

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

Aislamiento, caracterización morfológica y molecular del agente fúngico *Neopestalotiopsis saprophytica* de la frutilla (*Fragaria* sp.) en Pichincha-Ecuador.

Juan Daniel Campaña Muñoz

Ingeniería en Procesos Biotecnológicos

Trabajo de integración curricular presentado como requisito para la obtención del título de Ingeniero en Procesos Biotecnológicos.

Quito, 11 de diciembre de 2019

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

**HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR**

Aislamiento, caracterización morfológica y molecular del agente fúngico *Neopestalotiopsis saprophytica* de la frutilla (*Fragaria* sp.) en Pichincha-Ecuador.

Juan Daniel Campaña Muñoz

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

María José Pozo, Ms.Sc.

Firma del profesor:

Quito, 11 de diciembre de 2019

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:	Juan Daniel Campaña Muñoz
Código:	00118062
Cedula de identidad:	1804226924
Lugar y fecha:	Quito, 11 de diciembre del 2019

RESUMEN

Fragaria sp. o mejor conocida como frutilla, es una fruta muy apetecida por su sabor y beneficios organolépticos y funcionales. En el Ecuador, al cultivarla en sistemas agrícolas intensivos, los patógenos de suelo merman la producción de un 50 a 70%. En un estudio de diversidad de microorganismos de suelo del sector Yaruquí-Pichincha y usando “Next Generation Sequencing” para obtener las secuencias de ADN de la región ITS, se demostró que el hongo *Pestalotiopsis* sp. estuvo presente con mayor abundancia en plantas enfermas versus plantas sanas y en relación con los demás hongos encontrados. Mediante revisión de literatura se encontraron reportes que indican que *Pestalotiopsis* sp. está relacionado con la aparición de una enfermedad que disminuye el ciclo de vida comercial de la planta, obteniendo sintomatologías similares a la encontradas en Ecuador: tejidos necrosados con manchas café en el cuello de la planta que coloniza raíces y además provoca el marchitamiento del follaje con tonalidades de color morado. En esta investigación, a partir de 15 muestras de cuello de la frutilla de la zona de Yaruquí-Pichincha, hongos similares a *Pestalotiopsis* sp. fueron aislados en medios de cultivo “Potato Dextrose Agar” (PDA). aquí, se obtuvieron cultivos con micelio blanco y algodonoso, y al reverso amarillo y con acérvulos negros distribuidos en círculos concéntricos. Los conidios fueron elipsoidales, multiseptados y con promedio de 25,03 μm . Se presentaron 3 apéndices superiores y 1 inferior, con un promedio de 26,55 μm . Aislamiento de ADN y posterior amplificación por PCR de las regiones “Internal Transcribed Spacer” (ITS) y “partial β -tubulin” (β -TUB), se obtuvo secuencias con las cuales se pudo corroborar que se trataba de *Neopestalotiopsis* sp. obtenidas del software “BLAST” del NCBI. *Neopestalotiopsis* sp. es un género que resultó de una reclasificación del género *Pestalotiopsis* sp. en el año 2014. Luego se usaron las secuencias para realizar un análisis filogenético alineándolas con MEGA y haciendo uso del software “Beast” y “Figtree” con las secuencias descritas de Maharachchikumbura et al, 2014. Mediante la realización del árbol concatenado con inferencia bayesiana de modelo GTR+G+I se determinó que el hongo patógeno de la frutilla de Ecuador fue *Neopestalotiopsis saprophytica*. Ya con la identificación del patógeno, es posible elaborar planes futuros de manejo de esta enfermedad que está afectando a los cultivos en el Ecuador.

Palabras clave: *Fragaria* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Neopestalotiopsis* sp., microbioma, PCR, ITS, β -TUB, BLAST, análisis filogenético.

ABSTRACT

Fragaria sp. or better known as strawberry, is a fruit that is very popular for its taste and organoleptic and functional benefits. In Ecuador, when cultivated in intensive agricultural systems, soil pathogens reduce production by 50 to 70%. In a study of soil microorganism diversity in the Yaruquí-Pichincha sector and using “Next Generation Sequencing” to obtain the DNA sequences of the ITS region, it was demonstrated that the fungus *Pestalotiopsis* sp. It was present with greater abundance in diseased plants than in healthy plants and in relation to the other fungi. Through literature review, reports were found indicating that *Pestalotiopsis* sp. is related to the appearance of a disease that decreases the commercial life cycle of the plant, obtaining symptoms similar to those found in Ecuador: necrotic tissues with brown spots on the neck of the plant that colonizes roots and also causes foliage wilt with shades of purple. In this investigation, from mushroom neck samples from the Yaruquí-Pichincha area, fungi similar to *Pestalotiopsis* sp. were isolated in culture media "Potato Dextrose Agar" (PDA). here, cultures were obtained with white and cottony mycelium, and on the yellow back and with black acervules distributed in concentric circles. The conidia were ellipsoidal, multisepted and with an average of 25.03 μm . There were 3 upper and 1 lower appendices, with an average of 26.55 μm . Through the use of molecular techniques, the fungus was characterized by PCR amplification of the “Internal Transcribed Spacer” (ITS) and “partial β -tubulin” (β -TUB) regions, obtaining sequences with which it was possible to confirm that it was treated of *Neopestalotiopsis* sp. in the “BLAST” software of the NCBI. *Neopestalotiopsis* sp. is a genus that resulted from a reclassification of the genus *Pestalotiopsis* sp. in 2014, in which another lineage was also determined as *Pseudopestalotiopsis* sp. The sequences were then used to perform a phylogenetic analysis by aligning them with MEGA and making use of the “Beast” and “Figtree” software with the described sequences of Maharachchikumbura et al, 2014. By performing the concatenated tree with Bayesian inference of the GTR + G model. + I determined that the pathogenic fungus of the strawberry from Ecuador was *Neopestalotiopsis saprophytica*. Already with the identification of the pathogen, it is possible to develop future management plans for this disease that is affecting crops in Ecuador.

Keywords: Fragaria sp., Pestalotiopsis sp., Neopestalotiopsis sp., Microbiome, PCR, STI, β -TUB, Blast, phylogenetic analysis.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	9
Métodos	16
Resultados.....	23
Discusión.....	32
Conclusiones.....	36
Referencias bibliográficas.....	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes para la preparación del master mix de PCR para ITS.....	20
Tabla 2: Componentes para la preparación del master mix de PCR para β -TUB.....	20
Tabla 3: Programa del termociclador para realizar la PCR de primers ITS.....	20
Tabla 4: Programa del termociclador para realizar la PCR de primers β -TUB.....	21
Tabla 5: Identificación macroscópica y microscópica del hongo encontrado en el medio de cultivo PDA.....	26
Tabla 6: Medidas de las conidias del hongo de interés.....	26
Tabla 7: Medidas de los apéndices del hongo de interés.....	27
Tabla 8: Identificación molecular de los diferentes hongos obtenidos mediante el software BLAST con el marcador molecular ITS.....	29
Tabla 9: Identificación molecular de los diferentes hongos obtenidos mediante el software BLAST con el marcador molecular β -TUB.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura #1: Comparación de la abundancia de hongos entre plantas enfermas y sanas mediante el análisis de microbioma.....	23
Figura #2: Comparación de los hongos presentes en plantas enfermas y sanas mediante el análisis de microbioma.....	24
Figura #3: Comparación de los tejidos de una planta sana vs una planta enferma.....	25
Figura #4: Electroforesis en gel de agarosa para la extracción de ADN de hongo.....	27
Figura #5: Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de los fragmentos de ADN para las regiones ITS y β -TUB.....	28
Figura #6: Árbol filogenético de inferencia bayesiana, con modelo de sustitución GTR+ G+ I.....	31

1. INTRODUCCIÓN

La frutilla es una fruta que pertenece al género *Fragaria*, la cual es una planta rastrera perenne. *Fragaria* sp. pertenece a la clase Magnoliopsida, al orden Rosales, y a la familia Rosaceae. Es una planta de gran importancia alrededor del mundo debido a sus cualidades organolépticas y sus diferentes beneficios como el ser una fuente de vitaminas y antioxidantes. Existen aproximadamente 160 especies dentro de este género, unas con más importancia que otras como es el caso de *Fragaria chiloensis* que es cultivada en Chile, Estados Unidos y Argentina; *Fragaria virginiana* que se da en Perú y Bolivia, y finalmente *Fragaria ananassa* que es un híbrido que se obtiene del cruzamiento de las especies que se mencionaron anteriormente (Angulo, 2009). El cultivo de frutilla representa un gran porcentaje de la actividad económica de muchos países, en especial de países de América entre los cuales predomina Estados Unidos, México, Chile y Colombia. Ecuador es un país que en los últimos años ha iniciado con cultivos de frutilla debido a sus condiciones agroclimáticas favorables que se observan principalmente en la región Sierra como en las provincias de Azuay, Tungurahua y Pichincha. Sin embargo, en otras provincias se ha observado un constante crecimiento de este cultivo como es el caso de Imbabura, Chimborazo y pequeñas extensiones en la provincia de Cotopaxi y en la zona del Austro (Agronegocios, 2013).

Varias enfermedades afectan las plantaciones de frutilla en el mundo, y en el Ecuador se ha observado que la longevidad de la planta y su rendimiento han disminuido en los cultivos de esta apetecida fruta (France, 2014). Existen muchas patologías que son frecuentes y causan daños muy severos en los cultivos, y también existen enfermedades que si bien no representan un riesgo muy alarmante, tienden a ser problemáticas y sin un buen manejo y control se puede hechar a perder todo el cultivo (France, 2014). En el

fruto tenemos enfermedades como la conocida Podredumbre gris, que es una enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinérea*, es el principal problema sanitario en la frutilla y causa una pudrición blanda que es acompañada por un micelio de color plomizo (Undurraga y Vargas, 2013). De igual manera se tienen otras enfermedades que causan pudrición y marchitez de la raíz por ejemplo por el patógeno *Fusarium solani*, la necrosis de la raíz por *Rhizoctonia solani* o la conocida enfermedad de la mancha roja ó estela roja que es causada por *Phytophthora fragariae* (Undurraga y Vargas, 2013). En la hoja existe la mancha púrpura que es producida por *Mycosphaerella fragariae*, el oídio que lo produce *Sphaerotheca macularis* y en el cuello se ha encontrado en muchos cultivos la pudrición del cuello que llega a ser mortal para la planta y es causada por el patógeno *Phytophthora cactorum* (Undurraga y Vargas, 2013). Muchas de estas enfermedades constituyen un grupo relevante y dañino en la agricultura a nivel mundial, y muchas de estas enfermedades son consideradas como enfermedades de suelo ya que los organismos que las causan persisten en el suelo por muchas temporadas del cultivo, ya que tienen estructuras de supervivencia o de reproducción que les permiten adaptarse mejor al ambiente y superar condiciones desfavorables, de este modo vuelven a infectar las plantas de forma recurrente (AGP, 2019).

En el Ecuador se ha podido observar una baja en el rendimiento de los cultivos de frutilla, lo cual se cree que la responsable es una nueva enfermedad de suelo de la cual se desconoce el agente patógeno. Esta enfermedad limita la producción de los cultivos de frutilla y por lo tanto afecta con grandes pérdidas al agricultor (Verdugo, 2011). El ciclo de vida de la planta es corto y va de los 24 a 30 meses así como el ciclo de vida comercial útil de 12 a 18 meses, pero al tener cultivos enfermos se observa que el ciclo comercial útil disminuye a un aproximado de 6 a 8 meses, lo cual es muy alarmante (Vizcaino, 2011). Con el ataque de la enfermedad de suelo, productividad de los cultivos ha

disminuido a un 70 % aproximadamente (Verdugo, 2011). Se ha observado que en ciertas provincias como es el caso de Imbabura, los productores usan los mismos plásticos de sus cultivos para muchas cosechas, lo cual se está dejando de hacer en muchos lugares debido a que se sabe que esta práctica es uno de los factores que hace que los nuevos cultivos también se contaminen con las bacterias, hongos o plagas de los anteriores ya que estos patógenos se quedan adheridos al plástico (Agronegocios, 2013). En el año 2013 se reportó que la zona de mayor producción en el Ecuador está ubicada con una mayor extensión en la provincia de Pichincha, en sus parroquias más productivas que se encuentran en el valle noroccidental de Quito como son Yaruquí, Pifo, Tababela, Checa, El Quinche y Ascázubi (Agronegocios, 2013). Se sabe que la zona produce entre 5 a 6 mil cajas diarias de frutilla, pero esto ha venido disminuyendo con el pasar de los años, ya que según datos estadísticos de la FAOSTAT (2017) se tiene reportes que en el año 2009 se producían 1900 toneladas de frutillas en el Ecuador, y para el año 2014 esta producción bajó a 1620 toneladas, y con el pasar de los años esto ha seguido disminuyendo de forma considerable. Otro problema que conlleva la enfermedad es que los tratamientos al suelo para reducir la misma, ser muy invasivos ya que suelen usar fungicidas y pesticidas de forma indiscriminada que representan un daño para el medio ambiente y pueden causar problemas para la salud de los agricultores y del consumidor (AGP, 2019).

Para muchos de estos patógenos que han venido causando daños en los diferentes cultivos de muchas especies, no solo de la frutilla se ha empleado diferentes técnicas basadas en marcadores morfológicos o la identificación morfológica con la descripción de medidas, colores, etc; lo cual aún se lo hace ya que es una técnica necesaria al menos para la identificación de hongos (Martinez, 2006). Sin embargo, muchos de estas técnicas tienen limitaciones y además están influenciados por muchos factores extras, por

lo tanto pueden existir errores. Por lo tanto, en la actualidad se ha venido empleando el uso de técnicas moleculares que brindan un gran potencial para una detección rápida y mucho más eficiente; en muchos de los casos se combina la caracterización morfológica y la molecular para obtener mejores resultados (Martinez, 2006). Los marcadores moleculares se han empleado en evaluar la variabilidad genética de hongos, permitiendo de este modo conocer un poco más de su estructura poblaciones y además identificar especies de forma exacta (Martinez, 2006). Mediante la realización de muchas pruebas de laboratorio y mediante el uso de técnicas de caracterización morfológica y moleculares se ha reportado que existe una enfermedad de suelo que causa sitomatología similar a las que se han dado en los cultivo de Ecuador, y se atribuye las perdidas de cultivo a un hongo conocido como *Pestalotiopsis* sp. del cual no se conoce mucha información (Mouden, Benkirane, Ouazzani, & Douira, 2014).

Pestalotiopsis sp. como un hongo que causa patogenicidad, por ejemplo, en un estudio de Marshal, 2016 se reporta una enfermedad con sus diferentes sintomatologías y se atribuye la enfermedad a este hongo por sus diferencias en morfología (Mouden, Benkirane, Ouazzani, & Douira, 2014). *Pestalotiopsis* sp. es un hongo de la familia Sporocadaceae, orden Xylariales y división Ascomycota, se considera un patógeno que afecta a diferentes cultivos en todo el mundo, como es el caso del arándano, palma de aceite, guayaba, frutilla, entre otros; ingresa a la planta por medio de las heridas de la misma o a través de sus orificios naturales (Mouden, Benkirane, Ouazzani, & Douira, 2014). Este hongo tiene relación con una enfermedad conocida como antracnosis, la cual es una enfermedad que ataca principalmente al follaje y ataca con mayor fuerza cuando la planta ha sido debilitada por climas desfavorables o en períodos de humedad relativa alta y épocas de lluvia; el follaje muere desde cerca de la base de la planta, el hongo empieza a atacar desde la punta de las hojas y progresa hacia su base, tornando las hojas

a un color marrón con una tonalidad morada, hasta que las necrosa completamente (Mouden, et. al., 2014). La enfermedad avanza hacia la corona e infecta el cuello de la planta, manifestándose con la presencia de manchas necróticas que van pudriendo el tejido hasta llegar a la raíz de las frutillas; es importante mencionar que muchas veces el hongo llega al fruto y lo deteriora causando una pudrición blanda. Las plantas infectadas tienen además síntomas de desarrollo lento, falta de crecimiento, un mal enraizamiento, y marchitamiento (Vu, 2007). El hongo tiene una fase saprofítica es decir que tiene la capacidad de sobrevivir en tejidos muertos, lo cual le da una ventaja para que pueda sobrevivir en la planta muerta mientras se disemina e infecta otras plantas del cultivo; y además tiene la capacidad de formar acérvulos que son un tipo de estructura reproductiva asexual, que son diseminados por el viento y en el proceso de infección aparecen por debajo de la cutícula del hongo para diseminar conidios, que son esporas asexuales, al medio para de este modo infectar las distintas plantas. Se sabe que la enfermedad se transmite fácilmente por operaciones de riego, cultivo, lluvia, salpicaduras y además por la diseminación de esporas en el aire. La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad es de 19 a 23 °C y es posible que el agua libre intervenga en el desarrollo y propagación de esta enfermedad (Vu, 2007).

Hoy en día se tiene una idea de lo que representa el patógeno como problema fitosanitario y si se ha podido identificar ciertas especies en estudios de distintos lugares del mundo , por lo tanto es importante desarrollar un estudio robusto que pueda identificar el patógeno causal de la enfermedad en el Ecuador. *Pestalotiopsis sp.* es un hongo que presenta una microscopía con conidios multiseptados, además cuenta con apéndices, con un número y tamaño que depende de cada especie, aunque en la mayoría de los casos es similar; con tres apéndices apicales y de 1 a 2 apéndices basales. (Dung, Thi, Hoang, & Ngoc, 2016). Además, un aspecto macroscópico por lo general con un micelio blanco

algodonoso en el anverso y con un color marrón oscuro en el reverso (Mouden, Benkirane, Ouazzani, & Douira, 2014). Sin embargo, se ha encontrado una gran diversidad en el fenotipo y se ha agrupado al hongo según sus similitudes en morfología, basándose en características como el color, la longitud, el ancho y el número de los conidios, y también de los apéndices. Según Maharachchikumbura et. al. (2014) se realizó una reclasificación del género con un análisis de secuencia basado en diferentes genes de la subunidad grande del ribosoma, además se unieron otro análisis de múltiples genes realizados en el año 2012 y se revelaron dos géneros más. Entonces se tuvo información de los conidios como el color marrón pálido, versicolor y marrón oscuro, apoyado de los análisis de moleculares y de filogenia que resolvió tres grupos muy bien respaldados. Entonces, además de *Pestalotiopsis* sp. se introducen dos nuevos géneros: *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*; por lo tanto, algunas especies de *Pestalotiopsis* conocidas mediante el aislamiento por cultivos convencionales fueron asignados a *Neopestalotiopsis* y *Pseudopestalotiopsis*. En el estudio de Maharachchikumbura et al. (2014) se realizaron los análisis filogenéticos con los marcadores moleculares: regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) y regiones génicas de β -tubulina parcial (β -TUB) que determinan los límites de las especies en los tres géneros lo cual se ha visto que tiene grandes resultados para la identificación de estos hongos. La región ITS es una secuencia de ADN ribosomal nuclear que esta presente en los hongos y que se usa mucho para la identificación de estos. La región ITS es muy útil para analizar de forma sistemática y molecular a los hongos a nivel de especies debido al alto nivel de variación de la región ITS en comparación con otras regiones (Martinez, 2006). Por otro lado, los genes de la región β -TUB son subunidades esenciales de los microtúbulos que estan presentes en estos agentes fúngicos, además esta familia de tubulinas tiene una alta tasa de conservación lo cual implica que este gen es interrumpido por intrones y la posición de

estos intrones se conserva en todas las especies que se han investigado hasta ahora, por ello se puede realizar un diseño sencillo de cebadores en torno a esta región (Frias, et al., 2014).

Después de tener en consideración los aspectos generales acerca del problema que está sucediendo con los cultivos de frutilla y del posible patógeno que podría estar involucrado se podrá aislar e identificar mediante técnicas de identificación morfológica y caracterización molecular a este agente fúngico patógeno. Por lo tanto, se aislará al agente presente en tejidos de plantas enfermas para poder realizar cultivos y caracterizar con observación macro y microscópica al hongo. Además, es importante identificar al patógeno mediante el uso de técnicas moleculares y filogenéticas como en el estudio de Maharachchikumbura, et al. en el año 2014, para de este modo amplificar mediante PCR con marcadores moleculares ITS y β -TUB que son propicios para hongos (Martinez, 2006), y además construir el mismo árbol filogenético concatenado con las secuencias obtenidas en este estudio y con las secuencias de la filogenia realizada por Maharachchikumbura (2014) para de este modo obtener información acerca de la especie de interés e identificar de forma exacta al patógeno.

2. MÉTODOS

2.1. Análisis de Microbioma usando NGS

Para el análisis de microbioma se recolectaron planta de frutilla enfermas y sanas, obteniendo un pool de ADN de 3 plantas sanas y 3 enfermas. Luego se procedió a extraer el ADN de estas muestras con power soil Dneasy kit del proveedor de tecnologías de muestra y ensayo para diagnostico molecular QIAGEN. El ADN extraído se lo mando al high throuput sequencing facility de UNC Chapel hill de Carolina del Norte en EEUU. Se realizó Next Generation Sequencing con el marcador molecular ITS que es la región espaciadora interna, para de este modo poder comparar el microbioma de las plantas sanas con las plantas enfermas.

2.2. Recolección y desinfección de las muestras

Se recolectaron 15 plantas enfermas de frutilla del área de estudio que fue en la parroquia Yaruquí Canton Quito, provincia de Pichincha en la que se tiene un terreno de aproximadamente 1600 m², en el que se tiene cultivos de alrededor de 5000 plantas de frutilla de la variedad Albión; el terreno se encuentra en las coordenadas -0.163228, -78.328259. Se recolectaron plantas que tengan la sintomatología que se reporta en la literatura es decir marchitamiento de la planta en general, hojas con coloración marrón y con un aspecto seco, además una coloración café con un toque de naranja en los tejidos vasculares del cuello y en las raíces. Las plantas se recolectaron desde la raíz y se colocaron en fundas para llevarlas en un cooler al laboratorio de biotecnología agrícola y alimentos de la USFQ. En el laboratorio se procedió a lavar las plantas con agua potable para eliminar la tierra presente en las raíces, hojas y tallo; posterior a esto se realizó una disección de los cuellos de las diferentes plantas para obtener explantes los cuales fueron desinfectados con el protocolo establecido por Fraire et al. (2003), con leves

modificaciones. Se realizó un lavado del cuello de cada planta con cloro a una concentración del 2.5% por 1 minuto y se secó el exceso con papel que fue previamente esterilizado en el autoclave, luego se lavó los cuellos nuevamente pero con alcohol al 70% durante 1 minuto y se secó de igual manera el exceso con papel estéril. Finalmente, se procedió a lavar los explantes con agua destilada estéril durante 1 minuto y se secó nuevamente con papel estéril.

2.3. Preparación de medios de cultivo

Para este estudio se procedió a realizar 3 diferentes medios de cultivo que según la literatura, (Cañedo y Ames, 2004), son los más propicios para el crecimiento de hongos, por lo tanto, se preparó medio Czapeck, V8 y Potato Agar Dextrose (PDA). Primero se pesó cada medio de cultivo en polvo en la balanza según las indicaciones para la preparación de 1 litro de medio de cultivo de cada tipo, luego se colocó el agua destilada para proceder a colocar los ingredientes en un frasco de vidrio de 1 litro, y colocarlo en la plancha agitadora para que se diluya la mezcla hasta que hierva. Luego se ingresaron los frascos en el autoclave y se los esterilizó por un aproximado de 20 minutos a una temperatura de 121 °C y a 1 atm de presión. Luego, se dispensó cada medio de cultivo en cajas Petri, pero se añadió una ampolla de 160 mg/ml de gentamicina para inhibir el crecimiento de bacterias y que no se contaminen los medios.

2.4. Siembra del material vegetal en los distintos medios de cultivo

De las 15 plantas recolectadas se obtuvieron 90 explantes los cuales se sembraron 1 por caja Petri, entonces se realizó la siembra por duplicado para cada tipo de medio de cultivo, obteniendo 30 cultivos para Czapeck, 30 cultivos para V8 y 30 cultivos para PDA. Cada explante de aproximadamente 1 cm de largo por 1 cm de ancho fue sembrado en el centro de cada caja Petri con medio de cultivo, para de este modo poder aislar los patógenos presentes en la planta, esto se realizó con técnicas microbiológicas usando una

cámara de flujo laminar y con la presencia de un mechero (Dung, et al., 2016). Los medios de cultivo fueron sellados con parafilm y se procedió a almacenarlos en la incubadora a una temperatura de 28 °C por un tiempo de 10 días desde la inoculación inicial. Fue importante dejar esporular a los hongos en la luz oscura por aproximadamente 3 días. Luego de este tiempo se observaron las cajas que presentaban bacterias y fueron descartadas, ya que a pesar de tener gentamicina en el medio si se contaminaron ciertos cultivos (Dung, Thi, Hoang & Ngoc, 2016). De los cultivos que presentaban hongos se realizaron varios subcultivos hasta obtener una sola morfología por caja, y por morfología macroscópica se fueron descartando los hongos que no era similares al hongo de interés. Es importante mencionar que la mayoría de subcultivos se realizó en el medio PDA.

2.5. Identificación macro y microscópica de los hongos

Después al tener ya los diferentes subcultivos se procedió a observar macroscópicamente las cajas Petri, y diferenciar el micelio e identificar color, aspecto, y cualquier otra característica representativa del anverso y del reverso del cultivo del hongo. Además, se procedió a tomar una muestra del micelio con una cinta adhesiva para colocarla en un portaobjetos y con colorante en este caso azul de metileno observar la muestra en el microscopio, en 40X y 100X, este proceso se lo realiza dentro de la cámara de flujo (Dung, Thi, Hoang, & Ngoc, 2016). En el microscopio se visualizaron las diferentes estructuras, como son la hifas y los conidios para de este modo poder diferenciar entre géneros y corroborar que se trate del hongo de interés para el estudio. Se usó un microscopio con cámara para fotografiar las estructuras mediante el software Leica y se obtuvieron fotografías con medidas de los conidios y de los apéndices para poder realizar la caracterización morfológica y agrupar a los hongos que presentaban fenotipos iguales (Wei & Xu, 2004).

2.6. Extracción de ADN

Para la extracción de ADN del micelio del hongo se usó nitrógeno líquido, entonces se procedió a raspar el micelio de 4 muestras y colocar el raspado en un mortero en el cual se colocó nitrógeno líquido y se lo trituró para obtener un polvo fino el cual fue usado en un kit de extracción de ADN (Wei & Xu 2004). El kit de extracción de ADN de hongos utilizado fue E.Z.N.A, con el cual se pudo extraer ADN al seguir las instrucciones del protocolo y luego se almacenó el ADN a -20°C . Luego se realizó un gel de agarosa al 1% para cargar el ADN extraído y observar la presencia del mismo, y de este modo corroborar que el proceso de extracción fue exitoso (Maharachchikumbura, et al., 2014).

2.7. Amplificación de la región ITS y β -TUB mediante PCR

Según Maharachchikumbura, et. al., 2014, las muestras de ADN genómico extraídas se llevó a cabo la técnica de biología molecular conocida como reacción en cadena de la polimerasa PCR, para las dos regiones de interés en el estudio, ITS y β -TUB. Se usaron los primers universales ITS4 forward con una secuencia (5' a 3') de TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC e ITS5 reverse con secuencia (5' a 3') de GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G. Además, para la región TUB se usaron los primers T1 forward con secuencia (5' a 3') de AAC ATG CGT GAG ATT GTA AGT y primer reverse Bt2b con secuencia (5' a 3') ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC (Maharachchikumbura, et al., 2014). Se realizó un master mix de PCR para el marcador molecular ITS en base a los reactivos y concentraciones de la tabla 1, y para el marcador molecular β -TUB en base a los reactivos y concentraciones de la tabla 2. Posteriormente los componentes del master mix fueron divididos en distintas reacciones individuales dentro de tubos de PCR en los cuales se colocó el ADN del hongo de interés. Los tubos de PCR se corrieron en el termociclador con los tiempos y temperaturas de la tabla 3 y tabla 4 respectivamente para ITS y β -TUB. (Maharachchikumbura, et al., 2014).

Tabla 1: Componentes para la preparación del master mix de PCR para ITS.

	Hongo	Master Mix
	X 1 (ul)	X 5 (ul)
H2O	16,35	81,75
Buffer 10X	2,5	12,5
BSA	1	5
MgCl ₂	0,75	3,75
dNTPs	0,5	2,5
Primer F	1,25	6,25
Primer R	1,25	6,25
taq	0,4	2
	24	120/5= 24 ul + 1 ul de ADN

Tabla 2: Componentes para la preparación del master mix de PCR para β -TUB.

	Hongo	Master Mix
	X 1 (ul)	X 6 (ul)
H2O	12,8	76,8
Buffer 5X	5	30
BSA	1	6
MgCl ₂	1,5	9
dNTPs	0,5	3
Primer F	1,25	7,5
Primer R	1,25	7,5
DMSO	0,5	3
taq	0,2	1,2
	24	144/6= 24 ul + 1 ul de ADN

Tabla 3: Programa del termociclador para realizar la PCR de primers ITS.

Procesos	Temperatura °C	Tiempo	N ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	
Desnaturalización	95	30 s	35
Annealing	52	45 s	
Extensión	72	90 s	
Extensión Final	72	10 min	

Tabla 4: Programa del termociclador para realizar la PCR de primers β -TUB.

Procesos	Temperatura °C	Tiempo	N ciclos
Desnaturalización inicial	94	3 min	
Desnaturalización	94	30 s	30
Annealing	57	60 s	
Extensión	72	120 s	
Extensión Final	72	7 min	

Finalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% durante 30 minutos a 100 mv para de este modo comprobar que se amplifique de forma correcta el segmento de ITS de 600 bp y de β -TUB de aproximadamente 750 bp. Se observó la banda del tamaño esperado para cada marcador, con ayuda del fotodocumentador.

2.8. Preparación de muestras para secuenciación y análisis bioinformático

Los productos de PCR de las 4 muestras de ADN amplificadas se mandaron a secuenciar en Macrogen en Corea del Sur, esta secuenciación fue realizada con la técnica de Sanger. De las 4 muestras solo se tomó en cuenta 1 muestra de la cual se obtuvo su secuencia y se realizó el análisis informático con el software MEGA7 y BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para determinar la especie del posible agente fúngico (Maharachchikumbura, et al., 2014).

2.9. Construcción de árbol filogenético concatenado

Finalmente, se procedió a construir un árbol filogenético concatenado con las secuencias del artículo de Maharachchikumbura et al publicado en el año 2014, y con las secuencias obtenidas en este estudio del ADN de hongo amplificado mediante PCR con el marcador molecular ITS y β -TUB (Maharachchikumbura, et. al., 2014). Para la construcción del árbol se uso MEGA7 para alinear las secuencias del artículo con las secuencias obtenidas en este estudio, posterior a esto se usó el programa BEAST en el

cual se corrieron 100 millones de árboles, luego en TreeAnnotator se uso un burnin de 10 millones de árboles y finalmente se obtuvo el árbol con el software Figtree. Se realizó un árbol de inferencia bayesiana, con un modelo de sustitución GTR+ G+ I. (Maharachchikumbura, et. al., 2014).

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de Microbioma usando NGS

En el año 2017 se realizó un estudio por parte de Andrés Núñez en el laboratorio de Biotecnología Agrícola de la USFQ, en el cual se realizó el aislamiento y caracterización molecular de diferentes agentes fúngicos en la frutilla, sin embargo, aquí se encontraron diferentes hongos endófitos, como: *Clonostachys byssicola*, *Xylaria venosula*, *Fusarium solani*, *Aspergillus fumigatus*, entre otros, los cuales no se los ha relacionado con ninguna enfermedad en la Frutilla, por lo tanto no se pudo determinar ningún hongo sospechoso de patogenicidad. Entonces, en el UNC Chapel Hill se realizó con la ayuda del profesor de la USFQ Paúl Cárdenas un análisis de microbioma usando Next Generation Sequencing con el marcador molecular Internal Transcribed Spacer o mejor conocido como ITS.

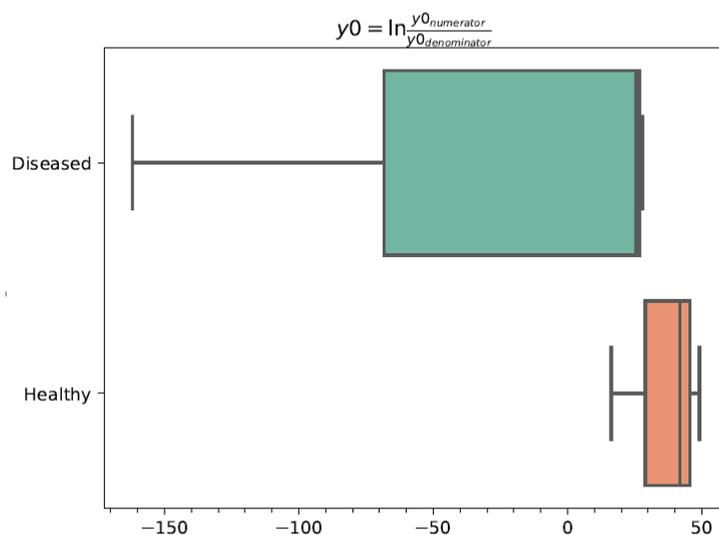


Figura 1: Comparación de la abundancia de hongos entre plantas enfermas y sanas mediante el análisis de microbioma.

Se observa en la figura la diferencia en términos de abundancias de las plantas enfermas con las plantas sanas, lo cual indica que hay una mayor cantidad de microorganismos relacionados con la enfermedad presente en un planta.

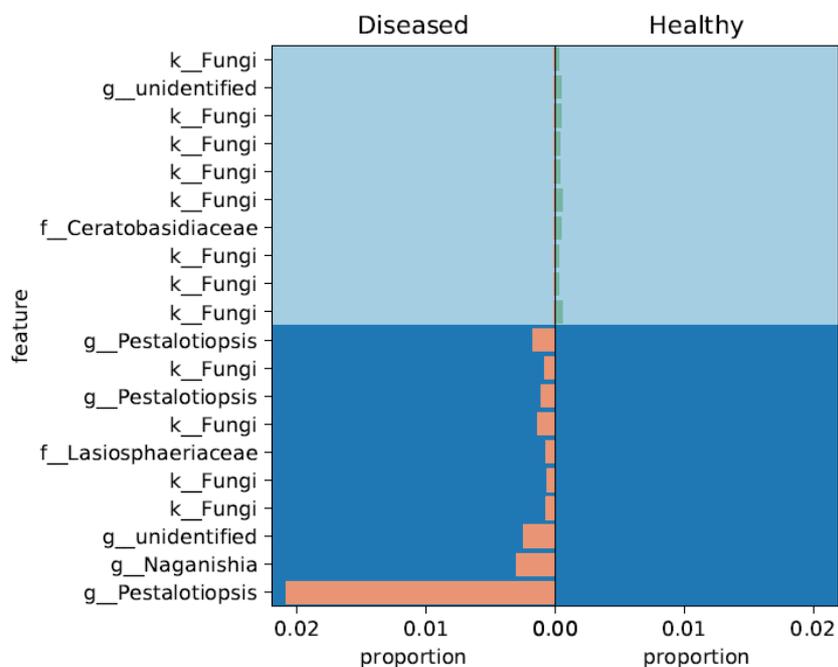


Figura 2: Comparación de los hongos presentes en plantas enfermas y sanas mediante el análisis de microbioma.

Se observa en la figura 2 que en plantas enfermas existe una mayor proporción del hongo *Pestalotiopsis* sp. de 0,02 en comparación con las plantas sanas y con otros hongos presentes también en plantas enfermas que estaban en una proporción aproximada de 0,0025, lo cual sugiere que el posible hongo patógeno es *Pestalotiopsis* sp.

3.2. Recolección y desinfección de las muestras

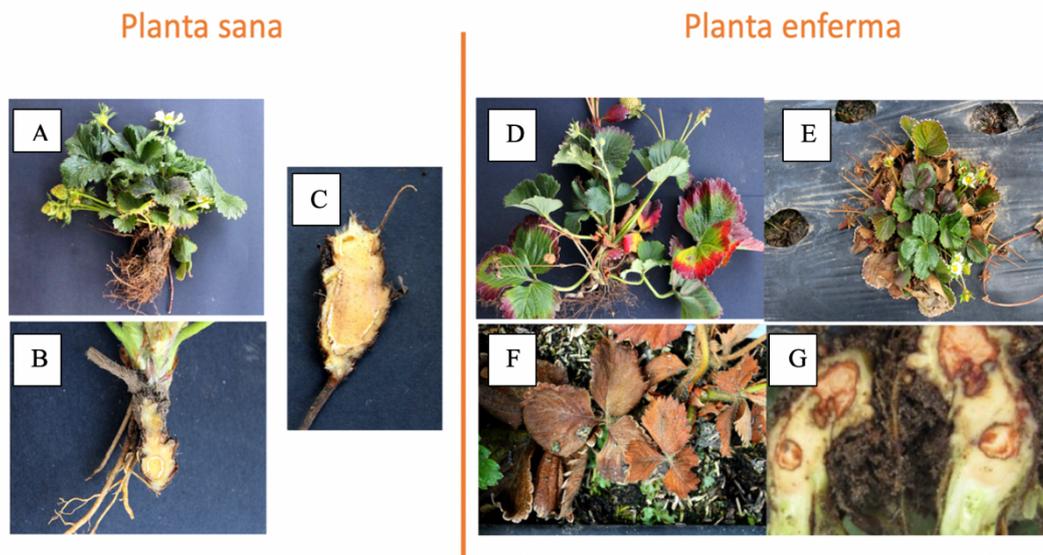
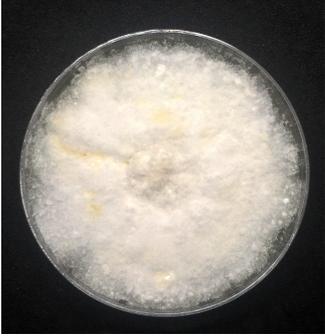


Figura 3: Comparación de los tejidos de una planta sana vs una planta enferma.

En la figura se observan los resultados de la recolección de enfermas y sanas para de este modo comparar las diferentes sintomatologías que presenta la planta contaminada por el hongo y diferenciarla de una planta sin infección. Se puede ver en la parte derecha que tanto el follaje, como el cuello de la planta presentan una coloración marrón con presencia de manchas necróticas y tejidos muy marchitos. En la imagen A se observa la planta sana en su totalidad, imagen B y C el cuello y la raíz sana. En la imagen D se observa la planta en su totalidad con una sintomatología inicial, E planta con sintomatología mas desarrollada, F planta con hojas y tejido necrosado, G cuello de la planta con manchas necroticas por la infección.

3.3. Identificación macro y microscópica de los hongos

Tabla 5: Identificación macroscópica y microscópica del hongo encontrado en el medio de cultivo PDA.

Descripción	Vista Superior	Vista Inferior	Microscopía (100X)
Micelio blanco, algodonoso, crece en forma de roseta. Base de color amarillo y con presencia de acérvulos negros distribuidos en círculos concéntricos. Conidios elipsoidales, multiseptados, de color marrón, con presencia de apéndices.			

En la tabla se puede observar la identificación macroscópica y microscópica del hongo de interés mediante la utilización de distintas técnicas microbiológicas. Se observa el micelio en su anverso y reverso, y además su microscopía en 100X.

Tabla 6: Medidas de las conidias del hongo de interés.

Aislado	Tejido	Tamaño conidia (μm)			Número Segmentos	Tamaño de segmentos
		Largo	Ancho base	Ancho punta		Largo
<i>Neopestalotiopsis saprophytica</i>	Cuello de la Frutilla	$25,03 \pm 2,72$	$2,52 \pm 0,25$	$5,28 \pm 0,34$	$4,3 \pm 0,73$ Rango: 4 - 7	$6,17 \pm 0,46$

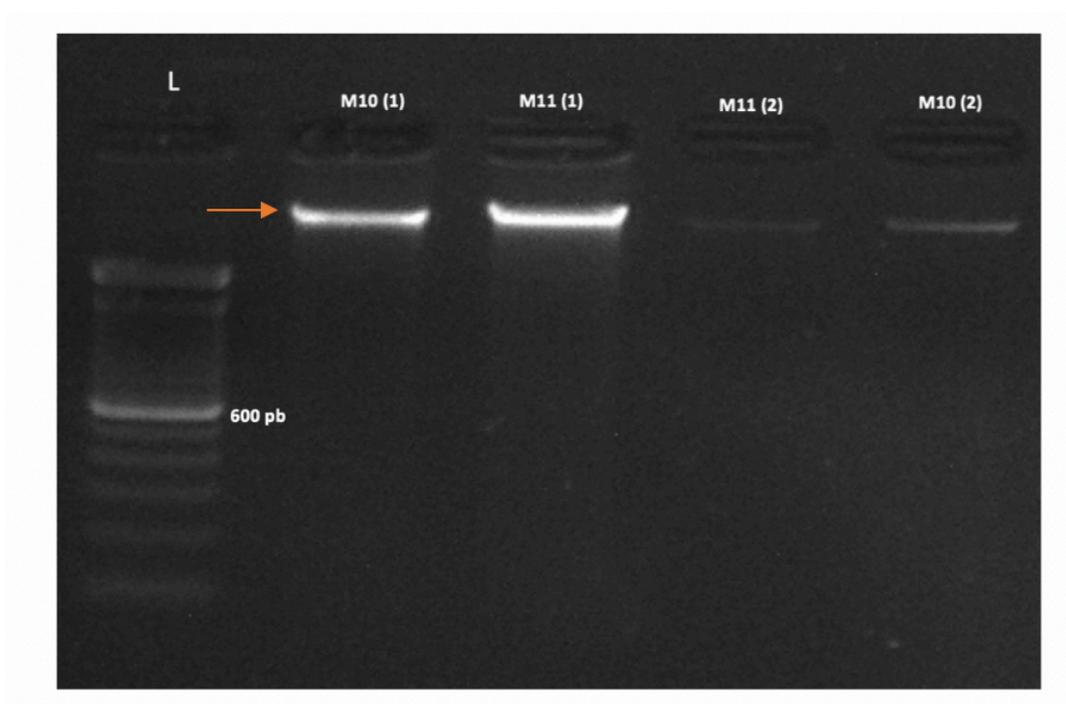
En la tabla se observan los diferentes promedios de las medidas de las conidias del hongo de interés, que se extrajo del cuello de la frutilla. Junto al valor de la medida se encuentra la desviación estandar respectiva para cada parámetro.

Tabla 7: Medidas de los apéndices del hongo de interés.

Aislado	Tejido	Tamaño apéndices (μm)		Número apéndices	
		Largo Superior	Largo Inferior	Superior	Inferior
<i>Neopestalotiopsis saprophytica</i>	Cuello de la Frutilla	$26,55 \pm 8,77$	$11,48 \pm 3,02$	$3 \pm 0,30$	$1,25 \pm 0,44$

En la tabla se observan los diferentes promedios de las medidas de los apéndices del hongo de interés, que se extrajo del cuello de la frutilla.

3.4. Extracción de ADN

**Figura 4:** Electroforesis en gel de agarosa para la extracción de ADN de hongo.

En la figura se observa la electroforesis en gel de agarosa obtenida para observar la presencia de ADN genómico extraído del hongo de interés.

3.5. Identificación molecular mediante la amplificación de ADN del hongo con marcadores moleculares ITS y β -TUB

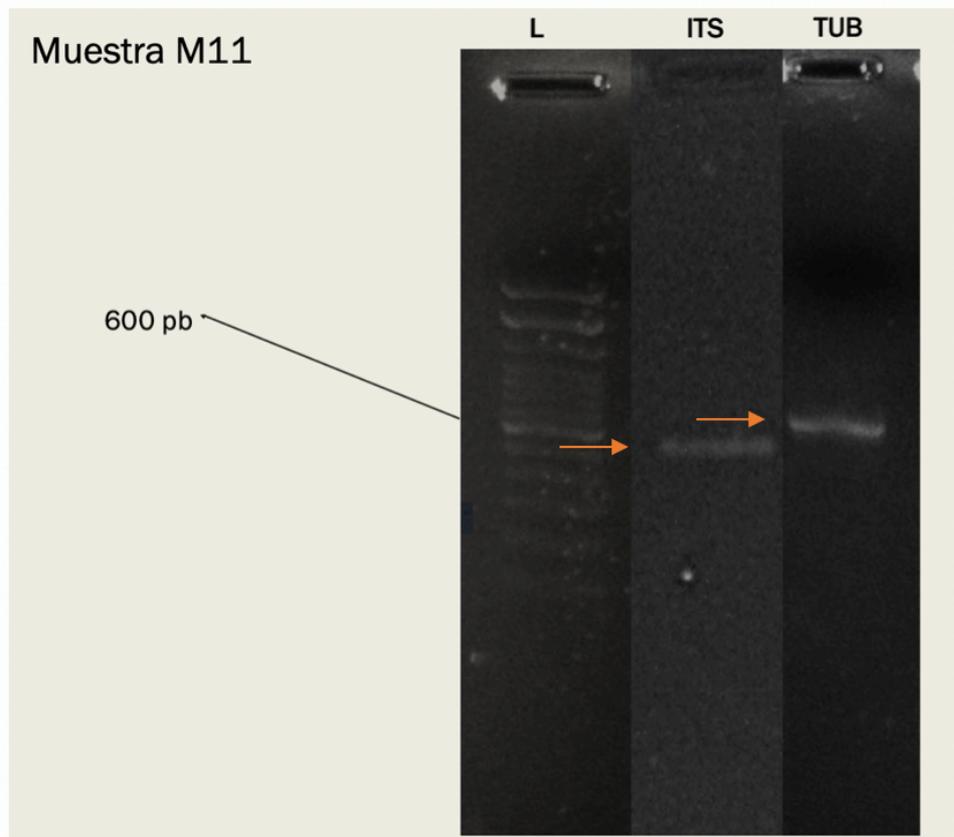


Figura 5: Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de los fragmentos de ADN para las regiones ITS y β -TUB.

En la figura se observa el gel de agarosa resultado de la electroforesis en el cual se observa las bandas esperas de 600 bp para ITS y 750 bp para β -TUB. En el primer carril se observa el ladder de 100 bp de invitrogen, en el segundo carril se encuentra la muestra M11 para la amplificación con los primers para ITS y en el tercer carril se observa la amplificación con los primers para β -TUB.

Tabla 8: Identificación molecular de los diferentes hongos obtenidos mediante el software BLAST con el marcador molecular ITS.

Aislado	Identificación	Región ITS		
		Tamaño (bp)	Identidad	Accession
M11	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	550	100%	MK620299.1
	<i>Neopestalotiopsis rosae</i>	553	100%	MN385720.1
	<i>Neopestalotiopsis rosae</i>	555	100%	MN385719.1
	<i>Neopestalotiopsis rosae</i>	574	100%	MN385718.1
	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	505	100%	MK895144.1
	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	526	100%	MK895143.1
	<i>Neopestalotiopsis rosae</i>	504	100%	MK895141.1
	<i>Pestalotiopsis sp.</i>	520	100%	MK808087.1
	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	560	100%	MH301324.1
	<i>Neopestalotiopsis clavispora</i>	479	100%	MK629322.1

En la tabla anterior se presenta la identificación molecular de los diferentes posibles hongos que se obtuvieron al usar el marcador ITS. Con las secuencias se puede determinar mediante el software BLAST la identidad de cada uno de estos posibles hongos y su tamaño en bp.

Tabla 9: Identificación molecular de los diferentes hongos obtenidos mediante el software BLAST con el marcador molecular β -TUB.

Aislado	Identificación	β tub		
		Tamaño (bp)	Identidad	Accession
M11	<i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i>	784	99,87%	KM199435.1
	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	802	99,47%	KX895346.1
	<i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i>	760	100%	KM199441.1
	<i>Neopestalotiopsis cubana</i>	769	99,60%	KM199438.1
	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	793	99,60%	KM199434.1
	<i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	785	99,46%	KM199437.1
	<i>Neopestalotiopsis mesopotamica</i>	792	99,46%	KM199436.1
	<i>Neopestalotiopsis saprophytica</i>	790	99,46%	KM199433.1
	<i>Pestalotiopsis clavispora</i>	782	99,07%	EF152585.1
	<i>Neopestalotiopsis sp.</i>	796	99,19%	KM199440.1

En la tabla se observa la identificación obtenida al ingresar las secuencias obtenidas en el software BLAST y de este modo obtener los posibles hongos con sus diferentes tamaños y porcentaje de identidad.

3.6. Construcción árbol filogenético

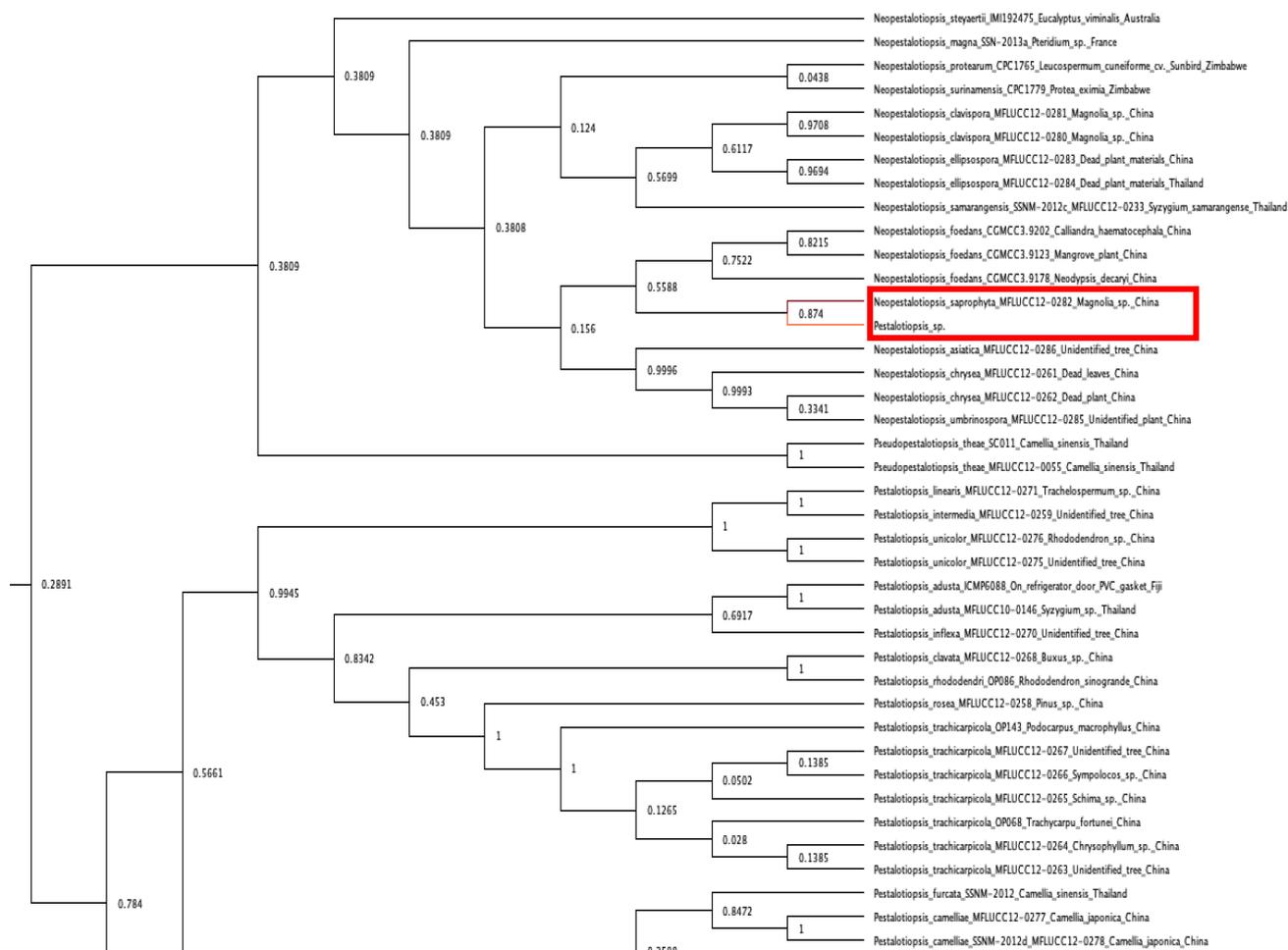


Figura 6: Árbol filogenético de inferencia bayesiana, con modelo de sustitución GTR+ G+ I.

En la figura 6 se tiene el árbol filogenético obtenido mediante el uso del software BEAST, TreeAnnotator y Figtree. Se presenta un árbol de inferencia bayesiana, con un modelo de sustitución GTR+ G+ I, y con sus probabilidades posterior en cada rama. Se tiene que la secuencia del estudio “*Pestalotiopsis sp.*” que es el aislado de *Fragaria sp.* de Ecuador cae justo junto a *Neopestalotiopsis saprophytica* con una probabilidad posterior de 0,874.

4. DISCUSIÓN

En el Ecuador y específicamente en Yaruquí se observan síntomas bien característicos de la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis saprophytica*, los cuales son similares a los síntomas causados por los otros géneros como es el caso de *Pseudopestalotiopsis sp.* y *Pestalotiopsis sp.*, esto se ha observado en diferentes estudios realizados en otros países como es el caso del estudio de Vietman por Dung et.al., estudio del año 2016 en el cual se realiza una observación general de los síntomas de la enfermedad y caracterizó morfológicamente el hongo mediante el aislamiento del mismo con la ayuda de técnicas microbiológicas. Posterior a esto se realiza una prueba de patogenicidad para ver como el hongo infecta a las frutillas y cuál es su proceso de infección (Mouden, Benkirane, Ouazzani, & Douira, 2014). (Vu, 2007). A pesar de que el estudio determinó que el hongo fue *Pestalotiopsis sp.* es importante recalcar que tales estudios que no usan una caracterización molecular o un estudio con análisis filogenéticos no pueden ayudar a determinar con exactitud el género y peor aún la especie de un patógeno (Vu, 2007). Esto sucede de igual manera en otros estudio como es el caso del estudio realizado en Marruecos realizado por Mouden et.al., en el año 2014 o de igual forma el estudio del año 2017 por Ara et.al., en los cuales se realiza de igual forma un análisis de observación de síntomas, de aislamiento de hongos y pruebas de patogenicidad resultando en *Pestalotiopsis longisetula* en el primer caso y *en Pestalotiopsis sp.* en el segundo artículo mencionado. Esta determinación de género y especie como se mencionó puede resultar no tan efectiva puesto que se está tratando de identificar un patógeno a un nivel de género y especie mediante una observación simple de síntomas y un aislamiento para observar morfología, lo cual si da un preámbulo del posible resultado pero no podría definir con exactitud cual es el patógeno causal de la enfermedad (Vu, 2007).

Por lo tanto, en el estudio presente es crucial el análisis molecular, y el análisis filogenético que se combina con la observación de sintomatología y caracterización morfológica para de este modo obtener un resultado más confiable. Además, es muy probable que en estos estudios anteriores se pudo haber tratado de *Neopestalotiopsis* sp. o de *Pseudopestalotiopsis* sp., pero al no tener análisis moleculares ni filogenéticos pudo haber una incipiente clasificación de los mismo y por obtener un resultado erroneo, ya que es gracias a la reclasificación de Maharachchikumbura et al., que se pudo tener diferencias entre los 3 linajes que se diversificaron y se pudo finalmente comprender que se trataban de 3 géneros diferentes pero que eran a la vez muy similares por lo cual causaba confusión.

Es importante mencionar que se existen otro tipo de marcadores moleculares que se han probado en la identificación de estos 3 géneros y también de sus diferentes especies y otro marcador molecular que es muy usado es TEF que es el gen del factor de elongación 1 alfa. Este marcador molecular se usa mucho en estudio para identificación y comparación de los 3 géneros y además se cree que es de gran ayuda para poder separar mejor especies dentro del género *Neopestalotiopsis* y así poder tener resultados más confiable y eficientes (Maharachchikumbura, et.al, 2014). Igualmente se cree que para poder definir mejor el límite entre especies sería de gran ayuda el tomar en consideración otros factores como por ejemplo las diferentes influencias geográficas que pueda tener el hongo, el sustrato al que el posible hongo patógeno esta adherido o esta infectando, el rango de hospedadores ya que en muchos casos infectan diferentes hospedadores y se podría determinar un rango de cuales y cuantos hospedadores cada hongo se asocia, y a estos diferentes parametros añadir los caracteres de morfología y los datos moleculares de las secuencias para obtener un estudio mucho más robusto y que sea aun más informativo (Maharachchikumbura, et.al, 2014).

En cuanto a características de la morfología del hongo se conoce que para tener una mejor definición de los colores y de la forma de las colonias y conidios del mismo sería importante tomar en consideración otras técnicas para la observación al microscopio como es el caso del uso de KOH para evitar la tinción con azul de metileno y de este modo el colorante no interfiera y cambie el color natural del conidio o de los apéndices (Cañedo y Ames, 2004). En cuanto al tamaño de las conidias se ha visto que no es un factor muy representativo para delimitar especies, ya que según distintos autores como es el caso de Dube y Bilgrami AÑO , se cree que estas medidas no relacionan especies en su totalidad puesto que consideran que este es un carácter homoplásico, es decir que es una característica que es similar en dos o más taxones que no es heredad del último antepasado común si no que ha evolucionado de forma independiente (Dube y Bilgrami, 1966). Esto aún esta en debate, pero una característica que si es importante para la delimitación de especies son los apéndices ya que estos permiten diferenciar con mayor exactitud entre especies, mas que nada por la diferencia en el número de apéndices apicales y basales, ya que los tamaños por lo general suelen estar dentro del mismo rango en común (Maharachchikumbura, et.al, 2014).

Según el análisis en el software BLAST se obtuvo que los posibles hongos para los dos marcadores moleculares podrían ser *Neopestalotiopsis* sp. o *Pestalotiopsis* sp., considerando el porcentaje de identidad, se pudo observar que existían muchos valores altos que eran o iguales al 100%, lo cual indica las coincidencias de las secuencias cargadas al software en comparación con las secuencias de la base de datos, pero además es importante considerar otro valores como es el caso del e-value que mientras sea menor es mejor, y se obtuvieron para todos los hongos un valor de 0, y además el query coverage que es el porcentaje en el que la secuencia subida se alinea con las secuencias de la base de datos (Maharachchikumbura, et.al, 2014). A pesar de que es un software que da

información, no permite determinar con exactitud cuál es el hongo aislado, ya que los valores obtenidos para cada hongo tienden a confundir bastante, lo único que se sabía desde un principio es que el género *Pseudopestalotiopsis sp.* se descartó ya que no apareció en la identificación molecular. Para determinar con exactitud el hongo de interés es necesario que se construya el árbol filogenético.

En cuanto a los análisis filogenéticos se obtuvo según el árbol de inferencia bayesiana que el patógeno es *Neopestalotiopsis saprophytica*, ya que la secuencia de este estudio para los marcadores ITS y β -TUB cayó junto al hongo mencionado, se obtuvo una probabilidad posterior de 0,874 lo que quiere decir que se tiene un 87 % de confiabilidad de que este resultado es correcto, ya que la probabilidad posterior es la probabilidad de que el árbol sea el correcto. Aún existe un debate en cuanto a que valor se lo considera significativo para un estudio de filogenia, sin embargo hay muchos investigadores que consideran que un valor de probabilidad posterior mayor a 0,70 puede considerarse significativo (Maharachchikumbura, et.al, 2014).

5. CONCLUSIONES

La frutilla es una fruta de gran demanda que es demandada cada día más, y al observar que hay una enfermedad que esta matando sus cultivos es crucial entender y caracterizar a la misma para de este modo llegar a conocer cual es el agente causal y tomar decisiones para combatirlo. Este estudio ayudó a identificar el hongo patógeno de *Fragaria* sp. en los cultivos del area de estudio Yaruquí en Pichincha Ecuador, ya que se logró aislar el hongo con la ayuda de técnicas microbiológicas y se pudo realizar una caracterización de su morfología en cuanto a su macroscopía y microscopía obteniendo un hongo con características muy bien definidas, como su color blanco con aspecto algodonoso para el micelio en su anverso y su color marrón amarillento en su reverso, de igual forma su morfología de conidios multiseptados con color marrón y presencia de apéndices apicales y basales. Además el promedio de medidas permite tener un reporte claro de los promedios de las diferentes estructuras del hongo, lo cual permite delimitar entre géneros y especies. De igual forma mediante la extracción de ADN y la realización del PCR se logró amplificar los marcadores ITS y β -TUB para obtener un patrón de bandas esperado y poder obtener un análisis de las secuencias para identificar molecularmente los diferentes géneros y especies en el software BLAST y finalmente determinar el hongo patógeno con la construcción de un árbol concatenado de inferencia bayesiana con modelo GTR+ G+ I, que dio como identificación a *Neopestalotiopsis saprophytica*. Finalmente, sería importante para un futuro realizar pruebas de patogenicidad para de este modo ver como infecta el hongo a las plantas de frutilla, además buscar estrategias de manejo como un posible mejoramiento genético, y un análisis para usar fungicidas efectivos sobre el hongo lo cual disminuirá costos de producción, evitará

el uso indiscriminado de los mismos y causará menos daños a la salud del agricultor, consumidor y del ambiente.

6. REFERENCIAS

- (AGP, 2019). *Soil borne pests and diseases*. Obtenido de: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/spi/soil-biodiversity/soil-organisms/the-function-of-the-soil-community/pests-diseases/en/>
- Agronegocios. (2013). *Frutilla: producción y crecimiento*. Obtenido de: <http://agronegocioecuador.ning.com/page/fresas-su-produccion-y>
- Angulo, R. (2009). *Fragaria ananassa*. Bayer Crop Science S. A. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Ara, M., et.al. (2017). *The first report of Pestalotiopsis sp. causing crown rot disease on strawberry (Fragaria X ananassa Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity*. Bangladesh. International Journal of Biosciences
- Cañedo, V y Ames, T. (2004). *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos*. Lima, Perú; Centro Internacional de la Papa (CIP)
- Dung, L., Thi, N., Hoang, P., & Ngoc, P. (2016). *The first report of Pestalotiopsis sp. Causing crown rot disease on strawberries in Dalat*. Dalat University Journal of Science. Volume 6, Issue 3, 2016 364–376
- Dube, H., y Bilgrami, K. (1966). *A new species of Pestalotiopsis on the leaves of Rhododendron grande Wight*. Indian Phytopathology. 19:320-321
- FAOSTAT. (2017). *Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Datos, Cultivos de Ecuador*. Obtenido de: <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC/visualize>.
- Fraire, M.L., Yáñez, M., Nieto, A., y Gálvez, G. (2003). *Hongos Patógenos en Fruto de Fresa (Fragaria x ananassa Duch.) en Postcosecha*. Revista Mexicana de Fitopatología, diciembre, 285- 291.

- France, A. (2014). *Manual de la frutilla. Manejo de enfermedades en frutilla*.
Obtenido de:
<http://biblioteca.inia.cl/medios/biblioteca/boletines/NR39090.pdf>
- Frias, M., et.al. (2014). *Marcadores moleculares: una herramienta importante en el diagnóstico, tratamiento y epidemiología de la aspergilosis invasora*. *Cir Cir* 2014;82:109-118. México, México, DF.
- Garrido, C., Carbú, M., Fernández, F., Gonzáles, V. & Cantoral, J. (2011). *New Insights in the Study of Strawberry Fungal Pathogens*. Laboratory of Microbiology, Department of Biochemistry and Biotechnology, Environmental and Marine Sciences Faculty. University of Cádiz, 11510, Puerto Real, Spain.
- Maharachchikumbura, S., Hyde, K., Groenewald, J., Xu, J., & Crous, P. (2014). *Pestalotiopsis revisited*. *Studies in mycology* 79: 121–186.
- Martinez, E. (2006). *Marcadores moleculares aplicados a estudios de diversidad genética de hongos entomopatógenos*. *Revista CitriFrut*, Vol. 23, No. 2. Habana, Cuba.
- Mouden, N., Benkirane, R., Ouazzani, A., & Douira, A. (2014). *Pathogenic capacity of Pestalotia longisetula Guba reported for the first time on strawberry (Fragaria ananassa Duch.) in Morocco*. *Int. J. Pure App. Biosci.* 2 (4): 132-141. ISSN: 2320 – 7051
- Nuñez, A. (2017). *Aislamiento e identificación molecular de agentes fúngicos de la frutilla (Fragaria sp.) de Pichincha-Ecuador*. Quito: USFQ.
- Undurraga, P., y Vargas, S. (2013). *Manual de frutilla. Boletín INIA N° 262. 112 p.* Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.

- Verdugo, L. (2011). *Introducción de dos variedades de fresa (fragaria vesca) y técnica de fertirrigación empleando cuatro biofertilizantes líquidos en Pablo Sexto - Morona Santiago*. Ambato, Ecuador: Universidad técnica de Ambato.
- Vizcaíno, M. (2011). *Estudio de factibilidad para la producción y comercialización de frutilla (Fragaria chiloensis) en Checa – Pichincha*. Quito, Ecuador. USFQ.
- Vu, T. (2007). *Plant pathology textbook*. Hanoi: Publisher of The University of Agriculture and Forestry I.
- Wei, J. G. & Xu, T. (2004). *Pestalotiopsis kunmingensis sp. nov., an endophyte from Podocarpus macrophyllus*. Fungal Diversity 15, 247 – 254.