del género *Fragaria*

En base a un análisis hecho por la FAOSTAT (2017) entre los años 2004 al 2014, en el Ecuador existe una fluctuación en la producción de frutillas. En el año 2004, se producen 1.303 toneladas de frutilla dentro de un área de cosecha de 114 hectáreas, estos valores de producción aumentan a 1.900 toneladas dentro de un área de cosecha de 155 hectáreas en el año 2009. A partir del año 2009, existe una indiscutible baja en la producción de frutillas llegando a hacer de 1.620 toneladas producidas dentro de un área de cosecha de 105 hectáreas en el año 2014, lo que evidencia un claro desinterés por mantener una producción de esta planta por parte de los agricultores locales ecuatorianos.

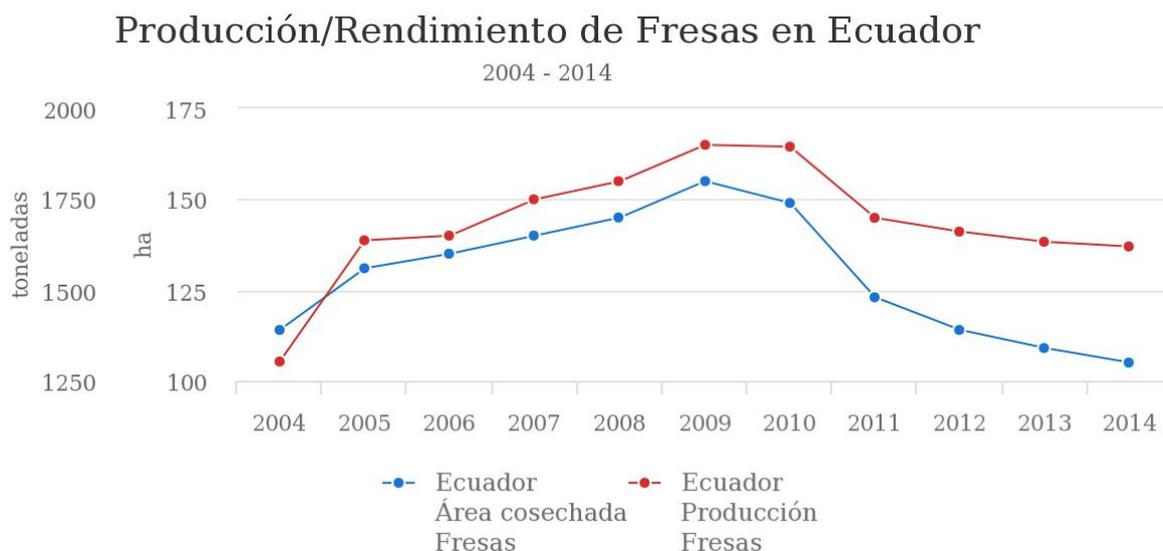


Figura 3. Número de toneladas de frutillas producidas y número de hectáreas utilizadas como áreas cosechadas para la producción de frutillas en el Ecuador, entre los años 2004 y 2014 (FAOSTAT, 2017).

Dentro del territorio ecuatoriano, existe una gran aceptación para el uso, la producción y la comercialización por los consumidores, de las siguientes variedades de frutilla: Oso Grande, Diamante, Albion, Camino Real, Monterey, y Festival. Estas variedades son ampliamente utilizadas por su rápida adaptación al clima del Ecuador, por su rendimiento alto con frutos de alta calidad, y por su resistencia contra plagas y enfermedades. Además de las variedades previamente mencionadas, otras variedades altamente aceptadas a nivel mundial son: Aromas, Ventana, Pájaro, Cortuno, Selva, Sweet Charlie, Palomar, Milsei (Tudla), Chandler y Camarosa (Vizcaino, 2011).

1.5 Variedad Albion

La variedad Albion de frutilla es un tipo de cultivar desarrollado y patentado por la Universidad de California en Davis. Esta variedad tiene un crecimiento lento al inicio con bajas temperaturas y es de tamaño intermedio. Su característica principal es su color rojo fuerte y de hombros más claro, a bajas temperaturas y tiene una alta acumulación

de azúcar (10-14 °Brix). Normalmente, es un fruto firme de gran sabor y tiene un buen manejo post-cosecha. Albion es una variedad muy resistente a la marchitez por *Verticillium dahliae* y a la pudrición de corona por *Phytophthora cactorum*, pero es limitadamente resistente a la pudrición de corona por Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) (UC Davis, 2016).

1.6 Enfermedades de las plantas de frutilla

Existen varios tipos de enfermedades que afectan diferentes regiones de las plantas de frutilla. Las principales enfermedades que afectan al fruto son: Antracnosis (*Colletotrichum acutatum*), pudrición de fruto por *Botrytis* (*Botrytis cinerea*), pudrición de fruto por *Mucor* (*Mucor* spp.) y pudrición de fruto por *Rhizopus* (*Rhizopus* spp.). Mientras que las principales enfermedades foliares en las plantas de frutilla son: mancha angular de hoja (*Xanthomonas fragariae*), virus reductivos de frutilla (*Strawberry pallidosis associated virus* (SPaV)) o *Beet pseudo yellows virus* (BPYV), mancha de la hoja de frutilla (*Mycosphaerella fragariae*), mancha común de la hoja (*Ramularia tulasneii*), moho pulverulento (*Sphaerotheca macularis*) y mancha de hoja de frutilla (*Zythia fragariae*). Finalmente es importante mencionar las enfermedades de las raíces: pudrición de carbón (*Macrophomina phaseolina*), marchitez por *Verticillium* (*Verticillium dahliae*), estela roja (*Phytophthora fragariae* var. *Fragariae*), pudrición de corona por *Phytophthora* (*Phytophthora cactorum*, *P. citricola*, *P. parasitica*, y *P. megasperma*), pudrición de cuero (*Phytophthora cactorum*) y marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*) (UC IPM, 2017).

1.6.1 Enfermedades de las raíces en plantas de frutilla

Entre las enfermedades que atacan a las raíces de las plantas de la frutilla sobresalen la pudrición que genera los hongos *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum f. sp. Fragariae* y que presentan síntomas como marchitamiento del follaje, secado de hojas viejas, atrofia general de la planta, aparecimiento de un color oscuro a café anaranjado en los tejidos vasculares y en las raíces de la planta. De la misma manera, los microorganismos *Phytophthora cactorum*, *P. citricola*, *P. parasitica*, y *P. megasperma* generan una atrofia general en las plantas de frutilla, decoloración café en los tejidos vasculares de la corona, formación de hojas pequeñas, y se generan raíces negras podridas. Finalmente, el hongo patógeno *Verticillium dahliae* provoca manchas parduscas en las hojas y raíces, una atrofia general en las plantas y también se produce una coloración café intervenal en el cuello y raíces (UC IPM, 2017).

1.7 Técnicas de aislamiento e identificación de microorganismos causantes de enfermedades vegetales

Una parte de la Fitopatología se centra en el estudio de los síntomas y los signos que producen los patógenos en las plantas al momento que son atacadas. El conocimiento exacto del patógeno es importante para establecer un correcto diagnóstico y plan de control de enfermedades. El síntoma es visto como una manifestación clara de una condición patológica en la planta, y mientras que un signo es una estructura del patógeno mismo, que se produce dentro o fuera de los tejidos vegetales. Los síntomas se clasifican en necrosis (muerte celular de los tejidos, órganos o planta), hipoplasias (reducción del desarrollo) e hiperplasias (aumento en el desarrollo). Es importante establecer que ciertos síntomas y enfermedades son fáciles de identificar a simple vista, mientras que para otras se necesita realizar una serie de actividades con el patógeno

como colecta, aislamiento, identificación, inoculación, reaislamiento y reidentificación. Dado a que muchos microorganismos fitopatógenos están estrechamente relacionados entre sí, para poder analizarlos se los necesita cultivar en medios de cultivo adecuados para obtener cultivos mixtos. Para aislar un determinado patógeno de una parte vegetal se hace asilamientos directos del tejido vegetal en medios de cultivo que contienen sustancias nutritivas para el crecimiento fitopatógeno. A partir de estos cultivos mixtos, se seleccionan y se traspasan las diferentes colonias a nuevos medios de cultivo para desarrollar medios de cultivo puros en donde solo crezca un determinado microorganismo. En el caso de los hongos fitopatógenos, cada microorganismo sospechoso aislado es analizado mediante el uso de microscopio y tinciones como lugol, azul de metileno y rojo congo (Cuervo Usán et al., 2002). Sin embargo, a parte de los métodos microscópicos, muchas veces se necesita realizar métodos moleculares que ayudan con la identificación fúngica. Por ejemplo, los síntomas de la pudrición vegetal provocado por los hongos *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum f. sp. Fragariae* son iguales, y se necesita realizar técnicas moleculares como PCR para poder identificar de manera exacta a qué tipo de hongo corresponde.

1.7.1 PCR (Polymerase Chain Reaction)

La técnica molecular denominada reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática en la cual se amplifica millones de veces un determinado segmento de ADN, obteniéndose varias copias fidedignas de una secuencia específica. La técnica aprovecha el ADN polimerasa una enzima que sintetiza de forma natural el ADN dentro de las células y utiliza al ADN genómico o ADN complementario como sustrato para producir la reacción, y así generar las copias de secuencias específicas de ADN. Los principales componentes para realizar esta técnica son: el ADN molde (ADN genómico

o ADN complementario), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) que son cuatro: timina, adenina, citosina y guanina, los oligonucleótidos o primers, *Taq* ADN polimerasa (enzima de ADN polimerasa que proviene de la bacteria termófila denominada *Thermus aquaticus*), la solución amortiguadora o buffer, agua de PCR estéril y el compuesto mineral cloruro de magnesio ($MgCl_2$). Todos estos elementos ya mencionados interactúan entre sí durante las tres fases que forman la técnica de PCR, y estas son: desnaturalización, hibridación y extensión. Dentro de los equipos llamados termocicladores se establecen las condiciones necesarias de temperaturas y tiempos ideales para que se produzca la amplificación de las secuencias de ADN requeridas. Al final, se realiza una verificación de la amplificación del ADN blanco de interés mediante el análisis de los productos de PCR en geles de agarosa (Tamay de Dios et al., 2013).

1.7.2 Región ITS

La región ITS (Internal Transcribed Spacer) es una secuencia del ADN ribosomal nuclear de los hongos que es muy útil para la identificación de los microorganismos fúngicos. La región es útil para análisis sistemáticos y moleculares a nivel de especies e incluso a nivel de cepas, dado que la región ITS tiene un alto nivel de variación comparado con otras regiones génicas de ADN ribosomal (región de larga subunidad y región de corta subunidad). La mayoría de laboratorios en el mundo hacen análisis moleculares con los primers estándares ITS1 e ITS4, analizando un segmento de ADN ribosomal de 600 pares de bases nitrogenadas y que contiene el gen 5.8S. Aunque también existen otros primers más selectivos que permiten una amplificación selectiva de las secuencias fúngicas (Kumar et al., 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Aislar e identificar molecularmente los agentes fúngicos presentes en los cultivos de frutilla de Yaruquí, Ecuador.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar los agentes fúngicos que se encuentran en las muestras de frutilla enfermas obtenidas de los cultivos de frutilla de Yaruquí.
- Caracterizar por microscopía los agentes fúngicos aislados.
- Identificar molecularmente los agentes fúngicos aislados mediante la secuenciación de la región ITS utilizando los primers universales ITS1 e ITS4.

3 JUSTIFICACIÓN

En el Ecuador, se ha producido una alta demanda comercial en el mercado nacional por la frutilla. Por ende, se ha producido un incremento en el área de cultivos de frutilla en haciendas ubicadas en la zona de Yaruquí, Pichincha. Sin embargo en Yaruquí, actualmente hay una enfermedad no reportada que provoca una disminución considerable en la producción y rendimiento de los cultivos de frutilla. El ciclo de vida comercial de una planta de frutilla sana es de 12 a 18 meses; sin embargo, en esta región el ciclo de vida disminuye a 6 a 8 meses por los problemas fitopatogénicos del sector. Esto ha provocado que los agricultores locales incrementen las aplicaciones de agroquímicos que tienen un impacto negativo para la salud humana y el medio ambiente, y sin que hayan conseguido erradicar la enfermedad de forma exitosa. La importancia de esta investigación, se basa en que la problemática del uso indiscriminado

de fungicidas y pesticidas para combatir las enfermedades que afectan a la planta de frutilla ha llegado a estados y números alarmantes. El ingeniero Walter Zarria, técnico del INIAP y del local de insumos agrícolas AGROSA del sector de Yaruquí, declaró que se cree que el 70% de los fungicidas y pesticidas son mal utilizados, debido a que los pequeños agricultores de la zona de Yaruquí desconocen qué patógenos afectan a sus cultivos, generando problemas ambientales, a la salud humana y aumentando los costos de producción. Igualmente, las entidades gubernamentales no han encontrado los posibles patógenos que afectan los cultivos de frutilla ni han establecido estrategias de control de la enfermedad (W. Zarria, comunicación personal, 01 de diciembre de 2015).

Actualmente, no existe una alternativa de control, ya que, se desconoce cuál es el agente causal. Esta es la razón por lo que se inicia esta investigación, para determinar el agente causal de esta enfermedad y para que futuras investigaciones puedan establecer un plan de manejo y de control de este problema fitosanitario. Primero en este estudio, se recolectó muestras de frutilla enfermas de la zona de Yaruquí, de las cuales se aisló los microorganismos asociados a plantas enfermas mediante el uso de técnicas *in vitro*. Finalmente, se identificó morfológicamente, microscópicamente y molecularmente a los microorganismos encontrados en las muestras enfermas de frutilla.

4 ÁREA DE ESTUDIO

Las muestras de plantas enfermas de frutilla utilizadas para este estudio se obtuvieron de un terreno utilizado para el cultivo de frutilla en la zona de rural Yaruquí, provincia de Pichincha, Ecuador. El terreno es de 1.600 m², en la cual se encuentran alrededor de 5.000 plantas de frutilla cultivadas de la variedad Albion importadas de Chile, distribuidas en 70 camas. Las coordenadas exactas de la ubicación del terreno

son: -0.163228, -78.328259. Las plantas enfermas de frutilla utilizadas para este estudio se cultivaron el 16 de diciembre del 2015 y se recolectaron el 6 de enero del 2016. Las plantas enfermas de frutilla obtenidas del terreno tenían los siguientes síntomas: marchitamiento del follaje, hojas café y secas, atrofia general, coloración café anaranjado en los tejidos vasculares del cuello y de las raíces. Se estimó que un 40% de plantas cultivadas por cama fueron afectadas por la enfermedad (W. Zarria, comunicación personal, 01 de diciembre de 2015). Posteriormente, las plantas enfermas de frutilla fueron transportadas y analizadas en el laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito. El proyecto cuenta con permiso del Ministerio de Ambiente del Ecuador, el número del contrato marco es MAE-DNB-CM-2016-0046.

5 MATERIALES

5.1 Recolección y desinfección de las muestras

- 8 plantas de frutilla enfermas
- Hipoclorito de sodio cloro 2.5%
- Alcohol 70%
- Agua destilada estéril
- Pinzas estériles
- Bisturís estériles
- Fundas Ziploc
- Cabina de bioseguridad BSL-II (Biobase)

5.2 Preparación de los medios de cultivo

- Medio PDA (Difco, 2016)
- Medio de agar Czapek (CZP) (Echandi, 1967): fosfato dipotásico, nitrato de sodio, sulfato de magnesio heptahidratado, cloruro de potasio, sulfato ferroso heptahidratado, sacarosa, agar y agua destilada
- Medio de jugo V-8 (Echandi, 1967): jugo V-8, maltosa, asparagina, extracto de malta, carbonato de calcio, agar y agua destilada
- Autoclave (MRC)
- Balanza Pioneer (Ohaus)
- Plancha agitadora (Boeco)
- Frascos de vidrio (Marienfeld)
- Gentamicina (Laboratorios MK)

5.3 Siembra del material en medios de cultivo

- Incubadora (Vindon Scientific)
- Bisturís estériles
- Cajas Petri plásticas
- Pinzas estériles
- Asas de inoculación
- Parafilm

5.4 Identificación microscópica de hongos con azul de metileno

- Cajas Petri plásticas
- Azul de metileno
- Cinta adhesiva

- Lupa
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Microscopio CX22 (Olympus)
- Cámara de fotos (Canon)

5.5 Extracción de ADN

- Kit de extracción de ADN PowerSoil® DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories)
- Centrifuga WiseSpin (Wisd Laboratory Instruments)
- Vortex (Scientific Industries)
- Timer (Control Company)

5.6 Amplificación de la región ITS mediante PCR

- Puntas (10µl, 100µl, 1000µl) (Corning Incorporated)
- Tubos de microcentrífuga (1.5ml, 2ml) (Quality Scientific Plastics)
- Tubos de PCR (Quality Scientific Plastics)
- Pipetas automáticas de 0.5-10µl, 10-100µl y 100-1000µl (Lambda Plus)
- Parafilm
- Ladder 100 bp (Invitrogen)
- SYBR Safe – DNA Gel Stain (Invitrogen)
- 5X Green Go Taq Flexi Buffer (Promega)
- Buffer 10X (Invitrogen)
- MgCl₂ (Invitrogen)
- dNTPs (Invitrogen)

- Primer ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) (Invitrogen)
- Primer ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Invitrogen)
- *Taq* DNA Polymerasa (Invitrogen)
- Cabina de bioseguridad BSL-II (Biobase)
- Vortex (Scientific Industries)
- Refrigeradora/congeladora (Mabe)
- Termociclador Multigene (Labnet)
- Electroforesis Gel XL Enduro (Labnet)
- Fotodocumentador Enduro GDS (Labnet)

5.7 Purificación y cuantificación de productos de PCR del ADN fúngico

- Kit de purificación PCR Purification Combo Kit (Invitrogen)
- Centrifuga WiseSpin (Wisd Laboratory Instruments)
- Vortex (Scientific Industries)
- Timer (Control Company)
- NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Electroforesis Gel XL Enduro (Labnet)
- Fotodocumentador Enduro GDS (Labnet)

6 MÉTODOS

6.1 Recolección y desinfección de las muestras

Se recolectó 8 plantas de frutilla de la zona de rural Yaruquí, provincia de Pichincha, Ecuador que presentaban la sintomatología. Las plantas de frutilla enfermas tenían los siguientes síntomas: marchitamiento del follaje, hojas café y secas, atrofia

general, coloración café anaranjado en los tejidos vasculares del cuello y de las raíces. Las plantas de frutilla enfermas fueron transportadas en fundas Ziploc correctamente cerradas, desde el área de estudio en Yaruquí hasta el laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la Universidad San Francisco de Quito. El mismo día en el laboratorio, se lavó con agua potable durante 1 minuto toda la planta. Dentro de la cámara de flujo laminar, se hizo una disección de la parte de los cuellos de cada una de las plantas de frutilla. Se utilizó el protocolo establecido en el estudio de Fraire et al. (2003), con ciertas modificaciones. Primero, se realizó un lavado de los cuellos con cloro a una concentración del 2.5% durante 1 minuto y se secó los excesos del lavado con papel absorbente estéril. Después, se efectuó un nuevo lavado de los cuellos con alcohol a una concentración del 70% durante 1 minuto y se secó los excesos del lavado con papel absorbente estéril. Finalmente, se hizo un último lavado de los cuellos con agua destilada estéril durante 1 minuto y se secó nuevamente con papel absorbente estéril.

6.2 Preparación de medios de cultivo

Primero, se pesó con una balanza todos los compuestos de cada medio de cultivo (tabla 1). Luego, se los añadió a los frascos de vidrio de 1 litro, dejando siempre para el final la adicción del agua destilada estéril. Después, se calentó con agitación los frascos de vidrio hasta al punto de que hiervan todas las mezclas usando las planchas con agitación. Una vez que llegaron las mezclas a su punto de ebullición, se ingresó los frascos de vidrio al autoclave y se los autoclave por 20 minutos a una temperatura de 121 °C y a una presión de 1 atm. Finalmente, a los medios de cultivo se los dispensó en cajas Petri dentro de la cámara de seguridad y se añadió una dosis de 160 mg/ml de gentamicina para controlar la contaminación por bacterias en las cajas Petri.

6.3 Siembra del material en medios de cultivo

De los ocho cuellos de plantas de frutilla ya desinfectados, se sembró un pedazo de explante de cuello de 1 cm de largo por 1 cm de ancho, en cada uno de los tipos de medios de cultivo (PDA, CZP y V-8), con la finalidad de realizar el aislamiento de los agentes patogénicos fúngicos (Echandi, 1967). Los medios de cultivos fueron almacenados dentro de una incubadora a una temperatura de 28 °C durante 10 días luego de su inoculación inicial. En el caso de los hongos, se realizó subcultivos sucesivos hasta que se obtuvo una sola morfología por cada caja Petri. Las bacterias y otros tipos de microorganismos encontrados en los medios de cultivo fueron descartados.

Tabla 1. Componentes de los medios de cultivos PDA, Czapek y V-8.

Medio PDA (Difco, 2016)	
Agar	15g
Agua destilada	1000ml
Dextrosa	20g
Almidón de patata	4g

Medio de agar Czapek (CZP) (Echandi, 1967)	
Fosfato dipotásico	1g
Nitrato de sodio	2g
Sulfato de magnesio heptahidratado	0.5g
Cloruro de potasio	0.5g
Sulfato ferroso heptahidratado	0.01g
Sacarosa	30g
Agar	15g
Agua destilada	1000ml

Medio de jugo V-8 (Echandi, 1967)	
Jugo V-8	200ml
Maltosa	20g
Asparagina	1g
Extracto de malta	10g
Carbonato de calcio	3g
Agar	15g
Agua destilada	800ml

6.4 Identificación microscópica de hongos con azul de metileno

Después de 10 días de su inoculación inicial, se tomó muestras de micelio y de conidios de cada una de las cajas Petri mediante el uso de una cinta adhesiva, y se las puso en placas portaobjetos con azul de metileno para un posterior análisis microscópico. Mediante el uso de un microscopio se visualizó las estructuras morfológicas de cada uno de los hongos encontrados. Posteriormente, se fotografió las estructuras fúngicas a un aumento de 40X. Finalmente, en base a la visualización microscópica y a la identificación morfológica se agrupó a los hongos que presentaban fenotipos iguales (Pastrana et al., 2014).

6.5 Extracción de ADN

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit de extracción PowerSoil DNA Isolation Kit (MO BIO laboratories), siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.6 Amplificación de la región ITS mediante PCR

A partir de las muestras de ADN genómico obtenidas, se realizó la técnica molecular de PCR y se utilizó los primers universales ITS1 e ITS4 para el análisis de hongos. El primer ITS1 es una secuencia (5' a 3') de TCCGTAGGTGAACCTGCGG y

su dirección de amplificación es hacia adelante. El primer ITS4 es una secuencia (5' a 3') de TCCTCCGCTTATTGATATGC y su dirección de amplificación es hacia atrás (Kumar et al., 2005). El master mix de PCR se preparó en base los reactivos y concentraciones de la tabla 2. Luego, los componentes del master mix se dividieron en reacciones individuales dentro de los tubos de PCR y se colocó el ADN fúngico de interés. Se puso los tubos de PCR en el termociclador programado según los tiempos y temperaturas de la tabla 3 (Falcón et al., 2007), (Pastrana et al., 2014).

Tabla 2. Componentes para la preparación del master mix de PCR.

Componente	Reacción (µl)
ADN (50 ng/µl)	2
10X Buffer	5
dNTPs (10mM)	2
MgCl ₂	4
Primer ITS1 (10 pmol)	2
Primer ITS4 (10 pmol)	2
TAQ polimerasa	1
H ₂ O de PCR estéril	32
TOTAL	50

Tabla 3. Programación de termociclador para realizar PCR de primers ITS.

Procesos	Temperaturas (°C)	Tiempos (min)	# de ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	94	1	35
Anillamiento	55,1	2	35
Extensión	72	2	35
Extensión final	72	5	1

Finalmente, se realizó una electroforesis con geles de agarosa al 2% durante 30 minutos a 80 mv para comprobar la correcta amplificación del segmento ribosomal en

600 bp. Mediante el uso de un fotodocumentador, se observó la presencia de la banda en el tamaño esperado (Tamay de Dios et al., 2013).

6.7 Purificación y cuantificación de productos de PCR del ADN fúngico

A partir de los productos de PCR obtenidos se realizó la purificación de los mismos mediante el uso de un kit de purificación PCR Purification Combo Kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones que establece el manual del fabricante. Finalmente, los productos de PCR ya purificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% durante un periodo de 30 minutos a 80 mv. Luego, los geles de agarosa fueron fotografiados con el fotodocumentador. En el último paso, se hizo una cuantificación de los productos de PCR purificados con el NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), previo al procedimiento de secuenciación (Tamay de Dios et al., 2013).

6.8 Preparación de muestras para secuenciación y análisis bioinformático

Posteriormente, se envió los productos de PCR de las muestras de ADN amplificadas a Macrogen (Corea del Sur). La empresa Macrogen realizó la secuenciación mediante la técnica de dideoxinucleótidos o Sanger (OpenStax CNX, 2016). A las secuencias obtenidas, se les hizo análisis bioinformáticos posteriores utilizando los programas Mega7 y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para determinar la especie de los agentes fúngicos que se aislaron de las muestras analizadas.

6.9 Revisión bibliográfica de cada uno de los microorganismos fúngicos aislados

Finalmente, se realizó una revisión bibliográfica de cada una de las especies fúngicas encontradas en bases de datos como SCOPUS o PUBMED, y a su vez se analizó sus utilidades e incidencias en cultivos de frutilla o en otros cultivos de interés.

7 RESULTADOS

7.1 Recolección y desinfección de la muestra

Primero, se recolectó 8 plantas enfermas que mostraban la sintomatología mostrada en la Figura 4. Se observó los siguientes síntomas en las plantas enfermas de campo: un marchitamiento del follaje, un secado y un color café en las hojas más viejas, un lento crecimiento y una atrofia general de la planta. Cuando se realizó la disección de los cuellos de las plantas enfermas, ya sea en el campo o en el laboratorio, se vio la aparición de una coloración café anaranjada en los tejidos vasculares y de raíces, lo que provoca una obstrucción del paso de fluidos en el sistema vascular de la planta (Figura 5).

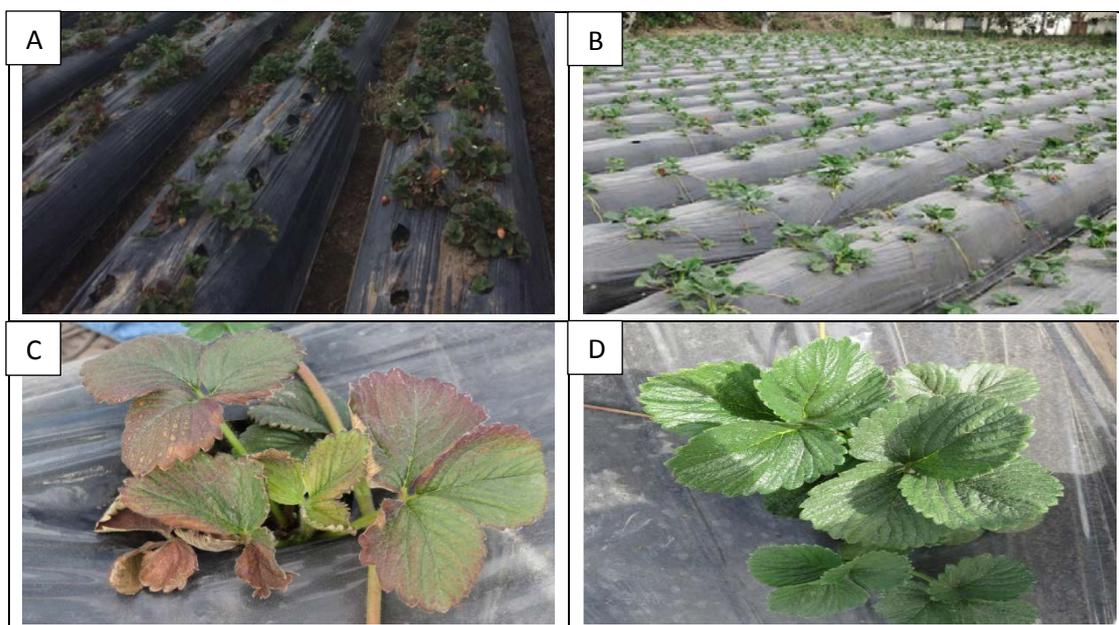




Figura 4. Fotografías de las plantas de frutilla enfermas y sanas con el mismo tiempo de crecimiento: **A)** Foto de plantas enfermas en el campo, **B)** Foto de plantas sanas en el campo, **C)** Foto cercana de la sintomatología de una planta enferma, **D)** Foto cercana de una planta sana, **E)** Foto de planta enferma tomada en laboratorio, y **F)** Foto de planta sana tomada en laboratorio.

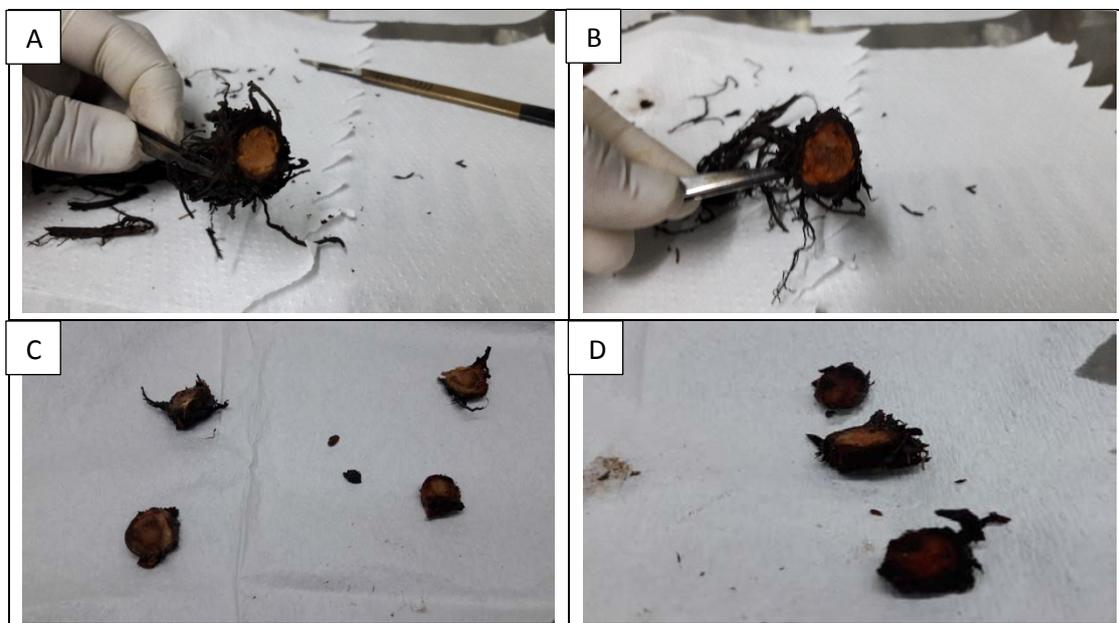


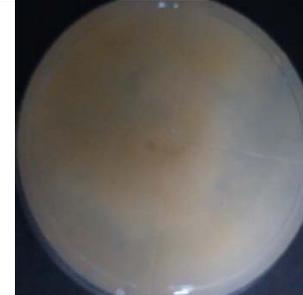
Figura 5. Fotografías del proceso de desinfección e inoculación de cuellos de frutilla en los medios de cultivo: **A)** Foto de corte transversal de la región del cuello de una planta enferma, **B)** Foto de corte transversal de la región del cuello de otra planta enferma, **C)** Foto de varios explantes de cuello de una planta enferma listos para ser desinfectados, y **D)** Foto de varios explantes de cuello de otra planta enferma listos para ser desinfectados.

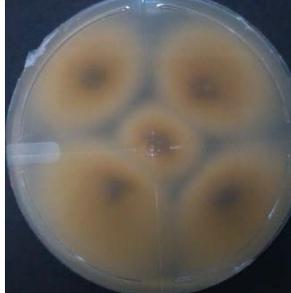
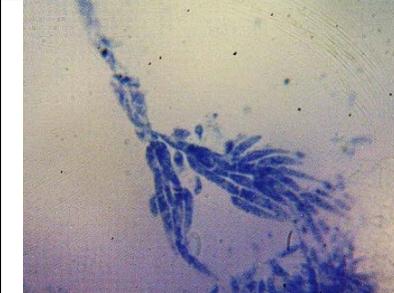
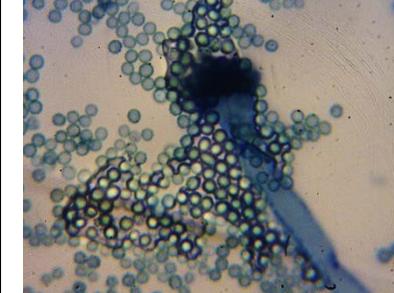
7.2 Identificación morfológica y microscópica de hongos con azul de metileno

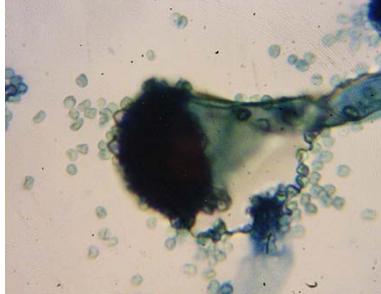
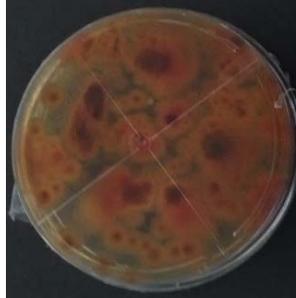
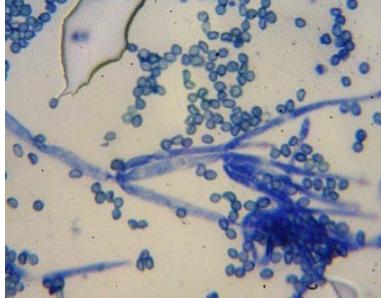
Después que se obtuvieron cepas puras de los diferentes hongos encontrados, se identificó y se clasificó en 12 grupos fenotípicos en base a las similitudes en morfologías de las colonias y microscopia (tabla 4).

Tabla 4. Identificación fenotípica y microscópica de los microorganismos encontrados en los medios de cultivos Czapek, V-8 y PDA.

Descripción	Vista superior	Vista inferior	Microscopia (40X)	Fenot.
<p>Micelio blanco algonadozo. La base es de color blanca. Se presentan esporas con zonas de mayor tinción. El hongo se cultivó en medio V-8.</p>				F1
<p>Micelio blanco de centro sólido crema con bordes algonadozos, con base blanca con bordes oscuros. El hongo se cultivó en medio PDA.</p>				F2
<p>Micelio blanco grisacio, poco compacto de conformación polvosa. La base es de color café obscura que se extiende del centro hacia fuera. El hongo se cultivó en medio PDA.</p>				F3

Descripción	Vista superior	Vista inferior	Microscopia (40X)	Fenot.
<p>Micelio blanco sólido. La base es de color crema con halo céntrico oscuro. Se presentan esporas con mayor tinción en los bordes. El hongo se cultivó en medio PDA.</p>				F4
<p>Micelio blanco algonadozo sólido con bordes negros al madurar. La base es de color rosada. El hongo se cultivó en medio V-8.</p>				F5
<p>Micelio crema algonadozo con aglutinaciones semisólidas. La base es de color café claro. El hongo se cultivó en medio Czapek.</p>				F6

Descripción	Vista superior	Vista inferior	Microscopia (40X)	Fenot.
<p>Micelio blanco algonadozo. La base es de color negra. El hongo se cultivó en medio Czapek.</p>				F7
<p>Micelio blanco/crema algonadozo. La base es de color negro céntrico hacia los bordes. El hongo se cultivó en medio Czapek.</p>				F8
<p>Micelio verde polvoso, con alta cantidad de esporas. La base es de color crema centro sólido con bordes algonadozos. El hongo se cultivó en medio Czapek.</p>				F9

Descripción	Vista superior	Vista inferior	Microscopia (40X)	Fenot.
<p>Micelio verde polvoso, con alta cantidad de esporas. La base es de color crema penetrado hacia el medio. El hongo se cultivó en medio PDA.</p>				F10
<p>Micelio verde polvoso, con alta cantidad de esporas. La base es de color café claro. El hongo se cultivó en medio Czapek.</p>				F11
<p>Micelio verde polvoso, con alta cantidad de esporas. La base es de color rojo intenso. El hongo se cultivó en medio PDA.</p>				F12

7.3 Identificación molecular mediante la amplificación del ADN ribosomal con los primers ITS1 e ITS4

Después de realizar la amplificación de la región ITS con los primers universales ITS1 e ITS4 y de purificar los productos de PCR obtenidos, se realizó la siguiente electroforesis comprobatoria de la existencia de bandas esperadas en 600pb para cada fenotipo aislado y del éxito del proceso de la técnica de PCR (Figura 6).

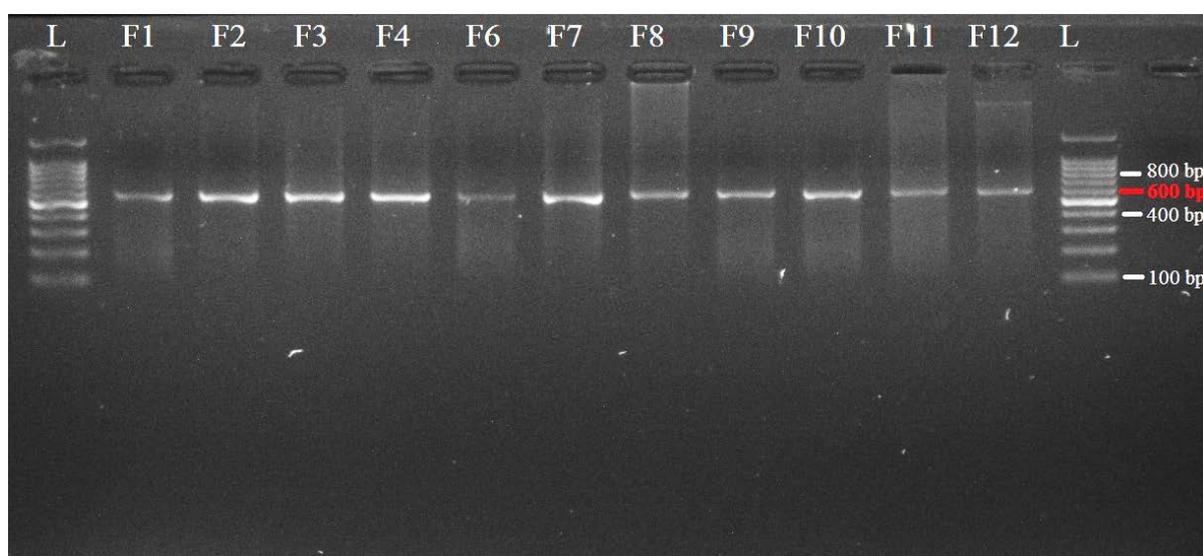


Figura 6. Fotografía del gel de agarosa para comprobación de la amplificación de ADN ribosomal con los primers ITS1 e ITS4 para los fenotipos F1, F2, F3, F4, F6, F7, F8, F9, F10, F11 y F12 (L = Ladder).

Luego, se obtuvo las secuencias de nucleótidos de los productos de PCR enviados a Macrogen (Corea) y se las analizaron usando los programas BLAST y Mega7, para obtener la identificación molecular de cada aislado (Tabla 5) con un porcentaje de identidad entre el 99 y 100%. Sin embargo, la muestra F8 (*Clonostachys rosea*) solo tiene un porcentaje de identidad del 93%, por lo que se debería realizar un nuevo análisis para esta muestra usando otros marcadores.

Tabla 5. Identificación molecular de los hongos aislados utilizando los primers ITS1 e ITS4.

Aislado	Identificación	# de pares de base	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Identidad	Accesión
F1	<i>Clonostachys byssicola</i>	390	658	658	100%	0	100%	KJ499908.1
F2	<i>Bionectria ochroleuca</i>	462	883	883	100%	0	99%	HQ022467.1
F3	<i>Bionectria ochroleuca</i>	440	840	840	100%	0	99%	HQ022467.1
F4	<i>Clonostachys byssicola</i>	307	567	567	100%	4,00E-158	99%	KJ499908.1
F5	<i>Xylaria venosula</i>	466	856	856	100%	0	98%	JN182892.1
F6	<i>Bionectria ochroleuca</i>	409	775	775	100%	0	99%	HQ157202.1
F7	<i>Fusarium solani</i>	461	887	887	100%	0	100%	KX262971.1
F8	<i>Clonostachys rosea</i>	430	623	623	96%	1,00E-174	93%	KJ941018.1
F9	<i>Aspergillus fumigatus</i>	474	912	912	100%	0	100%	KY486782.1
F10	<i>Aspergillus fumigatus</i>	434	835	835	100%	0	100%	KX274468.1
F11	<i>Aspergillus fumigatus</i>	268	510	510	100%	9,00E-141	99%	KT819144.1
F12	<i>Penicillium pinophilum</i>	439	844	844	100%	0	100%	GQ337428.1

En base a la identificación molecular, se determinó que de los 12 fenotipos previamente aislados se los agrupo en 7 especies después del análisis molecular, a los cuales se les realizó un análisis en literatura sobre sus principales características reportadas.

Tabla 6. Revisión bibliográfica de cada uno de los hongos aislados encontrados en las muestras de frutilla estudiadas.

Hongo Identificado	Cultivo Identificado	Origen	Tipo de Interacción	Descripción	Referencia
<i>Clonostachys byssicola</i>	Cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	Costa Rica, Perú	Benéfico	Micoparasitismo por <i>Clonostachys byssicola</i> en <i>Trichoderma</i> spp.	Krauss et al., 2013
	Banana Cavendish (<i>Musa acuminata</i>)	Filipinas	Benéfico	<i>Clonostachys</i> spp. aisladas de la superficie de los plátanos son altamente antagónica a la pudrición de corona causada por hongos patógenos.	Alvindia et al., 2011
	Cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	Panamá	Benéfico	Hongo endófito que reduce <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Phytophthora palmivora</i> .	Krauss et al., 2006
	Árboles de cacao de monte (<i>Theobroma gileri</i>)	Ecuador	Benéfico	El complejo fúngico de las especies <i>Clonostachys</i> y <i>Trichoderma</i> tiene un alto grado de micoparasitismo contra el hongo patogénico <i>Crinipellis roreri</i> .	Evans et al., 2003
<i>Clonostachys rosea</i>	Guisante (<i>Pisum sativum</i> L.)	Canadá	Benéfico	Control biológico de patógenos causantes de pudrición de corona en guisantes mediante el uso de <i>Clonostachys rosea</i> .	Xue, 2003
	Pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	China	Benéfico	La aplicación del químico fumigante dazomet con <i>Clonostachys rosea</i> se usa para combatir la marchitez en el pepino causada por <i>Fusarium</i> sp.	Tian et al., 2014
	Cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	Panamá	Benéfico	Impide el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>Moniliophthora roreri</i> y <i>Moniliophthora perniciosa</i> y reduce sus síntomas de la enfermedad.	Mejía et al., 2008
	Geranio (<i>Geranium</i> sp.), rosa miniatura (<i>Rosa x hybrida</i>), pepino (<i>Cucumis sativus</i>)	Estados Unidos	Benéfico	Promueve el crecimiento y la productividad de los geranios, las rosas miniatura y los pepinos, en ausencia o cerca de la ausencia total de patógenos.	Sutton et al., 2008

Hongo Identificado	Cultivo Identificado	Origen	Tipo de Interacción	Descripción	Referencia
<i>Fusarium solani</i>	Frutilla (<i>Fragaria × ananassa</i>)	España	Patógeno	Primer informe de <i>Fusarium solani</i> que provoca la pudrición de la corona y de la raíz en cultivos de frutilla.	Pastrana et al., 2014
	Pera asiática (<i>Pyrus pyrifolia</i>)	China	Patógeno	Primer informe de pudrición de raíz en pera asiática provocado por <i>Fusarium solani</i> .	Zhu et al., 2017
	Cacao (<i>Theobroma cacao</i>)	Panamá	Benéfico	Hongo endófito que en presencia de otros hongos competidores nativos controla <i>Moniliophthora roreri</i> .	Mejía et al., 2008
	Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	Camerún	Patógeno	Provoca los síntomas de clorosis de las hojas, bajo crecimiento, defoliación prematura, y la muerte de la planta en ciertos casos.	Eke et al., 2016
<i>Penicillium pinophilum</i>	Granada (<i>Punica granatum</i> L.)	India	Benéfico	Su inoculación en suelo aumenta la absorción de nutrientes (N, P y K), mejorando su crecimiento vegetal.	Maity et al., 2014
	Frutilla (<i>Fragaria x ananassa</i> Duch. CV.)	China	Benéfico	Las micorrizas formadas por <i>Penicillium pinophilum</i> incrementan el crecimiento, la tasa de fotosíntesis y la absorción de nutrientes.	Fan et al., 2008
	Tomate (<i>Solanum</i> sp.) y algodón (<i>Gossypium</i> sp.)	Israel	Patógeno	Patógeno menor que invadió las raíces y causó retardo en el crecimiento de plantas de tomate y algodón.	Gamliel et al., 1993
	Manglares (<i>Avicennia schaueriana</i> , <i>Laguncularia racemosa</i> y <i>Rhizophora mangle</i>)	Brasil	Saprófito	Reportado por primera vez como un hongo endófito de las hojas de los manglares en las regiones tropicales.	Costa et al., 2012

Hongo Identificado	Cultivo Identificado	Origen	Tipo de Interacción	Descripción	Referencia
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	Corea	Benéfico	Su inoculación promueve los atributos de crecimiento como biomasa, contenido de clorofila y longitud de brote.	Waqas et al., 2014
	Soya (<i>Glycine max</i>)	Corea	Benéfico	Hongo endófito que produce giberelinas que promueven el crecimiento vegetal.	Hamayun et al., 2009
	Haba (<i>Vicia faba</i> L.)	Egipto	Benéfico	Incrementó significativamente los niveles de fósforo (P) y nitrógeno (N) disponibles en el suelo, en comparación con suelo sin tratar.	Mehana et al., 2002
	Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Alemania	Benéfico	Aumentó el peso seco de las raíces y brotes, la longitud de las raíces, la fosfatasa en la rizósfera y las concentraciones de P, Cu y Zn en las ramas.	Tarafdar et al., 1995
<i>Xylaria venosula</i>	Guayabo blanco (<i>Eugenia uruguayensis</i>)	Uruguay	Saprófito	Se encuentran en los tejidos de la corteza, de las hojas y del fruto, pero hay una menor diversidad en los peciolo.	Tiscornia et al., 2012
	Palo Brasil (<i>Haematoxylon brasiletto</i> Karst)	Brasil	Benéfico	Producen metabolitos que tienen efectos antimicóticos, contra los oomicetos, y fitotóxicos.	Sánchez-Ortiz et al., 2016
	Árboles dicotiledóneos (<i>Neolitsea scrobiculata</i>)	India	Saprófito	Tiene una actividad antibacteriana, antifungal y contra las algas. También produce las enzimas extracelulares: celulosa, lacasa, lipasa y pectato transeliminasa	Govinda Rajulu et al., 2013
	Árboles maderables asiáticos.	Tailandia, Filipinas	Saprófito	Hongos endófitos identificados a nivel molecular tuvieron gran similitud en las características morfológicas como el ápice apical, la estructura estromal y la hendidura germinal de las ascosporas.	Velmurugan et al., 2013

Hongo Identificado	Cultivo Identificado	Origen	Tipo de Interacción	Descripción	Referencia
<i>Bionectria ochroleuca</i>	Arboles silvestres medianos (<i>Nothapodytes foetida</i>)	India	Benéfico	Produce metabolitos antifúngicos, antimicrobiales (acetato de etilo) y anti-dermatofíticos.	Samaga et al., 2003
	Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>)	Túnez	Benéfico	Promueve el crecimiento de la planta y la protege de agentes causantes de plagas como el pulgón de la alcachofa (<i>Capitophorus elaeagni</i>).	Guesmi-Jouini et al., 2014
	Cactus cardón (<i>Pachycereus pringlei</i>) y semillas de canola (<i>Brassica napus</i> L.)	México	Patógeno	Causante de la enfermedad apical de la pudrición del tallo de los cactus y provoca pudrición de semillas en canola	Holguín-Peña et al., 2012
	Maní (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	China	Patógeno	Mayor abundancia relativa de hongos patógenos en suelos de cultivos de maní que fueron consecutivamente utilizados como monocultivos durante 5 años.	Li et al., 2014

8 DISCUSIÓN

8.1 Análisis de la sintomatología y del aislamiento de los microorganismos encontrados

Los síntomas encontrados en los cultivos de frutilla del área de Yaruquí son similares a los que se reporta en estudios sobre patogenicidad fúngica en cultivos de frutilla; por ejemplo, en un estudio que fue el primer reporte de *Fusarium solani* en los cultivos de frutilla (*Fragaria × ananassa*) en España, estableció que este hongo patogénico provocó síntomas de enfermedad como marchitamiento de follaje, lentitud en el crecimiento y secado general de la planta, muerte de las hojas más viejas, y en los tejidos vasculares y corticales de las coronas de la planta tienen una decoloración anaranjada a café en las plantas (Pastrana et al., 2014). Por ende, se puede establecer que el patógeno *Fusarium solani* es un posible agente causal de la enfermedad en los cultivos de frutilla en Yaruquí. Futuros estudios de patogenicidad establecerán si este es el agente causal de la enfermedad en plantas de frutilla.

Otro estudio que sirvió para evaluar la metodología de aislamiento e identificación de hongos en plantas de frutilla, determinó que las micorrizas formadas por el hongo benéfico *Penicillium pinophilum* incrementan el crecimiento, la tasa de fotosíntesis y la absorción de nutrientes. En dicho estudio, realizado en campos de frutilla en China, primero se formó micorrizas arbusculares de *Penicillium pinophilum* con las raíces de frutilla “Zoji” (*Fragaria × ananassa* Duch. CV.); y luego, se inoculó a las plantas sanas de frutilla con mezclas de raíz con suelo o con hifas frescas previamente cultivadas en medios de cultivo PDA. Las micorrizas son asociaciones simbióticas entre las raíces vegetales y hongos que ocurren de forma natural. Se realizó una identificación molecular utilizando primers universales ITS1 e ITS4, como en nuestro estudio. En comparación con plantas de frutilla sin inocular, el contenido de nitrógeno aumentó a un 47%, el contenido de fósforo incrementó un 57% y la tasa de fotosíntesis creció a un 71% (Fan et al., 2008). Una gran ventaja de utilizar esta cepa

de *Penicillium pinophilum*, es su facilidad de inocular y crecer en medios de cultivo, obteniéndose beneficios importantes en el crecimiento de las plantas de frutilla. Por lo tanto, las muestras de *Penicillium pinophilum* obtenidas en nuestro estudio pueden ser utilizadas para la formación de micorrizas de raíces de frutilla, y usarlas como sustratos para el crecimiento de plantas de frutilla sin enfermedad en la zona de Yaruquí.

En otro estudio realizado en Corea, se evaluó el potencial biológico que tienen ciertos microorganismos endófitos obtenidos a partir de las raíces de soya (*Glycine max* (L.) Merr.), y pepino (*Cucumis sativus*) aplicados en cultivos de arroz (*Oryza sativa*). Se encontró que la especie *Aspergillus fumigatus*, presente también en nuestro estudio, estimula ciertos atributos de crecimiento vegetal como biomasa, contenido de clorofila y longitud de brote en un tipo de arroz mutante y de arroz silvestre. Los hongos endófitos analizados (*Chrysosporium pseudomerdarium*, *Aspergillus fumigatus* y *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Phoma glomerata*, y *Paecilomyces formosus*) fueron crecidos en caldos de cultivo de Czapek y de PDA, produciendo una variedad de biomasa de micelio. Mediante el uso de análisis cromatográficos avanzados, los cultivos de hongos endófitos indican una producción de giberrelinas GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ y GA₉. Es importante recalcar que el potencial bioquímico de los hongos endófitos varía ampliamente dependiendo del pH y de la fuente de nutrientes. Por eso, es importante utilizar un caldo Czapek con los hongos endófitos, ya que es un medio rico en carbonos y estimula la producción de metabolitos secundarios (Waqas et al., 2014).

8.2 Análisis de la identificación molecular de los microorganismos encontrados

En los resultados de la secuenciación se puede observar que la muestra *Clonostachys rosea* (F8) tiene un porcentaje de identificación del 93% posiblemente por algún problema en el proceso de amplificación, cuantificación o secuenciación. Mientras que

el resto de muestras tienen un porcentaje de identificación entre 99-100%. Lo que nos indica un alto grado de exactitud y de veracidad de los resultados moleculares.

Un factor importante que pudo afectar al éxito de las reacciones de secuenciación para la muestra *Clonostachys rosea* (F8) es la inadecuada cuantificación del ADN. Debido a que si la muestra tiene una cantidad de ADN inferior a la necesaria, con toda seguridad la secuenciación va a fallar y producirá resultados con errores, baja señal, ambigüedades o ruido de fondo. A partir de las secuencias enviadas por la empresa Macrogen, se obtuvieron unos cromatogramas correctos pero tenían la presencia de mucho ruido en el fondo. Al final, es importante recordar que la calidad de los resultados depende altamente de la pureza y de la adecuada cuantificación de las muestras de ADN estudiadas. Por lo tanto, se recomienda usar protocolos de extracción, amplificación, purificación y cuantificación adecuados que permitan verificar la concentración y la integridad de cada una de las muestras analizadas (Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sois”, 2006). No obstante, se debe volver a analizar la muestra *Clonostachys rosea* (F8) con otros primers y tener precaución con los puntos previamente mencionados para obtener un mayor porcentaje de identificación.

8.3 Análisis bibliográfico de los microorganismos fúngicos obtenidos con las técnicas moleculares

En base a los resultados obtenidos de forma molecular es necesario analizar a cada una de las especies de hongos identificadas para corroborar la validez del estudio en los cultivos de frutilla. A las 7 especies fúngicas que se obtuvo en los análisis moleculares, se las clasificó en microorganismos benéficos, patógenos o saprófitos, según la revisión bibliográfica previamente realizada (Tabla 6). Los microorganismos fúngicos *Clonostachys rosea*, *Clonostachys byssicola*, *Xylaria venosula* y *Aspergillus fumigatus* son normalmente

considerados como hongos endófitos benéficos, que no tienen reportes de patogenicidad en plantas. Mientras que los hongos *Penicillium pinophilum*, *Fusarium solani* y *Bionectria ochroleuca* tienen algunos estudios en los cuales actúan como patógenos para las plantas. Además, es importante entender la cercana relación que existe entre las especies *Clonostachys* y *Bionectria*. El género *Bionectria* está conformado por especies anamórficas (hongos en estadio reproductivo asexual) como *Clonostachys*, y especies teleomórficas (hongos en estadio reproductivo sexual) como *Bionectria* (Samaga et al., 2003). Entonces según la clasificación taxonómica, el mismo hongo tiene un estadio anamorfo en el cual la especie se denomina *Clonostachys byssicola* y en su estadio teleomorfo se llama *Bionectria byssicola*. Lo mismo sucede para otra especie fúngica que en su estadio anamorfo se denomina *Clonostachys rosea*, mientras que en su estadio teleomorfo se llama *Bionectria ochroleuca* (Alvindhia et al., 2011). La especie *Bionectria ochroleuca* es considerada un hongo endófito que produce una serie de metabolitos secundarios de gran interés humano. Por ejemplo en el campo de la medicina, se encontró que *Bionectria ochroleuca* es un hongo endófito foliar de los árboles silvestres medianos *Nothapodytes foetida* de la India, y que produce metabolitos antifúngicos, antimicrobiales (acetato de etilo) y anti-dermatofíticos. Se concluyó que esta especie fúngica es un potencial biofumigante de alta efectividad. Este estudio es doblemente importante ya que se quiere realzar la importancia de conservar los árboles asiáticos *Nothapodytes foetida*, debido a que son una fuente importante de alcaloides antineoplásicos tales como camptotecina, 9-metoxicamptotecina y 9-metoxi-20-O-acetilcamptotecina, los cuales tienen propiedades antivirales, antimicrobiales y anticancerígenas (Samaga et al., 2003). Igualmente otro estudio, establece que el hongo *Bionectria ochroleuca* es un hongo endófito que ocurre en el suelo y en las hojas de los campos silvestres de alcachofa (*Cynara scolymus*) en Túnez. Se ha establecido que este hongo promueve el crecimiento de la planta de la alcachofa y la protege de agentes causantes

de enfermedades y de plagas como el pulgón de la alcachofa (*Capitophorus elaeagni*) (Guesmi-Jouini et al., 2014).

Por otro lado, existen estudios que indican que la especie *Bionectria ochroleuca* es la causante de la enfermedad apical de la pudrición del tallo en los cactus cardón (*Pachycereus pringlei*) en México. También se establece que esta misma especie es conocida como un patógeno de plantas que provoca pudrición de semillas en canola (Holguín-Peña et al., 2012). En un estudio en el cual se analizaba las comunidades de hongos del suelo y su función ecológica en los suelos y en la salud de las plantas en el sur de China, se encontró que había una mayor abundancia relativa de hongos patógenos como *Fusarium oxysporum*, *Leptosphaerulina australis*, *Phoma* sp., y *Bionectria ochroleuca* en suelos de cultivos de maní (*Arachis hypogaea* L.) que fueron consecutivamente utilizados como monocultivos durante 5 años. La abundancia era mayor que la de ciertos hongos benéficos como *Trichoderma* sp., o *Mortierella elongata*. La investigación señaló que la acumulación continua de cargas de hongos patógenos en los suelos es la posible explicación de la repentina baja en la producción y rendimiento de los cultivos de maní (Li et al., 2014).

Entre los microorganismos fúngicos encontrados a nivel molecular en este estudio, muchos son hongos endófitos y beneficiosos en el manejo de cultivos de plantas de alto interés humano. Por ejemplo, la planta de cacao (*Theobroma cacao*) es un vegetal comercial y apetecido a nivel mundial por sus granos que son utilizados para la fabricación del chocolate. En general, a nivel mundial existe una pérdida de rendimiento y de productividad mayor al 30% debido a las enfermedades que atacan a la planta cacaotera. Mientras que a nivel de Latinoamérica y de África Occidental, los pequeños agricultores locales han sufrido una clara disminución en la calidad de sus granos de cacao. Las enfermedades más destructivas a nivel mundial son las provocadas por ciertas especies de *Phytophthora*, y por el patógeno invasivo *Moniliophthora roreri* en las vainas de cacao. Por ende, en la actualidad se

busca agentes biológicos de control como *Clonostachys rosea* o *Clonostachys byssicola*, que fueron encontrados en este estudio, que ayuden a disminuir o controlar la proliferación de estos patógenos invasivos en plantas comerciales como las de cacao o frutilla (Krauss et al., 2013). Por ende, se puede establecer que estos hongos benéficos pueden ser utilizados para proteger a las plantas contra el ataque de patógenos invasivos, mejorando la producción y rendimiento de los cultivos.

Ciertos estudios como Mbarga et al. (2014) y Krauss et al. (2006) establecen que el uso de *Clonostachys rosea* y *Clonostachys byssicola* en combinación con *Trichoderma asperellum*, *Fusarium* sp., y otros microorganismos fúngicos competidores endófitos han controlado exitosamente al patógeno *Moniliophthora roreri*. Esto se debe a que estos hongos endófitos tienen un alto grado de actividad colonizadora y parasítica ante este patógeno. Además, se ha establecido que los hongos endófitos *Clonostachys rosea* y *Clonostachys byssicola* también disminuyen la enfermedad conocida como pudrición parda de la mazorca que ataca principalmente al fruto del cacao en ciertas áreas de Panamá (Krauss et al., 2006). Otro ejemplo de planta de alto valor comercial es la de la Banana Cavendish (*Musa acuminata*), en la cual también se ha encontrado que las especies de *Clonostachys byssicola* obtenidas de la superficie de las bananas son altamente antagonistas contra los patógenos causantes de la pudrición de corona como *Lasiodiplodia theobromae*, *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae*, y *Fusarium verticillioides* (Alvindia et al., 2011).

Por otro lado, un estudio establece que los hongos *Clonostachys byssicola* y *Clonostachys rosea* son resistentes al parasitismo por *Trichoderma* spp., por lo contrario son hongos parásitos antagonistas de *Trichoderma* spp. Aparentemente, *Clonostachys rosea* es un micoparásito más agresivo que *Clonostachys byssicola*. Sin embargo, dentro de la especie *Clonostachys byssicola*, la agresividad de los diferentes cepas aisladas no siempre fueron resistentes al parasitismo por parte de *Trichoderma* spp. Por lo tanto, se determina que el

nivel de agresividad y de susceptibilidad al micoparasitismo en los aislados de *Clonostachys* son fenómenos totalmente independientes. Al parecer, las especies *Clonostachys* son micoparásitos que liberan prolíficamente enzimas líticas que son resistentes a los tipos de enzimas que producen, lo cual puede conferirles una mayor resistencia a enzimas similares liberadas por otros micoparásitos (Krauss et al., 2013). Similarmente en otros estudios se ha encontrado que el complejo fúngico de las especies *Clonostachys* y *Trichoderma* tiene un alto grado de micoparasitismo contra el hongo patogénico *Crinipellis roreri*. Los árboles nativos de cacao de monte (*Theobroma gileri*) de los bosques del noroeste de Ecuador han sido afectados por el hongo patógeno *Crinipellis roreri*, el cual provoca la pudrición de vaina helada en estos árboles. Se halló que de todos los microorganismos endófitos encontrados en los troncos y las vainas sanas de los árboles de cacao de monte, la combinación de las especies *Clonostachys* y *Trichoderma* es el mejor agente de control biológico contra este patógeno (Evans et al., 2003).

Igualmente, el hongo endófito *Clonostachys rosea* aislado de tejidos sanos de la planta de cacao fue examinado de forma invitro por su actividad antagónica contra los principales patógenos del cacao. Específicamente, se ha encontrado un antagonismo del 40% contra *Moniliophthora roreri* (podredumbre de vaina helada), un antagonismo del 65% contra *Phytophthora palmivora* (podredumbre negra), y un antagonismo del 27% contra *Moniliophthora perniciosa*. También, se determinó que los hongos endófitos son normalmente buenos colonizadores y crecen rápidamente en forma *in vitro*, mientras que los hongos que producen algún tipo de antibiótico que impiden el crecimiento de otros microorganismos son raros en la naturaleza y crecen lentamente de forma *in vitro* (Mejía et al., 2008).

Existen otros casos en donde la mezcla de patógenos (*Alternaria alternata*, *Aphanomyces euteiches*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi*, *F. solani* f. sp. *pisi*, *Mycosphaerella*

pinodes, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani*, y *Sclerotinia sclerotiorum*) provocan la pudrición de raíz en cultivos de guisantes (*Pisum sativum* L.), siendo un factor limitante en el rendimiento de estos cultivos en Canadá. En este estudio, se ha identificado a la especie *Clonostachys rosea* como un micoparásito que combate a estos patógenos que forma efectiva y haciéndola en buen agente biológico alternativo a los productos químicos. Cuando este agente biológico crece cerca de un patógeno, produce ramas laterales que crecen de forma directa hacia el micelio del patógeno y se entrelaza alrededor de este (Xue, 2003). De la misma manera, se ha encontrado que la aplicación del químico fumigante dazomet con *Clonostachys rosea* 67-1 es bastante exitoso para combatir la marchitez en cultivos de pepino (*Cucumis sativus*) causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* KW2-1. La combinación del micoparásito de control más el fumigante dazomet alcanza un porcentaje de control de la enfermedad de 100%, comparado con un 88.1% si solo se utiliza el producto químico o 69.8% si solo se implementa *Clonostachys rosea* 67-1 (Tian et al., 2014). Otro ejemplo muy utilizado en los cultivos de plantas de interés humano es la cepa 88-710 del hongo benéfico *Clonostachys rosea* que fue patentada y utilizada para promover el crecimiento y la productividad de los geranios (*Geranium* sp.), las rosas miniatura (*Rosa x hybrida*) y los pepinos (*Cucumis sativus*), en ausencia o cerca de la ausencia total de patógenos. En las rosas miniatura, la cepa fúngica se aplicó durante la etapa de esquejes o la etapa del segundo recorte del follaje, y el endófito generó un incremento en el enraizamiento de los esquejes, redujo el retroceso de las raíces luego del recorte foliar en más de un 70%, disminuyó la cantidad de hojas senescentes y muertas en un 55 a 80%, y provocó un rápido crecimiento de los brotes. Mientras que las estacas de geranio inmersas en conidios de esta cepa fúngica incrementó la producción de las raíces y la supervivencia de la planta en un 27%. Finalmente, en el caso de los pepinos, el hongo provocó un aumento en el área foliar en

un 28% luego de 16 días y la masa seca de raíz en un 40% luego de 19 días (Sutton et al., 2008).

Existe otro estudio cuyo objetivo principal fue evaluar la eficiencia del hongo benéfico *Penicillium pinophilum* en el crecimiento y la absorción de nutrientes en plantas de Granada (*Punica granatum* L.). Su inoculación en el suelo aumentó la absorción de nutrientes como nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), mejoró el crecimiento vegetal, subió el índice de área foliar e incrementó la tasa de fotosíntesis de las plantas de granada. Este estudio estableció un aumento en la absorción del macronutriente P, en la movilización de P insoluble y en la actividad de la fosfatasa ácida cuando las plantas son inoculadas con *Penicillium pinophilum*. Finalmente, se observó un incremento en la cantidad de clorofila contenida en las hojas de las plantas, después de haber sido inoculadas, y este aumento en la clorofila puede estar correlacionado con una mayor adquisición de hierro por parte de las plantas (Maity et al., 2014). Otro estudio tuvo por objetivos el conocer más sobre los hongos endófitos que habitan las hojas de los manglares (*Avicennia schaueriana*, *Laguncularia racemosa* y *Rhizophora mangle*) en Brasil y obtener un potencial uso biotecnológico de estos microorganismos y sus metabolitos secundarios en otras áreas de investigación. Las hojas fueron recolectadas durante las épocas de lluvia y sequía, y luego fueron esterilizadas e inoculadas en cajas Petri con medios de cultivo PDA. En base a un análisis morfológico, se identificó 25 especies diferentes de hongos, entre las cuales se encuentra la especie *Penicillium pinophilum* que fue reportada por primera vez como un hongo endófito de las regiones tropicales. Al final, se estableció que el hongo *Penicillium pinophilum* es un importante productor de enzimas y metabolitos secundarios, de los cuales algunos pueden utilizarse para el tratamiento del cáncer (Costa et al., 2012). No obstante, en otro estudio se encontró que el hongo *Penicillium pinophilum* es un patógeno menor que causó retardo en el crecimiento de plantas de tomate y algodón. Este hongo invadió mayor cantidad de raíces de

plantas de tomate en suelos no solarizados que en suelos solarizados. La solarización del suelo es un proceso hidrotérmico en el cual el suelo húmedo es cubierto con una cubierta plástica y expuesto a la luz solar por varios meses. Este procedimiento ayuda a controlar las malezas, evitar la evaporización de agua del suelo, combatir la erosión y mejorar la composición del suelo. El estudio descubrió que la inoculación de las raíces de tomate con la bacteria *Pseudomonas fluorescens* redujo la colonización de *Penicillium pinophilum* y evitó el retardo que el hongo estaba provocando en el crecimiento de la planta (Gamliel et al., 1993).

Además, entre los microorganismos encontrados en nuestro estudio está *Xylaria venosula* que es un microorganismo saprófito relacionado con la descomposición de las plantas y habita normalmente en las hojas y ramas de las plantas. El género *Xylaria* está conformado por especies endófitas asociadas a plantas vasculares y no vasculares. Las especies *Xylaria* producen metabolitos secundarios que pueden ser compuestos volátiles y no volátiles. Entre los principales metabolitos secundarios encontrados están: ésteres, alcoholes, sesquiterpenoides, terpenoides, alcaloides, citocalasinas, poliacetatos y compuestos aromáticos. Algunos de estos metabolitos tienen un alto uso potencial como fungicidas, herbicidas e insecticidas; mientras que otros tienen propiedades antibacterianas, antifúngicas y antipalúdicas. Debido a esto los metabolitos del género *Xylaria* son compuestos que tienen un alto valor en el sector agrícola, ya que sirven en el desarrollo de biopesticidas para el control de plagas, y en el área de medicina para la elaboración de drogas contra enfermedades infecciosas y no infecciosas (Macías-Rubalcava et al., 2017). Por ejemplo, en un estudio se estableció que los metabolitos o compuestos orgánicos volátiles producidos por el hongo endófito *Xylaria venosula* tienen efectos antimicóticos, contra los oomicetos, y fitotóxicos; este hongo fue aislado del arbusto medicinal denominado palo Brasil (*Haematoxylon brasiletto* Karst). Los resultados de los bioensayos que evalúan el antagonismo, indicaron que

la especie *Xylaria venosula* limita el crecimiento de los oomicetos *Pythium aphanidermatum* y *Phytophthora capsici*, y de los hongos *Alternaria solani* y *Fusarium oxysporum* (Sánchez-Ortiz et al., 2016). Otro estudio hizo análisis moleculares sobre las comunidades de hongos endófitos que se encuentran en los tejidos vegetativos y reproductivos del árbol medicinal guayabo blanco (*Eugenia uruguayensis*) en Uruguay. Los resultados de dichos análisis determinaron que el hongo *Xylaria venosula* y otras especies del mismo género fueron encontrados principalmente en los tejidos de la corteza y del fruto. Sin embargo, la mayor diversidad de especies se identificó en los frutos y en los bordes de las hojas, y la menor diversidad fue en los peciolo de las hojas (Tiscornia et al., 2012). En otro estudio, se aisló y se identificó 23 diferentes hongos endófitos de la familia Xylariaceae de las zonas forestales de Tailandia y Filipinas en base a un análisis morfológico y molecular, realizando la amplificación de la región ITS con los primers universales ITS1 e ITS2. Las especies de la familia Xylariaceae identificadas a nivel molecular tuvieron gran similitud en las características morfológicas como el ápice ascual, la estructura estromal y la hendidura germinal de las ascosporas. Un dato interesante es que la especie *Xylaria venosula* de Filipinas indicó tener una relación genética cercana a la especie *Biscogniauxia* de Tailandia (Velmurugan et al., 2013). En otro estudio realizado con las hojas de los árboles dicotiledóneos de un bosque de espinos secos tropicales y de un bosque de hojas perennes de montaña en el sur de la India, se encontró 49 especies de hongos endófitos pertenecientes al género *Xylaria*. La infección de hojas por los hongos endófitos *Xylaria* aumentaba claramente durante la época de lluvias. Todos los endófitos aislados producen celulosa, y la mayoría producía enzimas de lacasa y lipasa, lo que sugiere que continúan sus vidas en la hojarasca como saprófitos. Similarmente, se observó que son inhibidores de otros hongos, bacterias y algas, ya que compitieron contra estos microorganismos en el suelo del bosque al momento que son saprófitos. La especie *Xylaria venosula* tuvo una actividad contra las

bacterias *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, antifungal y contra las algas. También esta especie produjo las enzimas extracelulares: celulosa, lacasa, lipasa y pectato transeliminasa (Govinda Rajulu et al., 2013).

Igualmente, otro estudio de Hamayun et al. (2009) en cultivos de soya (*Glycine max*) en Corea, establece que la producción de giberrelinas por cepas puras de *Aspergillus fumigatus* promueven el crecimiento vegetal. El mejor aislado de hongo *Aspergillus fumigatus* HK-5-2 CF incrementa la longitud de la planta, el peso seco y fresco de la planta, y el contenido de los bio-activos endógenos GA₁ y GA₄ de la soya, en comparación con los grupos control. Los metabolitos producidos por los hongos endófitos ayudan con la supervivencia y el crecimiento de las plantas de soya. Otro estudio investigó sobre las propiedades químicas del suelo, la absorción de fósforo y nitrógeno, y las interacciones fúngicas entre cuatro especies diferentes (*Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium pinophilum* y *Rhizobium leguminosarum*) en cultivos de habas en Egipto. El análisis de suelo luego de la cosecha estableció que el conjunto de estos hongos incrementó significativamente los niveles de los macroelementos fósforo (P) y nitrógeno (N) disponibles en el suelo, en comparación con suelo sin tratar. El nivel más alto de P disponible en el suelo se encontró cuando se utilizaba el tratamiento *Penicillium pinophilum* y *Rhizobium leguminosarum*. También se observó que la inoculación de estos hongos aumentó significativamente los rendimientos de semillas y paja de habas, en comparación con plantas sin tratar. La mayor absorción de N se encontró cuando se utilizaba el tratamiento *Aspergillus fumigatus* y *Rhizobium leguminosarum*. La idea es reducir el uso de fertilizantes químicos en presencia de estos tipos de hongos benéficos, y que no afecten de sobremanera el rendimiento de los cultivos de habas (Mehana et al., 2002). Mientras que otro estudio realizado en macetas, en el cual se cultivó trigo durante 50 días en suelos con bajo contenido de fósforo (P) que fueron esterilizados térmicamente, y suministrados con P orgánico en forma de fitato de sodio. La inoculación de

semillas con hongos productores de fosfatasa como *Aspergillus fumigatus* o con hongos de micorrizas como *Glomus mosseae* aumentaron el peso seco de las raíces y brotes, la longitud de las raíces, la fosfatasa en la rizósfera y las concentraciones de P en las ramas. Los mayores efectos en estos parámetros analizados fueron cuando se combinaron los dos tipos de hongos. También, las concentraciones de zinc (Zn) y cobre (Cu) en las ramas incrementaron con la inoculación únicamente de *Aspergillus fumigatus* (Tarafdar et al., 1995).

Finalmente, el hongo *Fusarium solani* que fue encontrado en nuestro estudio es considerado mundialmente un patógeno invasivo que causa la pudrición de la corona y raíz en la mayoría de cultivos vegetales. Este patógeno se caracteriza por provocar una pudrición de hipocótilo, pudrición de raíces y descomposición de semillas en plantas, siendo el responsable de la pérdida en el rendimiento de hasta un 100% en los cultivos (Eke et al., 2016). Las especies del género *Fusarium* tienen varios factores de virulencia contra las plantas como la producción de micotóxicas (enzimas líticas y tóxicas) denominadas fusarinas, las cuales restan la capacidad inmunológica de las células vegetales y generan daños a nivel tisular. Otros tipos de micotóxicas producidas son: naftoquinonas, fumonisinas, ácido fusárico y moniliformina. Las fumonisinas son las micotoxinas más abundantes y son codificadas por el locus FUM del cromosoma 1 de los hongos *Fusarium* (De la Torre-Hernández et al., 2014). Por ejemplo, se ha reportado por primera vez que el patógeno *Fusarium solani* causa pudrición de raíz en las peras asiáticas (*Pyrus pyrifolia*), afectando enormemente a la producción china, la cual representa el 68.4% de la producción mundial de peras. Los árboles de las peras presentaron unos síntomas claros como coloración amarillenta de la raíz, pudrición o necrosis de la corteza, clorosis foliar, coloración amarillenta marginal en bordes y puntas de las hojas, defoliación, y eventual muerte de la rama o de la planta. El resultado de este microorganismo patogénico fue comprobado mediante técnicas moleculares y pruebas de patogenicidad (Zhu et al., 2017). Similarmente en otro estudio se observó que el

hongo *Fusarium solani* provocó una drástica reducción en los parámetros de crecimiento del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en cultivos de Camerún. Los síntomas típicos observados fueron: clorosis de las hojas, bajo crecimiento, defoliación prematura, y la muerte de la planta en ciertos casos. Los resultados indicaron que los cultivos tuvieron un porcentaje de incidencia de enfermedad del 100% y un porcentaje de severidad de enfermedad del 95.5%, luego de 4 semanas del inicio de la enfermedad. No obstante, hoy en día, se estudia mucho las asociaciones benéficas de los hongos de micorrizas y de las raíces de las plantas, ya que tienen una influencia clara en la productividad y el crecimiento de la planta hospedadora ante condiciones adversas. En este mismo estudio se determinó que el consorcio fúngico de micorrizas (*Glomus intraradices*, *Glomus hoi*, *Gigaspora margarita* y *Scutellospora gigantea*) disminuyó la pudrición de raíces provocado por *Fusarium solani*, y mejoró el crecimiento de las raíces y ramas del frijol (Eke et al., 2016). Sin embargo en otros hospederos, se establecen que *Fusarium solani* es un hongo endófito benéfico del árbol de cacao debido a que tiene una relación endosimbiótica con su hospedador. Este hongo en presencia de otros hongos competidores nativos pudo controlar al patógeno *Moniliophthora roreri* (Mejía et al., 2008).

9 CONCLUSIONES

- A partir de muestras de frutilla enfermas, se aisló y se identificó a 12 diferentes aislados de hongos con fenotipos diferentes en base al análisis morfológico y microscópico.
- Se identificó molecularmente que los 12 hongos aislados previamente en realidad fueron 7 especies: *Clonostachys rosea* (1 fenotipo), *Clonostachys byssicola* (2 fenotipos), *Penicillium pinophilum* (1 fenotipo), *Aspergillus fumigatus* (3 fenotipos),

Xylaria venosula (1 fenotipo), *Fusarium solani* (1 fenotipo) y *Bionectria ochroleuca* (3 fenotipos).

- Las especies fúngicas *Penicillium pinophilum*, *Fusarium solani* y *Bionectria ochroleuca* han sido reportados anteriormente como patógenos y los otros 4 hongos aislados fueron reportados anteriormente como benéficos o saprófitos para las plantas.

10 RECOMENDACIONES

- Buscar otras localidades aledañas al terreno de estudio para obtener más muestras y verificar el crecimiento de los microorganismos encontrados en Yaruquí.
- Revisar otros estudios sobre los patógenos o microorganismos asociados a la frutilla en otras localidades del Ecuador.
- Realizar otros tipos de estudios, analizando diferentes agentes biológicos que fueron descartados en nuestro estudio como las bacterias.
- Efectuar otro tipo de estudios en el sector de Yaruquí, sobre diferentes factores ambientales como la composición y calidad del agua, aire y tierra de esta zona.
- Realizar estudios sobre pruebas de patogenicidad para verificar que los hongos patogénicos encontrados en este estudio son los verdaderos causantes de la enfermedad no identificada en el sector de Yaruquí.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Angulo, R. (2009). Fresa, *Fragaria ananassa*. Bayer CropScience S. A. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Bastidas, O. (2016). Cell Counting with Neubauer Chamber. Basic Hemocytometer Usage. *Celeromics*. Obtenido el 18 de noviembre 2016 de <http://www.celeromics.com/en/resources/docs/Articles/Cell-counting-Neubauer-chamber.pdf>
- Costa, Isabella P. M. Wanderley, Maia, Leonor Costa, & Cavalcanti, Maria Auxiliadora. (2012). Diversity of leaf endophytic fungi in mangrove plants of Northeast Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(3), 1165-1173.
- Cuervo Usán Y., Espadas Reséndiz M., Zita Padilla G.A. (2002). Fitopatología (Manual de Prácticas de Ingeniería Agrícola). Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Departamento de Ciencias Agrícolas. Sección de Suelos, Sanidad y Maquinaria.
- De la Torre-Hernández M.E., Sánchez-Rangel D., Galeana-Sánchez E., Plasencia-de la Parra J. (2014). Fumonisin – Síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1):77-91.
- Difco. (2016). Difco Potato Dextrose Agar. Difco Laboratories. Becton, Dickinson and Company.
- Dionisio G. Alwindia & Yuuri Hirooka. (2011). Identification of *Clonostachys* and *Trichoderma* spp. from banana fruit surfaces by cultural, morphological and molecular methods, *Mycology*, 2:2, 109-115.

- Echandi E. (1967). Manual de Laboratorio para Fitopatología General. Capítulo IX. Preparación y Dispensación de Medios de Cultivo. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O. E. A. Editorial IICA. Lima, Perú.
- Eke P., Chatue G., Nana Wakam L., Toghue Kouipou R. M., Tsouh Fokou P. V., Fekam Boyom F. (2016). Mycorrhiza consortia suppress the fusarium root rot (*Fusarium solani* f. sp. *Phaseoli*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). Biological Control 103: 240–250.
- Evans H.C., Holmes K.A., Thomas S.E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. Mycological Progress 2(2): 149–160.
- Falcón, I.; Valera, A. (2007). “Extracción de ácidos nucleicos”. En: Ecología Molecular (Eguiarte L. E., Souza V. y Aguirre X., compiladores) SEMARNAT-INE-UNAM-CONABIO, México, DF, pp. 499-515.
- Fan Y, Luan Y, An L, Yu K (2008). Arbuscular mycorrhizae formed by *Penicillium pinophilum* improve the growth, nutrient uptake and photosynthesis strawberry with two inoculum-types. Biotechnol. Lett. 30: 1489-1494.
- FAOSTAT. (2017). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Datos, Cultivos. Obtenido 12 de Abril de 2017 de <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>.
- Fraire, Cordero, María de Lourdes; Yáñez, Morales, María de Jesús; Nieto, Ángel, Daniel; Vázquez, Gálvez, Gilberto. (2003). Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, diciembre, 285-291.

- Gamliel A., Katan J. (1993). Suppression of major and minor pathogens by fluorescent pseudomonads in solarized and nonsolarized soils. *Phytopathology* 83(1): 68-75.
- Govinda Rajulu M.B., Thirunavukkarasu N., Giridhar Babu A., Aggarwal A., Suryanarayanan T.S., Sudhakara Reddy M. (2013). Endophytic Xylariaceae from the forests of Western Ghats, southern India: distribution and biological activities. *Mycology*, 4:1, 29-37.
- Guesmi-Jouini, J., Garrido-Jurado, I., López-Díaz, C., Ben Halima-Kamel, M., QuesadaMoraga, E. (2014). Establishment of fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Bionectria ochroleuca* (Ascomycota: Hypocreales) as endophytes on artichoke *Cynara scolymus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jip.2014.03.004>
- Hamayun, M., S.A. Khan, M.A. Khan, A.L. Khan and S.M. Kang *et al.* (2009). Gibberellin production by pure cultures of a new strain of *Aspergillus fumigatus*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25: 1785-1792.
- Hoagland D.R., Arnon D.I. (1950). *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*. (Circular 347. ed.). (California Agricultural Experiment Station). Berkeley, Calif.: University of California, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station.
- Holguín-Peña, R.J., Hernández-Montiel, L.G., Latisnere, H., Rueda-Puente, E.O. (2012). First report of a *Bionectria* sp. associated with a stem rot of cardon cactus (*Pachycereus pringlei*) in Baja California Sur, Mexico. *Plant Disease* 96, 292.
- Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sois”. (2006). *Manual de Secuenciación Automática*. Servicio de Secuenciación Automática. Madrid, España. Obtenido el 20 de abril 2017 de

https://www.iib.uam.es/portal/documents/76122/76162/Manual_de_uso_del_Servicio_de_Secuenciacion.pdf/7c953210-449a-444f-8822-ceaa2b1e7006

- Krauss U, Ten Hoopen GM, Hidalgo E, Martínez A, Stirrup T, Arroyo C, García J, Palacios M. (2006). The effect of cane molasses amendment on biocontrol of frosty pod rot (*Moniliophthora roreri*) and black pod (*Phytophthora* spp.) of cocoa (*Theobroma cacao*) in Panama. *Biological Control*. 39(2):232-239.
- Krauss U, Ten Hoopen GM, Rees R, Stirrup T, Argyle T, George A, Arroyo C, Corrales E, Casanoves F. (2013). Mycoparasitism by *Clonostachys byssicola* and *Clonostachys rosea* on *Trichoderma* spp. from cocoa (*Theobroma cacao*) and implication for the design of mixed biocontrol agents. *Biological Control*. 67(3):317-327.
- Kumar, M., & Shukla, P. K. (2005). Use of PCR Targeting of Internal Transcribed Spacer Regions and Single-Stranded Conformation Polymorphism Analysis of Sequence Variation in Different Regions of rRNA Genes in Fungi for Rapid Diagnosis of Mycotic Keratitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(2), 662–668. <http://doi.org/10.1128/JCM.43.2.662-668.2005>
- Li X., Ding C., Zhang T., Wang X. (2014). Fungal pathogen accumulation at the expense of plant-beneficial fungi as a consequence of consecutive peanut monoculturing. *Soil Biology & Biochemistry* 72: 11-18.
- Macías-Rubalcava, M.L. & Sánchez-Fernández, R.E. (2017). Secondary metabolites of endophytic *Xylaria* species with potential applications in medicine and agriculture. *World J. Microbiol Biotechnol* 33: 15.
- Madigan, M.T., Martinko, J. & Parker. J. (2004). *Brock Biology of Microorganisms*. 10th ed. Lippincott Williams & Wilkins.

- Maity, Ashis; Pal, R.K.; Chandra, Ram; Singh, N.V. (2014). "*Penicillium pinophilum*—A novel microorganism for nutrient management in pomegranate (*Punica granatum* L.)". *Scientia Horticulturae*. 169: 111-117.
- Mehana, T.A., Abdul Wahid, O.A. (2002). Associative effect of phosphate dissolving fungi, *Rhizobium* and phosphate fertilizer on some soil properties, yield components and the phosphorus and nitrogen concentration and uptake by *Vicia faba* L. under field conditions. *Pak. J. Biol. Sci.*, 5: 1226-1231.
- Mbarga JB, Begoude BAD, Ambang Z, Meboma M, Kuate J, Schiffers B, Ewbank W, Dedieu L, Ten Hoopen GM. (2014). A new oil-based formulation of *Trichoderma asperellum* for the biological control of cacao black pod disease caused by *Phytophthora megakarya*. *Biol Control*. 77:15-22.
- Mejía LC, Rojas EI, Maynard Z, Van Bael S, Arnold AE, Hebbar P, Samuels GJ, Robbins N, Herre EA. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biol Control*. 46(1):4-14.
- OpenStax CNX. (2016). DNA structure and sequencing. OpenStax College, Biología. William and Flora Hewlett Foundation, the Maxfield Foundation, y Rice University. Obtenido el 14 de abril 2017 de <http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@10.4>
- Pastrana A.M., Capote N., De los Santos B., Romero F., Basallote-Ureba M.J. (2014). First Report of *Fusarium solani* Causing Crown and Root Rot on Strawberry Crops in Southwestern Spain. *The American Phytopathological Society*. 98(1): 161.
- Sánchez-Ortiz B.L., Sánchez-Fernández R.E., Duarte G., Lappe-Oliveras P., Macías-Rubalcava M.L. (2016). Antifungal, antioomycete and phytotoxic effects of volatile

- organic compounds from the endophytic fungus *Xylaria* sp. strain PB3f3 isolated from *Haematoxylon brasiletto*. *Journal of Applied Microbiology*. 120(5).
- Samaga P.V., Ravishankar Rai V., Lokanatha Rai K.M. (2003). *Bionectria ochroleuca* NOTL33—an endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* producing antimicrobial and free radical scavenging metabolites. *Annals of Microbiology*.
- Sutton, J.C., Liu, W., Ma, J., Brown, W.G., Stewart, J.F. and Walker, G.D. (2008). Evaluation of the fungal endophyte *Clonostachys Rosea* as an inoculant to enhance growth, fitness and productivity of crop plants. *Acta Hort. (ISHS)* 782:279-286.
- Tarafdar, J.C., Marschner, H. (1995). Dual inoculation with *Aspergillus fumigatus* and *Glomus mosseae* enhances biomass production and nutrient uptake in wheat (*Triticum aestivum* L.) supplied with organic phosphorus as Na-phytate. *Plant Soil* 173(1): 97-102.
- Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnología en Salud. Investigación en Discapacidad*. Vol. 2(2): 70-78.
- Tian, T., Li, S.-D., and Sun, M.-H. (2014). Synergistic effect of dazomet soil fumigation and *Clonostachys rosea* against cucumber *Fusarium* wilt. *Phytopathology* 104:1314-1321.
- Tiscornia S., Ruiz R., Bettucci L. (2012). Fungal endophytes from vegetative and reproductive tissues of *Eugenia uruguayensis* in Uruguay. *Sydowia–Horn*. 64(2): 313-328.
- UC Davis. (2016). The Albion Cultivar. The UC Patented Strawberry Cultivars. The Regents of the University of California, Davis campus. Obtenido el 02 de abril 2017 de <http://research.ucdavis.edu/industry/ia/industry/strawberry/cultivars/#albion>

- UC IPM. (2017). How to Manage Pests Strawberry. Agriculture and Natural Resources, University of California. The Regents of the University of California, Davis campus. Obtenido el 02 de abril 2017 de <http://ipm.ucanr.edu/PMG/selectnewpest.strawberry.html>
- Velmurugan N., Lee H.M., Han S.S., Sol L., Soo Lee Y. (2013). Xylariaceae diversity in Thailand and Philippines, based on rDNA sequencing. *Ann. For. Res.* 56(1): 31-42.
- Vizcaino, Lorena. (2011). Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de frutilla (*Fragaria chiloensis*) en Checa – Pichincha. Proyecto de Grado. Colegio de Agricultura, Alimentos y Nutrición. Universidad San Francisco de Quito. Quito-Ecuador.
- Waqas M., Khan A. L. & Lee I.-J. (2014). Bioactive chemical constituents produced by endophytes and effects on rice plant growth. *Journal of Plant Interactions.* 9:1, 478-487, DOI: 10.1080/17429145.2013.860562
- Xue, A. G. (2003). Biological control of pathogens causing root rot complex in field pea using *Clonostachys rosea* strain ACM941. *Phytopathology* 93:329-335.
- Zarria, W. (2015, Diciembre 01). Entrevista con ingeniero Walter Zarria. Ingeniero de INIAP y local de insumos agrícolas AGROSA, zona de la parroquia rural de Yaruquí.
- Zhu L. W., Tang X. M., Lin T. Y., Zhou S. S., Liu P., Ye Z. F. (2017). First Report of *Fusarium* root rot in Asian Pear Caused by *Fusarium solani* in China. *The American Phytopathological Society.* 101(1): 252.