

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



TESIS:

**Caracterización morfológica y estandarización de protocolo para
la identificación molecular de géneros de hongos fitopatógenos
en palto (*Persea americana* Mill.), La Mar - Ayacucho**

Para optar el título profesional de:

INGENIERA AGRÓNOMA

PRESENTADO POR:

Bach. Ciynthia Isabel BAUTISTA PRADO

Asesor:

Ph.D. Germán Fernando DE LA CRUZ LAPA

Co-asesores:

M.Sc. Angela REQUIS QUINTANILLA

M.Sc. Eugenia Rocío QUISPE MEDINA

Ph.D.(c) Edgar NEYRA VALDÉZ

AYACUCHO - PERÚ

2024

DEDICATORIA

Al cumplir uno de mis objetivos más anhelados, recuerdo con gratitud el respaldo, la motivación y el esfuerzo de aquellos que me inspiraron a perseverar. Agradezco a Dios, en gratitud por la vida otorgada y por infundirme el vigor, la sabiduría, la perseverancia para concluir mi educación y alcanzar las metas que me he trazado.

A mi familia y mis padres por su constante respaldo, con especial mención a Roberto Bautista y Mercedaria Bellido por su apoyo incondicional en mi formación profesional y en el alcance de mis aspiraciones.

A mis docentes y amigos, que hicieron valiosas contribuciones a mi desarrollo profesional a través de nuestras diversas experiencias compartidas.

Ciyntia Isabel

AGRADECIMIENTO

A la **Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH)**, que ha sido la base de mi formación profesional. A los maestros de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), por compartir sus invaluable lecciones, pericia y vivencias profesionales.

Al **Ph.D. Germán De La Cruz Lapa**, quien, como gestor y asesor del presente trabajo de investigación, confió en mí y me permitió llevar a cabo mi tesis bajo su dirección. Su respaldo, consejos y sugerencias fueron esenciales.

Al **Dr. Edgar Lidio Neyra Valdéz**, investigador y docente en la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH), por sus valiosas recomendaciones como co-asesor de esta investigación.

Al **M. Sc. Angela Requis Quintanilla**, co-asesora de esta investigación, quien siempre estuvo al tanto del avance de la investigación y por brindar una orientación y apoyo incondicional durante todo el proceso.

Al **M. Sc. Eugenia Rocío Quispe Medina**, co-asesora del trabajo de investigación, por la guía y dirección constante para la realización del trabajo.

Al **M. Sc. Susan Alarcón Ochoa**, por las sugerencias y la ayuda para la realización de la presente investigación.

Al **Círculo de Estudios e Investigaciones de Genética, Genómica y Biotecnología (CEIGB)**.

A mis amigos y compañeros del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal; asimismo, del Laboratorio de Fitopatología Agrícola con quienes se ha compartido diversas experiencias durante el proceso del trabajo de investigación.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE GENERAL	iv
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE ANEXOS	ix
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN:	2

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO	5
1.1. Antecedentes	5
1.2. Generalidades del palto (<i>Persea americana</i> Mill.)	7
1.2.1. Origen y distribución	7
1.2.2. Taxonomía	7
1.2.3. Descripción botánica	8
1.2.4. Fenología del cultivo de palto	8
1.3. Variedades del cultivo del palto	9
1.3.1. Palto Hass	9
1.3.2. Palto Fuerte	9
1.4. Porta injertos o patrones	10
1.5. Requerimientos edafoclimáticos	10
1.6. Enfermedades a nivel de tallo del palto	11
1.6.1. La familia Botryosphaeriaceae	11
1.6.2. Epidemiología y patogénesis	15
1.6.3. <i>Lasiodiplodia</i> spp.	17
1.6.4. <i>Dotiorella</i> spp.	20
1.6.5. <i>Pestalotiopsis</i> spp.	21
1.6.6. <i>Colletotrichum</i> spp.	24
1.6.7. <i>Fusarium</i> spp.	26
1.7. Métodos morfológicos para la identificación de hongos	29
1.7.1. Aislamiento	29

1.8. Métodos moleculares para la identificación de hongos.....	30
1.8.1. Extracción del ADN	30
1.8.2. Estructura de ácido desoxirribonucleico (ADN)	30
1.9. Métodos de evaluación de la calidad de ADN	31
1.9.1. Electroforesis	31
1.9.2. Espectrofotometría.....	31
1.10. Marcadores moleculares.....	31
1.10.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	32
1.10.2. Primers.....	33
1.10.3. Región ITS (espaciador transcrito interno)	33

CAPÍTULO II

METODOLOGIA.....	35
2.1. Ubicación del experimento.....	35
2.1.1. Lugares de muestreo.....	35
2.2. Colección de muestras	37
2.3. Aislamiento del patógeno	42
2.4. Preparación de medio de cultivo específico para estimular la esporulación	42
2.5. Conservación de aislamientos	43
2.6. Caracterización e identificación morfológica de aislamientos.....	43
2.7. Metodología para la identificación pre-molecular	44
2.7.1. Protocolo CTAB.....	44
2.7.2. Protocolo Möller.....	45
2.7.3. Protocolo Lee y Taylor	46
2.7.4. Protocolo Ristaino	47
2.7.5. Protocolo Huanca-Mamani.....	48
2.8. Evaluación de la calidad de ADN	49
2.8.1. Por espectrofotometría.....	49
2.8.2. Por densitometría (electroforesis).....	49
2.9. Pre PCR	50
2.10. PCR (Reacción en cadena de polimerasa).....	51
2.11. Post PCR.....	51
2.12. Prueba de patogenicidad.....	52
2.13. Porcentaje de incidencia	53

CAPITULO III

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
3.1. Identificación de las características morfológicas	54
3.1.1. <i>Lasiodiplodia</i> spp.	54
3.1.2. <i>Dotiorella</i> spp.	56
3.1.3. <i>Pestalotiopsis</i> spp.	58
3.1.4. <i>Colletotrichum</i> spp.	60
3.1.5. <i>Fusarium</i> spp.	62
Cepa 1. <i>Fusarium</i> spp.	62
Cepa 2. <i>Fusarium</i> spp.	64
3.1.6. Número de aislamientos caracterizados por zonas	66
3.1.7. Distribución de los géneros en la zonas muestreadas.....	67
3.2. Resultados de la estandarización para la extracción de ADN de hongos.....	70
3.3. Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectofometría.....	72
3.4. Resultados de la estandarización del pre-PCR con marcadores moleculares de genes ITS del ADN ribosomal	73
3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	73
3.5. Resultados de la Prueba de patogenicidad	76
 CONCLUSIONES	 79
RECOMENDACIONES	80
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81
ANEXOS.....	93

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2.1. Muestras de tallo obtenidas de las zonas de producción de palto de la provincia de La Mar.....	35
Tabla 2.2. Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (<i>Persea americana</i> Mill.) del distrito Tambo, provincia La Mar, región Ayacucho.	39
Tabla 2.3. Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (<i>Persea americana</i> Mill.), del distrito San Miguel, provincia La Mar, región Ayacucho.	39
Tabla 2.4. Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (<i>Persea americana</i> Mill.), del distrito Patibamba, provincia La Mar, región Ayacucho.	40
Tabla 2.5. Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (<i>Persea americana</i> Mill.), del distrito Ninabamba, provincia La Mar, región Ayacucho.	40
Tabla 2.6. Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (<i>Persea americana</i> Mill.), del distrito Chilcas, provincia La Mar, región Ayacucho.	41
Tabla 2.7. Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (<i>Persea americana</i> Mill.), del distrito Luis Carranza, provincia La Mar, región Ayacucho.	41
Tabla 2.8. Mezcla de Master mix para amplificación en PCR, para 4 reacciones.....	50
Tabla 2.9. Secuencias del cebador ITS en dirección 5'-3'	51
Tabla 3.1. Géneros identificados morfológicamente del total de asilamientos obtenidos en las zonas muestreadas de la provincia de La Mar.	67
Tabla 3.2. Resumen de principales características macroscópicas y microscópicos de aislamientos patogénicos que causan daños en tallos de palto (<i>Persea Americana</i> Mill.).....	69
Tabla 3.3. Cuantificación de ADN mediante Espectrofometría.....	73
Tabla 3.4. Porcentaje de incidencia de los resultados obtenidos de la prueba patogenicidad	78

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.1. Ciclo de patogénesis de <i>Botryosphaeria</i> spp.....	16
Figura 1.2. Esquema parcial del gen ADN ribosomal y sus espaciadores internos ITS1 e ITS2	34
Figura 2.1. Mapa de ubicación de los distritos donde se colectaron las muestras: Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, Chilcas y Luis Carranza.....	36
Figura 2.2. Recolección de muestras en las zonas de producción de palto de la provincia de La Mar.	38
Figura 2.3. Registro de datos pasaporte de las muestras obtenidas de palto en las zonas de producción de la provincia de La Mar.	38
Figura 3.1. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Lasiodiplodia</i> spp.....	55
Figura 3.2. Conidias de <i>Lasiodiplodia</i> spp.	56
Figura 3.3. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Dotiorella</i> spp.	57
Figura 3.4. Conidias de <i>Dotiorella</i> spp.	58
Figura 3.5. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	59
Figura 3.6. Conidias de <i>Pestalotiopsis</i> spp.	60
Figura 3.7. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Colletotrichum</i> spp....	61
Figura 3.8. Conidias de <i>Colletotrichum</i> spp.	62
Figura 3.9. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium</i> spp	63
Figura 3.10. Conidias de <i>Fusarium</i> spp.	64
Figura 3.11. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Fusarium</i> spp.	65
Figura 3.12. Conidias de <i>Fusarium</i> spp.	66
Figura 3.13. Porcentaje de participación de los géneros patogénicos.....	68
Figura 3.14. Comparación del ratio de crecimiento de los aislamientos	70
Figura 3.15. Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo CETAB.....	70
Figura 3.16. Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Moller.....	71
Figura 3.17. Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Taylor.	71
Figura 3.18. Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Ristaino.	71
Figura 3.19. Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo de Huanca-Mamani.	72
Figura 3.20. Productos de PCR amplificados para la región ITS.	74
Figura 3.21. Presencia de exudados alrededor del punto de inoculación	76
Figura 3.24. Prueba de patogenicidad en plantones de palto Hass	77

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
Anexo 1. Colección de muestras con síntomas característicos en campo y selección de muestras aptas en el laboratorio.....	93
Anexo 2. Protocolo de preparación de medio de cultivo PDA.....	95
Anexo 3. Procedimiento de aislamiento e identificación del patógeno.....	96
Anexo 4. Procedimiento para realizar la prueba de patogenicidad.	97
Anexo 5. Procedimiento para realizar extracción de ADN	98
Anexo 6. Procedimiento para realizar PCR.....	98
Anexo 6. Procedimiento para realizar PCR.....	99
Anexo 7. Mediciones de conidios de <i>Lasiodiplodia</i> spp.	100
Anexo 8. Mediciones de conidios de <i>Dotiorella</i> spp.....	102
.Anexo 9. Mediciones de conidios de <i>Colletotrichum</i> spp.	105
Anexo 10. Mediciones de conidios de la Cepa 1: <i>Fusarium</i> spp.	107
Anexo 11. Mediciones de conidios de la Cepa 2. <i>Fusarium</i> spp.....	108
Anexo 12. Mediciones de conidios de <i>Pestalotopsis</i> spp.....	109

RESUMEN

En Perú, el cultivo de palto (*Persea americana* Mill.) variedad “Hass” es el que tiene mayor demanda en el mercado internacional; sin embargo, uno de los factores que afecta el potencial del crecimiento del cultivo es el ataque de fitopatógenos asociados a tallos y ramas que limitan la producción óptima del cultivo. El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante características morfológicas y pre-moleculares de genes ITS (ADN ribosomal) para identificar el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho. Las características macroscópicas que se tuvieron en cuenta para la identificación son: ratio de crecimiento en medio de cultivo, tipo y color del micelio y las características microscópicas son: tamaño, forma y color de los conidias. Se realizó aislamientos a partir de muestras de tallos, de un total de 50 muestras de las localidades pertenecientes a los distritos de Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, Chilcas y Luis Carranza de la provincia de La Mar; región Ayacucho, Perú. Se obtuvieron 124 aislamientos puros de los cuales, mediante características morfológicas y moleculares, se identificaron cinco géneros: *Lasiodiplodia* spp. (43 %), *Dotiorella* spp. (15%), *Pestalotiopsis* spp. (15%), *Colletotrichum* spp. (15%) y *Fusarium* spp. (24%), estos géneros se consideran como agentes causales de enfermedades en tallos y ramas en el palto. La identificación molecular se realizó mediante extracción de ADN y la prueba de PCR (primer ITS1- 4). De acuerdo a la prueba de patogenicidad los cinco géneros identificados resultaron patogénicos.

Palabras clave: *Lasiodiplodia* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Dothiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., marcadores moleculares.

INTRODUCCIÓN

La producción del cultivo de palto (*Persea americana* Mill.) en Perú ha crecido significativamente, convirtiéndose en un producto clave para la exportación; sin embargo, los síntomas asociados a tallos, ramas y muerte regresiva, se han observado en plantaciones de palto en todo el país, lo que viene causando pérdidas económicas (Rodríguez-Gálvez et al., 2021).

La palta Hass peruana ha ganado relevancia en el mercado internacional, con un notable crecimiento en exportaciones y auge del cultivo, siendo la variedad Hass la más exportada (Flores-Izquierdo & Espinoza-Villanueva, 2023).

El Servicio de Sanidad Agraria del Perú (2024) afirma que la cadena agroexportadora de palta en el país está compuesta principalmente por productores de los valles interandinos de Ayacucho, Apurímac y Huancavelica, representando más del 80% de la agricultura familiar. El cultivo de palto en Ayacucho ha experimentado un crecimiento constante debido a su oportunidad comercial y la cosecha inicia entre febrero y marzo, lo que beneficia a los productores ubicados en esta parte del país.

Según Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (2024) en el presente año 2024, Perú afianzó su posición como segundo mayor exportador mundial de palta, por detrás de México, al exportar, entre enero y febrero 36360 toneladas por 75,4 millones de dólares; dicho volumen representa un incremento del 79,2% en volumen y del 72,7% en valor en comparación con el mismo periodo del año anterior.

Según el informe del INEI (2024) la producción palta en 2023 creció un 5.80%, llegando a 911 mil toneladas, lo que representa 50 mil toneladas más respecto al 2022, impulsado por el aumento de áreas cosechadas. Las exportaciones de palta alcanzaron 207 mil toneladas, siendo los principales destinos los Estados Unidos (113 mil toneladas),

Países Bajos (46 mil toneladas), China (17 mil toneladas), Reino Unido (13 mil toneladas), Hong Kong (10 mil toneladas) y Canadá (2 mil toneladas), que en conjunto abarcaron aproximadamente el 96% del total de volumen exportado.

El MINCETUR (2022) reporta que la región de Ayacucho es el séptimo productor de palta a nivel nacional (4% del total), en el año 2021 la producción de palta en Ayacucho fue 30.7 mil toneladas; en ese mismo año se logró exportar 3 332 toneladas de palta que registró un récord de casi US\$ 9 millones.

El Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú (2019) informa que la región de Ayacucho, provincia de La Mar, es uno de los centros de mayor producción de palta para exportación en sus variedades Hass y Fuerte, conquistando el mercado internacional, siendo el Valle del Torobamba la principal zona de producción.

En la región Ayacucho, el Valle de Torobamba destaca como la principal zona de producción (1247.38 toneladas métricas) seguido por el valle Huanta-Luricocha y la zona de producción Vilcas Huamán-Chincheros (SENASA, 2019).

En la región Ayacucho, la provincia de La Mar es reconocida como uno de los principales centros de producción del cultivo de palto a nivel regional, sin embargo, se enfrenta desafíos fitosanitarios, que afectan la producción, cantidad y la calidad del fruto, siendo las enfermedades fungosas una de las razones que causan mayores problemas y son poco estudiadas.

La podredumbre del tallo de palto es causada por diferentes especies de hongos, y se presenta a nivel mundial. Actualmente esta enfermedad afecta a diversas regiones productoras de palto en Perú, causando la pudrición de la fruta y afectando desfavorablemente a la industria (Llanos Melo & Apaza-Tapia, 2021).

Los patógenos fúngicos de la familia Botryosphaeriaceae afectan a numerosos hospedadores de plantas leñosas y tienen una distribución mundial. Se encuentran en la naturaleza como endófitos, y se comportan como patógenos latentes y oportunistas que manifiestan su patogenicidad cuando sus hospedadores se encuentran bajo algún tipo de estrés (García et al., 2017).

Estos hongos causan daños en los paltos como: muerte regresiva, necrosis descendente de las ramas e inflorescencias, cancro en tronco y ramas, y pudriciones en el fruto o pedúnculo del fruto que son cada vez más común en las plantaciones de La Mar (García et al., 2017).

Iyanyi et al. (2021) afirman que las tecnologías moleculares son las herramientas más confiables para caracterizar microorganismos porque se ocupan de la composición genética de los organismos. Se puede obtener información detallada sobre el análisis de sistemas sujetos al cambio climático, alimentos, agricultura, entornos industriales y ciencias ambientales con la ayuda del uso de herramientas moleculares. Se han desarrollado cebadores de oligonucleótidos altamente conservados, como los que se utilizan para amplificar la región del espaciador transcrito interno (ITS) de los hongos, útiles para la identificación molecular de fitopatógenos.

Por los argumentos explicados en el presente trabajo de investigación se ha fijado los siguientes objetivos:

Objetivo general

Identificar mediante características morfológicas y pre-moleculares de genes ITS (ADN ribosomal) para identificar el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.), La Mar- Ayacucho.

Objetivos específicos

1. Identificar mediante características morfológicas el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.) en la provincia La Mar, Ayacucho.
2. Establecer un protocolo estándar para la extracción de ADN de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.).
3. Estandarizar el pre-PCR con marcadores moleculares de genes ITS del ADN ribosomal, que identifican y confirman el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.).
4. Confirmar con prueba de patogenicidad los hongos identificados que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.).

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes

McDonald & Eskalen (2011) desarrollaron un estudio que tuvo como objetivo identificar y caracterizar morfológicamente las especies de la familia Botryosphaeriaceae involucrados en el complejo de la enfermedad del cancro de la rama con el fin de desarrollar futuras estrategias de manejo. De 2008 a 2009, tomaron muestras de canchros en las ramas de cuatro o cinco árboles de cada una de las ocho arboledas de palto en cinco condados de California; las especies de la familia Botriosphaeriaceae fueron identificados en base a la morfología, así como al análisis filogenético de la región espaciadora transcrita interna (ITS) y una secuencia parcial del gen β -tubulina.

En el año 2018, se llevaron a cabo investigaciones en cultivos de palto afectados en Tenerife (España) para identificar las especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae involucradas en esta enfermedad. Durante el estudio, recolectaron 123 muestras en 42 muestreos, de los cuales obtuvieron 153 aislados fúngicos. Seleccionaron 63 de estos aislados en función de sus características morfológicas en placas para su posterior identificación mediante técnicas moleculares; además, realizaron extracciones de ADN y se amplificó la región de ADNr de ITS mediante PCR la especie más comúnmente encontrada fue *Neofusicoccum luteum*, junto con otras especies como *Lasiodiplodia theobromae*; también detectaron aislados de endófitos y otras especies fúngicas como *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp. y *Botrytis cinerea* (García Pérez et al., 2021).

En su investigación, Valencia (2019) manifiesta que tuvo como objetivo caracterizar e identificar los patógenos asociados a enfermedades que presentaron síntomas de canchrosis y muerte regresiva en el cultivo de palto (*Persea americana* Mill.), también pudrición peduncular en palta; para ello, obtuvieron muestras de madera y frutos

de huertos comerciales; sembraron trozos de madera y frutos de la zona de avance del daño, éstas fueron cultivadas en condiciones controladas (20°C durante 7 días) para aislar los hongos presentes. A partir del total de los 42 aislados de madera y 88 de frutos, que fueron tentativamente clasificados como *Diplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Lasiodiplodia* spp. y *Neofusicoccum* spp., se seleccionaron 12 aislados de madera y 17 de frutos para su caracterización morfológica, molecular y estudios sobre su patogenicidad.

Rodríguez-Gálvez et al. (2021) realizaron un estudio que tuvo como objetivo evaluar la diversidad y patogenicidad de las especies asociadas a la muerte regresiva de los árboles de palto, en la costa del Pacífico peruano. Sobre la base de los caracteres morfológicos y culturales, así como del análisis filogenético de la región espaciadora transcrita interna (ITS) y un segmento del gen que codifica para el del factor de elongación de traducción 1- α (*tef1- α*), se determinó que los aislamientos corresponden a tres especies de *Lasiodiplodia* spp., a saber, *L. theobromae*, *L. laeliocattleyae* y *L. pseudotheobromae*. La inoculación en las plantas variedad Hass confirmaron la capacidad patogénica de las especies de *Lasiodiplodia* y revelaron diferencias en la agresividad entre especies y aislamientos.

Twizeyimana et al. (2013) llevaron a cabo un estudio que tuvo como objetivo determinar los patógenos causales de la pudrición del pedúnculo de palto en California, realizaron aislamientos fúngicos de frutos sintomáticos e identificaron los hongos mediante técnicas morfológicas y moleculares. En 2010 y 2011, obtuvieron un total de 177 aislamientos de 290 recolectados de siete huertos de las principales áreas de cultivo de palto en el sur de California. La mayoría de los aislados fueron identificados como *Neofusicoccum luteum* (65 %), el resto como *Colletotrichum gloeosporioides* (33 %) y *Phomopsis* spp. (2%).

Toju et al. (2012) realizaron una investigación exhaustiva de las secuencias ITS en las bases de datos públicas, el cual tuvo como objetivo diseñar nuevos cebadores ITS con una cobertura mejorada en diversos grupos taxonómicos de hongos en comparación con los cebadores existentes. El análisis basado en bases de datos de secuencias públicas indicó que los cebadores recién diseñados coincidían con el 99 % de los taxones ITS de ascomicetos y basidiomicetos (especies, subespecies o variedades). Las condiciones óptimas de PCR para los cebadores se exploraron en una investigación *in vitro*.

1.2. Generalidades del palto (*Persea americana* Mill.)

1.2.1. Origen y distribución

El palto o aguacate (*Persea americana* Mill.) es originario de América Central y el sur de México. La evidencia arqueológica encontrada en Tehuacán, Puebla (México) sugiere que apareció hace unos 12000 años (Iyanyi et al., 2021). Bernal et al. (2020) sostienen que la distribución natural del palto se extiende de México hasta Perú, atravesando por Centro América, Venezuela, Colombia y Ecuador.

En su libro “Los Comentarios Reales” (1605), el inca Garcilaso de la Vega narra que su abuelo, el inca Túpac Yupanqui, introdujo la palta desde la región de la tribu Palta, ubicada en la costa norte del Perú (Tumbes), hacia el valle sagrado de los Incas (Cuzco). Este fruto denomina como “palta” en países como Ecuador, Colombia, Perú, Chile y Argentina, territorios que formaban parte del Tahuantinsuyo (Gardiazabal, 2001). Tenía un rol destacado en la dieta alimenticia de las culturas preincaicas, como lo evidencian los registros históricos.

Galindo et al. (2008) afirman que el palto es parte de la familia Lauraceae, se caracterizan por su que se distingue por su amplia variabilidad morfológica e incluye 92 géneros y entre 2840 y 3340 especies distribuidas en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo.

De acuerdo con Galindo et al. (2008) se han descrito ocho variedades de esta especie, entre las cuales tres son ampliamente reconocidas como razas hortícolas: Mexicana, Guatemalteca y Antillana. La hibridación entre estas variedades ha producido los cultivares actuales del palto.

1.2.2. Taxonomía

La ubicación sistemática del palto, según Integrated Taxonomic Information System (2011) es la siguiente:

Reino: Plantae

Subreino: Viridiplantae

Infrareino: Streptophyta

Supervisión: Embryophyta

División: Traechophyta

Subdivisión: Spermatophytina

Clase: Magnoliopsida

Superorden: Magnoliales

Orden: Laurales

Familia: Lauraceae

Género: *Persea*

Especie: *Persea americana* Mill.

1.2.3. Descripción botánica

El palto (*Persea americana* Mill.) es un árbol frutal de clima subtropical y tropical, llegando en su hábitat natural a una altura de 10 a 12 metros, se caracteriza porque su parte aérea es frondosa y sus hojas pertenecen a las siempre verde, su floración es abundante, según algunas investigaciones indican que presenta más de un millón de flores aunque solo 0,01% llega a fructificar del total de flores, el tronco o tallo es leñoso, el sistema radicular es extenso pero carece de pelos radiculares, su flor es hermafrodita pero no se autopolinizan debido a un fenómeno que le impide que sean viables los dos órganos sexuales, lo que le convierte en una planta alógama, sus tallos son ramificados (Reina, 2017).

Según su modo de floración existen dos tipos de flores con diferentes comportamientos; los tipos A y los tipos B, dependiendo de la altitud, las condiciones de luz y la temperatura. Las flores de los cultivares tipo A actúan como flores femeninas por la mañana y como masculinas la tarde del día siguiente. Por el contrario, las flores de las variedades tipo B actúan como femeninas por la tarde y como masculinas a la mañana siguiente (Bernal et al., 2020).

1.2.4. Fenología del cultivo de palto

En Perú, el ciclo fenológico del palto se distingue por presentar dos marcados periodos de crecimiento vegetativo bien definidos: uno de menor intensidad en invierno, que va de junio a mayo, y otro de mayor intensidad en verano. Estos se alternan con dos fases de crecimiento radicular, que se inician a mediados de septiembre en primavera y finalizan a fines de abril en otoño. Además, el desarrollo floral es prolongado, comenzando a mediados de mayo y extendiéndose hasta finales de agosto, seguido por la floración principal de finales de agosto a octubre. La polinización y la cuaja de frutos

ocurren entre octubre y noviembre, mientras que el crecimiento de los frutos se desarrolla de noviembre a abril, ralentizándose después de ese periodo (Fernández, 2017; Mena, 2004 citado por Sandoval, 2022).

1.3. Variedades del cultivo del palto

1.3.1. *Palto Hass*

Esta variedad, principal cultivar a nivel mundial, tiene predominantemente genes guatemaltecos. Fue el resultado de una mutación espontánea de parentales desconocidos, que fue seleccionada por Rudolph G. Hass, en La Habra Heights (California), debido a la excelente calidad de su pulpa, mayor productividad y una maduración más tardía que la Fuerte, obteniéndose su patente en 1935 (Bernal et al., 2020).

El palto variedad Hass, es un híbrido entre la raza mexicana y guatemalteca, sus frutos oscilan de 200 a 300 gr, de forma oval piriforme, su contenido de aceite fluctúa entre 18 y 22%. Es un alimento saludable que aporta vitaminas (A, B, C, D, E, K), minerales y proteínas, siendo su principal nutriente la grasa de tipo oleico (omega 9), la cáscara es gruesa, coriácea, de textura rugosa, de superficie áspera y granulosa; la cáscara es de color verde que se oscurece al madurar, tornándose morada a negra (Granados, 2018).

1.3.2. *Palto Fuerte*

En la variedad Fuerte los árboles son precoces y de porte bajo, tiene su origen en Atlixco, Puebla, (México), donde fue descubierta por Carl Schmidt en 1911. Su nombre se debe a que sobrevivió a la intensa helada del invierno de 1913 (Newett, 2007). Esta variedad destaca por su tolerancia al frío y fue ampliamente cultivada a nivel mundial hasta la aparición de la variedad Hass; sin embargo, mantiene su relevancia especialmente en zonas con baja humedad ambiental (Bernal et al., 2020).

Es un cultivar híbrido combina las razas mexicana y guatemalteca, que llegó a ser el más popular en la producción mundial. Su fruta es reconocida por su calidad superior, con pulpa sin fibras y un contenido de aceite que varía entre el 18% y el 26%. Los frutos tienen una forma de pera, tamaño mediano y un peso promedio de 300 a 400 gramos. La cáscara es algo áspera, de un verde oscuro y tiene una textura correosa; las semillas son de tamaño mediano (Granados., 2018).

1.4. Porta injertos o patrones

La utilización de portainjertos de diferentes razas es una práctica generalizada en el cultivo del aguacate. Los patrones mexicanos son muy tolerantes al frío, pero sensibles a la salinidad; en contraste, los patrones antillanos son sensibles al frío, pero tolerantes a la salinidad y a la presencia de calcáreo en el suelo. Los portainjertos guatemaltecos son los menos empleados en este contexto. (Franciosi, 1995 citado por Oviedo, 2018).

- a. **Zutano**, variedad híbrida mexicana por guatemalteca, sus frutos tienen una forma ovalada o piriforme y un peso que varía entre 200 y 400 gramos. Aunque la calidad de la fruta es regular a baja, la planta es muy productiva y se utiliza principalmente como polinizador para la variedad Hass (Pillpe, 2022).
- b. **Duke**, raza mexicana, destaca por su alta resistencia al frío y a enfermedades como la *Phytophthora cinnamomi*; sin embargo, es vulnerable a la salinidad. Esta variedad es conocida por la gran uniformidad de sus plantas y su notable vigorosidad (Pillpe, 2022).
- c. **Antillano**, esta variedad demuestra tolerancia a la salinidad, a la clorosis y a la presencia excesiva de caliza en el suelo; pero es susceptible a las bajas temperaturas y propensa a la pudrición de las raíces (Pillpe, 2022).
- d. **Topa Topa** una variedad de raza mexicana, tolera bajas temperaturas y enfermedades como la pudrición de raíces provocada por *Phytophthora cinnamomi*; no obstante, es vulnerable a la salinidad y crece vigorosamente en áreas como valles interandinos, gracias a su capacidad para tolerar suelos saturados. Se recomienda sembrarla en terrenos sueltos o franco arenosos para facilitar el drenaje del agua (Tarazona, 2017).

1.5. Requerimientos edafoclimáticos

- a. **Suelos**. Los suelos ideales para el cultivo de aguacate son de textura media: franco, franco arenoso, franco arcillo arenoso, bien drenados con un pH de 5.5 a 6.8 con buen drenaje y 0.8 a 2 metros de profundidad, conteniendo del 2.5 al 5 % de materia orgánica. Esta contribuye a la nutrición del aguacate y mejora la estructura y porosidad del suelo. Se deben evitar suelos con capas compactadas o rocosas que limiten las raíces y el drenaje. El drenaje insuficiente puede causar asfixia radicular y enfermedades por patógenos (Baiza, 2003)

- b. Altitud.** El palto en Perú se adapta a varias altitudes, desde el nivel del mar hasta los 2800 metros. No obstante, es preferible cultivarlo entre 500 y 2500 msnm para minimizar problemas relacionados con enfermedades, especialmente las que afectan las raíces.
- c. Clima.** Este cultivo se adapta a climas húmedos y semihúmedos, donde se observan marcadas diferencias entre las temporadas de lluvias y las secas (Avilán et al., 1989).
- d. Temperatura.** El cultivar Hass del palto es susceptible a bajas temperaturas, por lo que se requieren temperaturas óptimas de 20°C a 25°C de día y 10°C de noche durante la floración para favorecer una adecuada fecundación y cuajado de frutos (Tadey, 2023).
- e. Humedad absoluta y relativa.** El cultivo del palto requiere una alta humedad relativa cercana a su origen tropical para evitar el estrés hídrico y mantener sus funciones fisiológicas como la transpiración y fotosíntesis en óptimas condiciones (Tadey, 2023).
- f. Radiación Solar.** El exceso de radiación puede causar lo que se denomina “golpe de sol”, en el tallo o frutos. La radiación también influye significativamente en la evapotranspiración del cultivo, en la zona de valles interandinos el requerimiento de agua es de 8000 a 10000 m³/ha, siendo la mayor demanda en otras zonas áridas, con mayores niveles de radiación llegando incluso a 12000 m³/ha (Tadey, 2023).
- g. Precipitación:** Se estima que 1200 mm anuales distribuida de manera adecuada, es suficiente; no obstante, las sequías prolongadas causan la caída de las hojas, lo que merma el rendimiento; por otro lado, el exceso de precipitación durante la floración y la fructificación, disminuye la producción y provoca la caída del fruto (Avilán et al., 1989).

1.6. Enfermedades a nivel de tallo del palto

1.6.1. La familia Botryosphaeriaceae

La familia Botryosphaeriaceae fue introducida por Theissen y Sydow en 1918 (Mondragón et al., 2021).

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Botryosphaerales

Familia: Botryosphaeriaceae

Género: *Botryosphaeria* spp.

El género *Botryosphaeria* spp. comprende especies de distribución cosmopolita, principalmente en regiones con climas templados y tropicales (Jacobs y Rehner, 1998; Pavlic et al., 2004). Los síntomas característicos de enfermedades asociadas con *Botryosphaeria* spp. son cancro y muerte regresiva de ramas y tallos principales, seguidos de exudación y, en casos severos, muerte del árbol afectado. Estos hongos se destacan por su capacidad para ser endófitos comunes y patógenos oportunistas en diversas especies de plantas leñosas (Pavlic et al., 2004).

La historia de *Botryosphaeria* es compleja y el género ha sido sometido a numerosos reordenamientos taxonómicos en la posición sistemática tanto de la familia como de los géneros incluidos; en 1863 por Cesati y De Notaris, realizaron la primera descripción de *B. dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. como la especie tipo del género (Denman et al., 2000).

Schoch et al. (2006) describieron un nuevo orden llamado Botryosphaerales, que forma parte de los Dothideomycetes utilizando técnicas moleculares y sin vínculo con otros órdenes ya establecidos en esta categoría.

La familia Botryosphaeriaceae está compuesta aproximadamente por 23 géneros y 187 especies (Díaz & Latorre., 2020). Esta familia se caracteriza por ser muy diversa y cosmopolita, abarcando una gran cantidad de especies de hongos ascomycota morfológicamente diversos (Slippers et al., 2017); sin embargo, en los últimos años se ha reportado su presencia en diversos lugares del mundo, ya que debido a su gran capacidad de infectar múltiples hospedantes y migrar entre ellos, facilita la propagación de especies y genotipos de Botryosphaeriaceae en nuevas áreas (Mehl et al., 2017).

La familia Botryosphaeriaceae incluye numerosas especies de hongos ascomicetos que son morfológicamente muy parecidas; está conformada por un gran número miembros que son patógenos importantes en una gran variedad de cultivos de frutales perennes de importancia económica como: manzana, almendro, cítricos, palto,

olivo, vid, pistacho y nogal así como de arbustos ornamentales y árboles forestales (Lawrence et al., 2017).

La familia Botryosphaeriaceae alberga diversos géneros de hongos considerados patógenos endófitos de alta agresividad, que con frecuencia matan a una gran parte de su hospedante después del daño físico, generalmente cuando se encuentra bajo estrés, su acción patogénica se manifiesta a través de varios síntomas como manchas foliares, pudriciones de frutas, muerte descendente, gomosis, canchros perennes y por último la muerte en especies económicamente importantes de cultivos perennes leñosas (Valle-De la Paz et al., 2019).

En el cultivo de palto las especies de la familia Botryosphaeriaceae ocasiona síntomas como canchros y la muerte regresiva, estas se caracterizan por evidenciar una corteza necrótica y al corte la madera de color marrón rojizo. La infección debajo de la corteza permite que el hongo colonice el xilema y el floema, provocando la descomposición de los tejidos vasculares y el tizón de las ramas. Cuando los hongos entran al xilema del huésped provoca la invaginación de células parenquimatosas para formar tilos y la secreción de resinas; estas formaciones tilóticas en el sistema vascular provocan la obstrucción de los vasos de la xilema con la pérdida de conducción de agua y marchitamiento, derivando en la muerte del árbol (Mayfield et al., 2019).

Para que un patógeno infecte a una planta, debe ser capaz de ingresar en ella, extraer sus nutrientes y superar sus mecanismos defensivos. Este proceso se realiza mayormente mediante la liberación de compuestos químicos que interfieren con ciertos aspectos del metabolismo de la planta hospedera. En algunos casos, la penetración e infección también involucra el uso de fuerza mecánica para romper la pared celular de la planta, como resultado, las afectaciones en las plantas son casi siempre consecuencia de reacciones bioquímicas entre las sustancias que el patógeno secreta y aquellas que la planta contiene o genera. Los agentes patógenos que afectan a las plantas secretan diversas sustancias que intervienen en el desarrollo de enfermedades. Estos se clasifican principalmente en cuatro categorías: enzimas, toxinas, reguladores del crecimiento y polisacáridos. Su impacto en la patogenicidad puede ser directo o indirecto, y su relevancia varía según la enfermedad específica (Agrios, 2005).

La pudrición del tallo es ocasionada por patógenos que están presentes en ramas vivas y muertas, ramitas, hojas y pedicelos vivos o, a veces, en el suelo. El inóculo germina en condiciones de alta humedad y puede difundirse por salpicaduras de lluvia, viento o sacudidas de ramas cuando se recolectan los frutos. Algunas infecciones se originan por colonización endofítica que permanece latente hasta después de la cosecha (Twizeyimana et al., 2013).

Las enfermedades causadas por Botryosphaeriaceae en su mayoría siguen a la aparición de estrés debido a factores distintos a la propia infección por Botryosphaeriaceae (Blodgett y Stanosz, 1995, Schoeneweiss, 1981, Swart y Wingfield, 1991); sin embargo, estos síntomas de enfermedad pueden desarrollarse rápidamente y causar grandes pérdidas en grandes áreas, si el agente de estrés está muy extendido. Los modelos de cambio climático predicen condiciones climáticas extremas, como lluvias impredecibles, calor o frío extremos, etc. (Coakley et al., 1999). Estos factores, junto con la presión biológica adicional de patógenos y plagas que expanden sus áreas geográficas, son elementos que favorecerían el desarrollo de enfermedades relacionadas con Botryosphaeriaceae (Desprez-Loustau et al., 2006). Por lo tanto, es fundamental comprender mejor el papel ecológico, la patogenicidad, la diversidad, la interacción huésped-patógeno-ambiente y el movimiento mediado por humanos para definir y abordar la amenaza que podrían representar en tales condiciones (Slippers & Wingfield., 2007).

El género *Lasiodiplodia* spp. se encuentra dentro de esta familia y está asociada a numerosas enfermedades como la muerte regresiva, canchros y pudrición de fruto (Rodríguez-Gálvez et al., 2021). Actualmente, más de 2000 nombres están vinculados a la familia *Botryosphaeriaceae*, incluidos estados teleomorfos y anamorfos de los cuales *Diplodia*, *Botryosphaeria*, *Fusicoccum*, *Dothiorella*, *Lasiodiplodia* y *Sphaeropsis* contienen la mayor cantidad de especies (Slippers & Wingfield., 2007).

Los patógenos de la podredumbre del tallo están presentes en ramas vivas o muertas, ramitas, hojas y pedicelos vivos o a veces en el suelo (Hartill & Everett., 2002). La pudrición del tallo comienza en el extremo del mismo, los síntomas se manifiestan a través de la aparición de una podredumbre marrón oscuro a negro con márgenes definidos. En una fase avanzada de la enfermedad, es posible observar crecimiento

micelial en la superficie de las lesiones, especialmente bajo condiciones de humedad. La podredumbre del tallo puede ser causada por diversos hongos, incluyendo especies de *Botryosphaeria* spp. y *Colletotrichum* spp. entre otros (Dann et al., 2013).

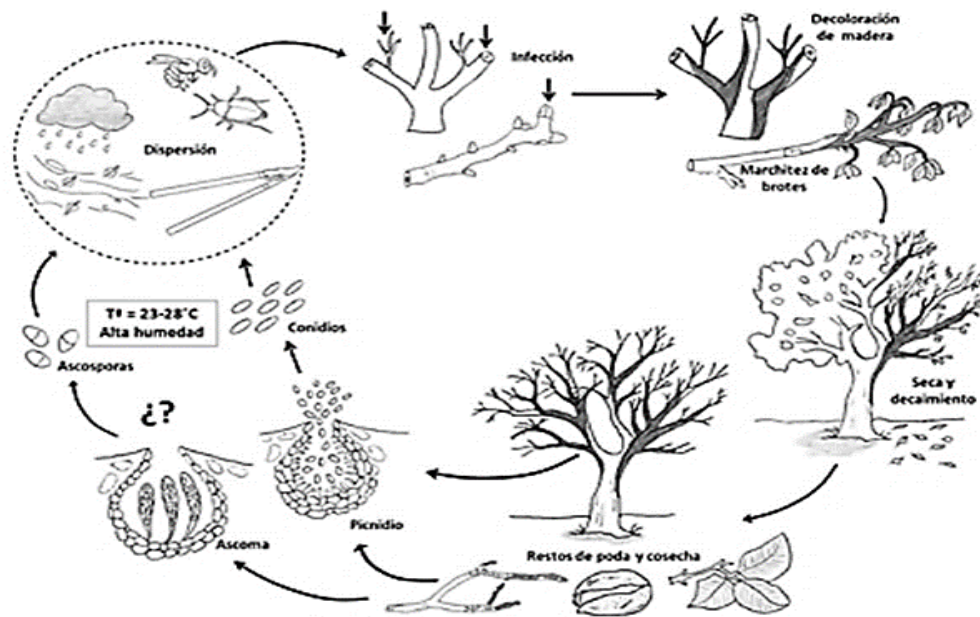
Varios hongos causan la pudrición del tallo del palto, incluyen especies de Botryosphaeriaceae como *Botryosphaeria lutea* A.J.L. Phillips (anamorfo *Neofusicoccum luteum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips), *Botryosphaeria dothidea* (Moug. Ex Fr.) Ces. & De Not. (anamorfo *Fusicoccum aesculi* Corda), *B. parva* Pennycook & Samuels (anamorfo *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips), *B. ribis* Grossenb. & Duggar (anamorfo *Neofusicoccum ribis* (Slippers, Crous & M.J. Wingf.) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips), y *B. rhodina* (Berk. & M.A. Curtis) Arx (anamorfo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.). Otras especies reportadas incluyen *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & H. Schrenk (anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc.), *Glomerella acutata* Guerber y J.C. Correll (anamorfo *C. acutatum* J.H. Simmonds), *Nectria pseudotrichia* (Schwein.) Berk. & M.A. Curtis, y especies de *Albonectria*, *Alternaria*, *Gibberella*, *Pestalotiopsis*, *Phomopsis* y *Rhizopus* (12,13,17,20-22,26). *Colletotrichum* spp. también puede causar antracnosis de la fruta (Twizeyimana et al., 2013, p.1580).

1.6.2. Epidemiología y patogénesis

La patogénesis de estos géneros de hongos que causan canchros en plantas leñosas comienza con infecciones ocasionadas por conidios o ascosporas. Sinclair et al. (1987) sostienen que los conidios son las estructuras infectivas más comunes responsables de la infección, y se diseminan principalmente por la lluvia. Estas infecciones, sin importar el tipo de espora que las origina, suelen ocurrir a través de heridas, aunque también pueden iniciarse en las lenticelas. Además, Ramón et al. (2011) reafirman que la infección se produce a través de aberturas naturales, a través de heridas de poda (Chamberlain et al., 1964; Hewitt, 1988; Lehoczy, 1988; Leavitt, 1990), o mediante las uniones de injertos y portainjertos. A partir de aquí, las lesiones en los tallos surgen en pocos días o semanas, aunque pueden mantenerse como infecciones latentes durante extensos períodos (Sinclair et al., 1987).

Figura 1.1

Ciclo de desarrollo patogénico de Botryosphaeria spp.



Fuente: Adaptado de Agrios (2005)

El impacto de las lesiones causadas por la colonización de los tejidos del huésped y su importancia varía según el estado vegetativo y la interacción huésped- patógeno. Una vez que los tejidos son colonizados, comienza la generación de conidios dentro de los picnidios. Estos conidios, dispersados por factores ambientales como las lluvias, vientos o agentes biológicos como los insectos, desencadenando el surgimiento de ciclos secundarios de la enfermedad. Por otra parte, en los tejidos necróticos muertos, además de los conidios, se desarrollan las estructuras reproductivas sexuales, que, al alcanzar la madurez, generan las ascosporas infecciosas, originando así nuevos focos de infección primaria (Manion, 1991).

La infección por este género de hongos, al igual que muchos hongos que generan canchros, depende del estado del huésped. Se ven favorecidos por condiciones de estrés provocadas por factores ambientales, nutricionales o hídricos. Por eso, estos hongos atacan principalmente a plantas que ya están debilitadas o sufren estrés. Aunque capaces de penetrar por heridas, lesiones o aberturas naturales, estos hongos no desencadenan enfermedad en plantas con buen estado vegetativo, comportándose como endófitos. En su mayoría, estas especies fúngicas actúan como saprófitos, alimentándose de tejidos

deteriorados o en proceso de descomposición (Schoeneweiss, 1975; Wene y Schoeneweiss, 1980, citado por Romero, 2012).

1.6.3. *Lasiodiplodia* spp.

Según Catalogue of Life (2022) la ubicación sistemática de *Lasiodiplodia* spp., es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Botryosphaerales

Familia: Botryosphaeriaceae

Género: *Lasiodiplodia* spp.

Lasiodiplodia spp. es un hongo que pertenece a la familia Botryosphaeriaceae que pueden provocar el declive y ser la causa de muerte regresiva en palto, mango, vid, arándano y otros cultivos. Este se encuentra en la naturaleza como endófito comportándose como patógeno latente y oportunista, manifestando su patogenicidad cuando sus hospedadores se encuentran bajo alguna forma de estrés (Denman et al., 2000).

De acuerdo con Delgado et al. (2019) *Lasiodiplodia* spp. puede infectar al palto de tres maneras: cortical (visible externamente), vascular (visible internamente) y (difícil de detectar tanto externa como internamente); La última es la fase más difícil de identificar y, en consecuencia, representa el de mayor riesgo ya que el hongo puede migrar, por vías subcortical y luego vascular, llegando al fruto.

El agente patógeno puede permanecer latente en los frutos infectados mientras estos aún están en el árbol, activándose solo cuando alcanzan su estado de maduración. Durante la postcosecha, la infección puede ocurrir al poner los frutos en el suelo tras la cosecha o por medio del contacto físico entre frutos sanos y enfermos (Ventura et al., 2004).

a. Sintomatología

El síntoma más evidente es la formación de canchales asociados de exudados blanquecinos y grumosos de diversos tamaños que aparecen tanto en el tronco como en

ramas de árboles jóvenes y adultos afectados, incluyen necrosis en el follaje y ramillas (produciendo un síntoma típico muerte regresiva), gomosis, tizón de la hoja y podredumbre en el fruto o pedúnculo del fruto (Alama et al., 2006).

Capriles et al. (1979) describen cómo la infestación fúngica afecta severamente diversas estructuras arbóreas. En la corteza del tronco, ramas y sistema radicular, se forman lesiones oscurecidas, reseca, agrietadas, cóncavas y endurecidas. Internamente, la necrosis tisular es más extensa, presentando una coloración pardo-rojiza y aspecto fibroso. Las ramas jóvenes sufren deformaciones y grietas, ocasionalmente exudando un líquido amarillento, con una rápida expansión de la necrosis. La enfermedad se manifiesta visiblemente en las hojas, que se marchitan, se tornan amarillas y mueren aceleradamente.

b. Morfología

Picos-Muñoz et al. (2015) indican que el género *Lasiodiplodia* se caracteriza principalmente por la presencia de picnidios, paráfisis y estriaciones longitudinales en los conidios maduros, diferenciándose de otros géneros afines."

Según lo expuesto por Picos-Muñoz et al. (2015), apoyándose en estudios previos, las colonias de *Lasiodiplodia* spp. en medio de cultivo se caracterizan por un crecimiento acelerado, son ligeramente densas, aéreas y de un color inicial blanquecino, al séptimo día aproximadamente éstas, se vuelven más oscuras tornándose de un color gris olivo para finalmente tomar un color negro. De Souza, (2021) añade que presentan conidióforos son estructuras hialinas, simples, aunque en ocasiones pueden ser con septos y tienen forma cilíndrica.

Las colonias del género *Lasiodiplodia* presentaron un denso micelio que inicialmente era de color blanco, gradualmente adquiriendo tonalidades que iban tornando de gris olivo a gris oscuro. En las colonias también se observaron la aparición de masas estromáticas grises, las cuales que al ser examinadas bajo microscopio revelaron que albergaban diversas picnidias, de paredes marrón oscuro a negro. Las células conidiógenas se caracterizan por ser hialinas, con paredes delgadas y lisas. Entre ellas también se encontraron otras células conidiógenas con paráfisis de morfología cilíndrica y tonalidad hialina. Las conidias se forman de manera acrógena, adoptando formas que varían de subovoide a elipsoidal, con un ápice redondeado y una base algo trunca, al inicio

son hialinas y sin septas; luego adquieren un color marrón oscuro, presentando una septa en el centro. Al madurar, muestran estrías longitudinales en la superficie. Las conidias midieron entre 12 -16 x 23 - 31µm (Vicuña, 2023).

El género *Lasiodiplodia* se caracteriza por presentar un micelio inmerso o superficial, ramificado y septado; ascomata eustromática, marrón oscuro a negro. Conidióforos a menudo reducidos a células conidiógenas, si están presentes hialinas, simples, a veces septadas, raramente ramificadas y cilíndricas. Los conidios inicialmente son hialinos sin septa pero más tarde se vuelven medianamente uniseptados, marrón oscuro con estrías longitudinales, de paredes gruesas, oblongos a elipsoides, rectos, ampliamente redondeados en el ápice, base truncada que miden en promedio 20-32×12.5-18.5 µm, las estrías en los conidios permiten diferenciar a *Lasiodiplodia* spp. de *Diplodia* spp. (Phillips et al., 2013).

Valle-De la Paz et al. (2019) describen que las conidias de este género son hialinas en estado inmaduro, elipsoidales, unicelulares, de pared gruesa y con un contenido granular; sin embargo, en estado maduro son septadas con estrías longitudinales de color marrón oscuro debido a la presencia de melanina en la superficie interior de la pared.

Ko et al. (2004) sostienen que el hongo produce colonias de color negro grisáceo y picnidios negros ostiolados (125 a 650 µm de diámetro) con conidios ovoides a alargados (20 -32 × 12 -16 µm).

Li et al. (2013) mencionan que los conidios son elípticos e hialinos cuando son inmaduros, se vuelven de color marrón oscuro y un tabique, estriados longitudinalmente cuando están maduros y oscilaban entre 20 -28 × 10-16 µm (promedio de 23.3 × 13.7 µm).

Las parafisas son hifas estériles que se desarrollan entre las ascas del ascocarpo. Estas parafisas se caracterizan por ser hialinas, de morfología cilíndrica y presentar tabiques internos. Por su parte, los conidióforos son hialinos y de estructura simple. Adicionalmente, las células conidiógenas se describen como hialinas, sencillas y con morfologías que van de cilíndrica a subovopiriforme (Whiley et al., 2002).

1.6.4. *Dotiorella* spp.

Según Catalogue of Life (2022), la ubicación sistemática del *Dotiorella* spp. es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Botryosphaeriales

Familia: Botryosphaeriaceae

Género: *Dothiorella* spp.

Wenjing et al. (2014) argumentan que las especies de *Dothiorella* tienen una distribución cosmopolita, como endófitos en plantas vivas, saprofitos en partes de plantas muertas o fitopatógenos en varios huéspedes.

Las especies de *Dothiorella* como miembros de la familia Botryosphaeriaceae, son saprófitos, patógenos y endófitos conocidos en asociación con diversas plantas leñosas (Abdollahzadeh et al., 2014).

a. Sintomatología

Los síntomas típicos incluyen canchros en ramas, acompañados de exudación de la savia que se solidifica y adquiere apariencia salina, debido a su color blanco y consistencia sólida. Al extraer la corteza afectada, se observa que los tejidos internos, también afectados, adquieren una coloración gris oscura con un avance muy definido. En caso de los frutos, los síntomas consisten en una pudrición color gris que deteriora completamente los frutos antes de la cosecha, provocando una pérdida significativa (Pinto et al., 1986).

b. Morfología

Las colonias de *Dotiorella* spp. desarrollan un micelio denso con una coloración inicialmente olivácea en el centro de la colonia y blanca en los bordes, volviéndose olivácea a los 7 días, tornándose verde oscuro en la superficie a los 28 días, posteriormente el micelio adquiere una tonalidad gris oliváceo pálido a negro oliváceo en la superficie y negro oliváceo en el reverso, umbonadas, con zonación irregular y lobuladas (Phillips et al., 2013).

Barnett & Hunter (1972) afirman que *Dothiorella* spp. presenta picnidios oscuros, globosos, agrupados en un estroma bien desarrollado, el estroma es subcortical. Los conidióforos son simples y cortos. Los conidios son hialinos, de una sola célula y varían en forma desde ovoides hasta elipsoides. *Dothiorella* spp. puede actuar como un parásito o como saprófito en la madera.

Wenjing et al. (2014) afirman que las especies de *Dothiorella* tienen conidiomas que varían de picnidios multiloculares y eustromáticos, presentan conidióforos ramificados hialinos que producen conidios marrones, elipsoidales, con una septa.

Lawrence et al. (2017) describen que los conidios son inicialmente hialinos, de paredes delgadas, aseptadas, de forma oblongas a elípticas pero que se vuelven de paredes gruesas, de color marrón a marrón dorado con un septo, muchos con ligera constricción cerca del tabique central, ápice redondeado y truncado o redondeado en la base, las conidias miden entre $19.4-24.3 \times 8.7-11.6 \mu\text{m}$.

Según Váczy et al. (2018), los picnidios se manifestaron en un plazo de 10 a 14 días en la superficie de las acículas de pino, y contenían conidios parduzcos, elipsoides-ovoides, con una septa de $20-26 \times 8-10 \mu\text{m}$.

1.6.5. *Pestalotiopsis* spp.

Según Catalogue of Life (2022), la ubicación sistemática del *Pestalotiopsis* spp. es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Amphisphaeriales

Familia: Pestalotiopsidaceae

Género: *Pestalotiopsis* spp.

En investigaciones realizadas alrededor del mundo, se han reportado diferentes especies de *Pestalotiopsis*, fundamentalmente como agente patógeno que afecta a las plantas en climas tropicales y subtropicales. Además, se encuentran comúnmente como

endófitos y algunos saprófitos en el suelo y hojas; algunas especies están implicadas con el proceso de descomposición de madera, lana y papel (Pulido, 2015).

El género *Pestalotiopsis* se encuentra comúnmente en su fase asexual o anamorfa. De las 235 especies descritas hasta el momento, solo 20 son conocidas en su etapa sexual o teleomorfa, la cual recibe el nombre de *Pestalosphaeria* (Maharachchikumbura et al., 2011).

En 1949, Steyaert dividió el género *Pestalotia* spp. en tres géneros. *Pestalotia* está representada por especies con conidios de 6 células, *Truncatella* distinguido por especies con conidios de 4 células y *Pestalotiopsis*, especies con conidios de 5 células; esta clasificación es la más utilizada en la actualidad (Maharachchikumbura et al., 2014).

El género *Pestalotiopsis* spp. se caracteriza por presentar conidios con tres células medias pigmentadas, mientras las células de los extremos son hialinas. El conidio posee ornamentaciones apicales y basales. Todos estos caracteres se utilizan para distinguir las especies, pero el patrón de pigmentación de las células medias tiene el mayor peso taxonómico (Maharachchikumbura et al., 2014).

El hongo produce acérvulos en los que se forman conidios, éstos se dispersan fácilmente mediante el viento, la lluvia, daños mecánicos por insectos o aberturas naturales de las plantas. La formación de acérvulos es favorecida por las precipitaciones durante periodos de alta humedad relativa y/o periodos de sequía. El patógeno tiene una fase saprofita, que puede ayudarlo a sobrevivir en tejidos muertos por largos periodos (Limón, 2017).

a. Sintomatología

Las plantas enfermas se caracterizan por la presencia de lesiones necróticas de color rojizo a marrón oscuro en las ramas, en la parte basal de los tallos principales y en la corona de las plantas. Se observaron lesiones necróticas extensas debajo de la corteza y daños vasculares de color marrón oscuro. En las ramitas afectadas se produjo necrosis apical y muerte. Los síntomas en el tallo son frecuentemente asociados a heridas de poda, extendiéndose varios centímetros por debajo de las heridas. Además, se observaron abundantes acérvulos negros en el tejido muerto (Espinoza et al., 2008).

b. Morfología

Las colonias presentaron un crecimiento arrosado y micelio aéreo escaso, mostrando una coloración entre tonos blanco y crema; en el interior y en la superficie del medio de cultivo se formaron acérvulos de color negro brillante. Se observaron conidios típicos del género *Pestalotiopsis* similares a lo reportado por Maharachchikumbura et al. (2014), que son oscuros, ligeramente curvados, con seis células en la parte basal y la terminal hialina, ésta última puntiaguda con tres a cinco apéndices apicales hialinos. Además, se observaron conidióforos hialinos, irregularmente ramificados, septados, lisos y cortos (Morales-Mora et al., 2020).

Diversos estudios han sido realizados para caracterizar morfológicamente los aislados de *Pestalotiopsis* spp. Las variables macroscópicas consideradas principalmente, son el color de la colonia, tipo de micelio, presencia de acérvulos y tasa de crecimiento radial. Para la caracterización microscópica se determinan: el número de células, la coloración de las células medias del conidio, concoloro (las tres células del mismo color) o versicoloro (las tres células con diferente coloración), el largo, ancho, número y longitud de ornamentaciones apicales y basales (Jeewon et al., 2004 y Maharachchikumbura et al., 2011).

Valencia et al. (2011) afirman que las colonias de hongos que se formaron en medio PDA son blancas y algodonosas, tornándose ligeramente amarillas tras 15 días. Los acérvulos negros aparecieron después de 15 días a 20°C. Conidias (n= 40) eran fusiformes, con dimensiones de $22.2\text{-}30.4 \times 6.3\text{-}9.8 \mu\text{m}$ y una relación largo/ancho de 3.4 ± 0.4 . Todos los aislamientos tenían conidios de cinco células. Las células apicales y basales son incoloras, mientras que las tres células medias son de color marrón oscuro. Los conidios tenían un apéndice basal ($9.3 \pm 3.3 \mu\text{m}$) y de dos a cuatro apéndices apicales largos ($34.5 \pm 6.9 \mu\text{m}$).

Los conidios siempre son lisos con media $\pm$ desviación estándar de 22.7 ± 2.3 a $27.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ de largo y 7.4 ± 0.3 a $9.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de ancho. Se observaron de dos a cuatro (generalmente tres) apéndices apicales y un apéndice basal (Espinoza et al., 2008).

Lin et al. (2018) manifiestan que las colonias de hongos en PDA son blancas y algodonosas, tornándose ligeramente amarillas después de 9 días a 28°C. Los conidios

son fusoides, elipsoides, rectos a ligeramente curvos, cuatro tabiques, de $5.4 - 9.6 \times 18.2 - 25.6 \mu\text{m}$ ($n= 100$), con una relación largo/ancho de 2.94 ± 0.42 . Las células apicales y basales son hialinas, mientras que las tres células medianas son de color marrón oscuro. Todos los conidios tenían un apéndice basal y de dos a cuatro apéndices apicales tubulares largos (en su mayoría tres).

1.6.6. *Colletotrichum* spp.

Según Catalogue of Life (2022), la ubicación sistemática del *Colletotrichum* spp. es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Glomerellales

Familia: Glomerellaceae

Género: *Colletotrichum* spp.

Colletotrichum es un género de hongos cosmopolita compuesto por más de 189 especies distribuidas en regiones tropicales y templadas de todo el mundo. Las especies de *Colletotrichum* causan enfermedades devastadoras como la antracnosis y la pudrición de la fruta en una amplia gama de plantas hospedantes, incluyendo cultivos frutales importantes como el palto, plátano, la fresa, los cítricos, la papaya, el mango y la manzana (Khodadadi et al., 2020).

Ma et al. (2018) afirman que el género *Colletotrichum* ha sido catalogada como uno de los diez principales géneros patógenos fúngicos en la patología molecular de las plantas según su importancia científica y económica. Las especies de *Colletotrichum* se encuentran comúnmente en muchas plantas hospedantes como patógenos endófitos y ocasionalmente saprófitos.

a. Sintomatología

La sintomatología se muestra en las hojas, pecíolos y/o tallos; inicialmente las hojas afectadas presentan puntos rojizos, las lesiones crecen en forma irregular y se unen entre si causando la necrosis total de la hoja; en cuanto a las condiciones predisponentes, tenemos que la enfermedad se ve favorecida por lluvias fuertes e intensas durante la época

invernal con alta humedad relativa, que provocan severas epidemias en muy corto tiempo, amenazando casi todo el desarrollo de la planta (Pérez et al., 2003). Otro síntoma de la enfermedad es el ennegrecimiento y muerte apical de los tallos ocasionando la muerte descendente de la planta en algunos casos ocurre necrosis lo que contribuye a la defoliación de la planta y la caída prematura del fruto (Tous, 2008).

b. Morfología

Khodadadi et al. (2020) describen las características morfológicas que incluyen el color de la colonia, la forma de las conidias, las mediciones de la tasa de crecimiento de las colonias, la longitud y el ancho de las conidias para varios aislados de cada especie de *Colletotrichum*.

Pérez et al. (2003) refieren que los aislamientos purificados fueron caracterizados morfológicamente mediante descripciones macro y microscópicas del patógeno, incluyendo color y forma de la colonia, aspecto y color del micelio; así como la forma, tamaño, segmentación y esporulación de la conidia, y medición de la tasa de crecimiento.

Barnett & Hunter (1972) mencionan que *Colletotrichum* spp. presenta estructuras en forma de disco llamadas arcérvulos, que son cubiertas de una sustancia cerosa, subepidérmicas, a menudo tienen espinas oscuras en el borde o entre los conidióforos alargados. Los conidios son hialinos, unicelulares y tienen forma ovalada u oblonga. Además, *Colletotrichum* spp. tiene estados imperfectos de *Glomerella* y se distingue de *Gloeosporium* por la presencia de setas que pueden estar ausentes bajo ciertas condiciones culturales.

Trinidad-Ángel et al. (2017) afirman que para la cepa de *Colletotrichum gloeosporioides* el micelio se caracterizó por un crecimiento rápido, el tipo de micelio fue abundante y superficial, el color de las colonias oscilo de blanco-crema con centro color naranja, las masas conidiales fueron abundante, salmón y negras con una distribución aleatoria.

En las distintas especies de *Colletotrichum*, se observaron diversos tipos de texturas en las colonias: harinosa, lanosa, algodonosa y afelpada, con posibles variaciones de textura del centro al margen de la colonia, los aislamientos formaron conidios hialinos,

cilíndricos y rectos, en su mayoría presentaron ambos extremos redondeados, aunque un porcentaje considerable presentó al menos un extremo ahusado (Valdés et al., 2017).

Las preparaciones microscópicas revelaron cuerpos irregulares (acérvulos) con setas escasas rectas y septadas, en los cuales se apreciaban cirros cremosos de color naranja. En estos cirros se observaron conidios hialinos, unicelulares, cilíndricos de extremos redondeados (Sandoval et al., 2008).

Silva-Rojas & Ávila-Quezada (2011) manifiestan que los conidios son hialinos, lisos, rectos, ápice obtuso, base truncada, que miden 13.5-23.8 μ m de largo y 4.3-6.8 μ m de ancho (promedio $18.7 \times 5.5 \mu$ m).

Qiao et al. (2021) sostienen que los conidios son acrogénicos, oblongos, a veces ligeramente contraídos en el medio, microgutulados, hialinos, unicelulares, de paredes lisas, que miden 12.2–17.1 μ m $\times$ 4.2 - 6.4 μ m (promedio = 14.4 μ m $\times$ 5.1 μ m, n= 30).

1.6.7. *Fusarium* spp.

Según Catalogue of Life (2022), La ubicación sistemática del *Fusarium* spp. es la siguiente:

Reino: Fungi

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Nectriceae

Género: *Fusarium* spp.

Los marchitamientos causados por *Fusarium* spp. son más frecuentes y destructivos en las regiones de clima templado cálido, así como en los trópicos y subtrópicos. En climas más fríos, estos marchitamientos tienden a ser menos dañinos o poco comunes (Agrios, 2005).

Las enfermedades vasculares provocadas por este género disminuyen la capacidad de traslocación de agua y nutrientes en la planta en más del 95%, lo que resulta en marchitez inicial y finalmente, en la muerte de las plantas. En cultivos de relevancia

económica, estas enfermedades causan pérdidas millonarias para la economía agrícola mundial (Olalde-Lira et al., 2020).

Las especies de *Fusarium* en los trópicos son bastante diversas en términos de número de especies, distribución, rango de huéspedes y virulencia. *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* son los patógenos más comunes en los trópicos (Leslie & Summerell., 2006).

a. Sintomatología

Las pudriciones de la raíz y del tallo causadas por *Fusarium* spp. aumenta significativamente cuando las plantas expuestas al patógeno experimentan estrés fisiológico debido a factores como bajas temperaturas, sequías intermitentes, exceso de agua en el suelo (Agrios, 2005).

Los síntomas causados por *Fusarium* spp. en palto incluyen amarillamiento de hojas, crecimiento interrumpido de brotes vegetativos, hojas pequeñas y abscisión prematura de hojas. Si la pudrición es severa, los árboles pueden morir semanas después de la aparición de los primeros síntomas foliares o apenas sobreviven durante largos periodos (Olalde-Lira et al., 2020).

b. Morfología

La identificación de las especies de *Fusarium* se ha basado tradicionalmente en características morfológicas, como la forma y el tamaño de macroconidios y microconidios, la presencia o ausencia y la forma de las clamidosporas. También se consideran la apariencia, forma y pigmentación de las colonias, así como las velocidades de crecimiento en distintos medios de cultivo (Leslie & Summerell., 2006).

Los macroconidios son las esporas típicas de *Fusarium*, estas presentan una estructura multicelular que se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos; estas esporas son frecuentes en la superficie de las plantas afectadas y destruidas por el patógeno, los macroconidios son producidos por una estructura especializada llamada esporodoquio, una masa de monofiálides cortas que sostienen a los macroconidios.(Olalde-Lira et al., 2020).

En medios de cultivo, las colonias de *Fusarium* spp. presenta un patrón de crecimiento radial, extenso, algodonoso, incoloro en un principio conforme madura adquiere un color blanco, crema, amarilla, rosa hasta púrpura o una gama de estos, su micelio es aéreo y septado (Leslie & Summerell., 2006). Los macroconidios son relativamente anchos, recto a ligeramente curvado, de 3 a 7 septas, con extremos redondeados se encuentra abundantemente en color crema y menos frecuentemente en azul.

Barnett & Hunter (1972) afirman que presentan micelio extenso y algodonoso en cultivo, a menudo con algún matiz rosado, morado o amarillo, conidióforos variables, delgados simples, o robustos, ramificados irregularmente y con un verticilo de fiálides, solos o agrupados en esporodoquios. Conidios variables, principalmente de dos tipos, a menudo se encuentran en cabezas pequeñas y húmedas; macronidios multicelulares ligeramente curvada o doblada en el extremo puntiagudo, típicamente en forma de canoa; microconidios (1 célula), ovoides u oblongos, nacidos solos o en cadenas; algunas conidias intermedias de 2 a 3 células, oblongas o ligeramente curvadas o dobladas.

Sarkhosh et al. (2018) describe que las colonias de *Fusarium* aisladas en medio de cultivo PDA a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 7 días eran de color blanco a púrpura claro con abundantes micelios algodonoso. Los macroconidios presentaron de tres a cinco tabiques miden entre $24.5\text{-}35.3 \times 4.1\text{-}5.4 \mu\text{m}$, y las microconidias de cero a una septada eran de $9.1\text{-}13.9 \times 2.6\text{-}5.2 \mu\text{m}$.

Leyva-Mir et al. (2017) describen que las cepas de *Fusarium* spp. cultivadas en medio de cultivo PDA desarrollaron colonias de color blanco amarillento. Los macroconidios se caracterizaron por ser largos, delgados, uniformes con dimensiones entre $22 - 48 \times 2.5 - 4.2 \mu\text{m}$, estos presentaban paredes delgadas y de 5 - 6 septos, con una superficie ventral recta y un lado dorsal levemente arqueado. La célula apical se observó que es alargada y curva, afinándose bruscamente hacia la punta, mientras que la célula basal adoptaba una forma similar a un pie. No se evidenció la presencia de microconidios en los medios de cultivo empleados.

Hernández et al. (2019) mencionan las colonias de *F. oxysporum* y *F. solani* pueden presentar una sorprendente diversidad de pigmentos, que incluye tonos blanquecinos, amarillentos, violáceos, rojos en sus variantes carmín y vino, e incluso

azulados. Esta pigmentación, que se origina en el micelio y se propaga por el medio de cultivo, pueden mostrar variaciones a lo largo del desarrollo fúngico.

Estas características coinciden con las reportadas previamente para *F. oxysporum* y *F. solani*, las macroconidias, escasas en todos los aislados, fueron alargadas, ligeramente curvadas y septadas. En los aislados, los macroconidios tenían cinco septos, con la célula apical redondeada y la célula basal en forma de "pie", midiendo 8.98 a 9.42 μm de ancho y de 51.12 a 56.32 μm de largo. Para el resto de los aislados, los macroconidios presentaron tres septos, la célula apical fue curva y la célula basal en forma de "pie", midiendo de 6.17 a 13.63 μm de ancho y de 35.65 a 49.83 μm de largo. Los macroconidios son considerados el carácter más importante para la identificación de especies de *Fusarium* (Olalde-Lira et al., 2020).

Leslie & Summerell (2006) mencionan que los macroconidios son relativamente anchos, rectas a ligeramente curvadas, de 3 a 7 septas con extremos redondeados. *F. solani* está bien documentada como patógeno de una serie de leguminosas y otras plantas tropicales donde a menudo se asocia con canchros y problemas de muerte regresiva de árboles (1550). Algunas plantas económicamente importantes con enfermedades significativas causadas por *F. solani* incluyen el palto.

1.7. Métodos morfológicos para la identificación de hongos

Rios et al. (2008) sostiene que para identificar morfológicamente hongos fitopatógenos es necesario observar sus estructuras somáticas y reproductivas. Para lograr esto, se pueden utilizar técnicas como cámara húmeda y/o aislamiento, que permiten inducir la formación de dichas estructuras. Posteriormente, para su observación con microscopio compuesto, es necesario preparar y realizar el montaje de los hongos en portaobjetos.

1.7.1. Aislamiento

El aislamiento de hongos puede realizarse utilizando material infectado o a través de la siembra de signos. Para identificar el género y la especie del hongo fitopatógeno, es fundamental examinar las características de las estructuras generadas y emplear claves taxonómicas. Los medios de cultivo que se utilizan se dividen en generales, como PDA y AA, y específicos (UNAH, 2014).

1.8. Métodos moleculares para la identificación de hongos

En la actualidad, las técnicas moleculares para la identificación de microorganismos están adquiriendo gran relevancia, debido a su notable especificidad (que permite detectar solo el microorganismo o molécula relevante), sensibilidad (que facilita la detección de un único microorganismo), rapidez (que permite la identificación en menos de 24 horas) y automatización, lo que ayuda a bajar los costos. Estas técnicas han permitido identificar nuevos microorganismos que no eran detectables mediante métodos tradicionales de cultivo e identificación (Jan & LeBorgne, 2001).

1.8.1. Extracción del ADN

Este proceso implica el aislamiento y purificación de moléculas de ADN, garantizando su integridad y pureza, y se fundamenta en las características fisicoquímicas de la molécula. Los grupos fosfato de los nucleótidos, al ser polarmente cargados y negativos, confieren al ADN su carga negativa, lo cual se utiliza para su extracción. A través del tiempo, se han desarrollado diversos protocolos, y en la actualidad se pueden observar métodos que emplean kits de extracción, así como procedimientos tradicionales que constan de cinco etapas: homogenización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN (Alejos et al., 2015).

Un factor clave para obtener ADN de alta calidad a partir del micelio de hongos fitopatógenos es garantizar un crecimiento óptimo del micelio en un medio de cultivo. Este tejido se usa comúnmente porque presenta un crecimiento más uniforme en comparación con otros tejidos del hongo (SCRIBD, 2018).

1.8.2. Estructura de ácido desoxirribonucleico (ADN)

La estructura del ADN está formada por una doble cadena helicoidal, que esta enlazada por puentes de hidrógeno: dobles entre adenina y timina, y triples entre guanina y citosina. Por otro lado, los nucleótidos están conectados mediante enlaces fosfodiéster que vinculan el grupo fosfato (H_3PO_4) con el azúcar. Debido a que el grupo fosfato es de naturaleza hidrofílica y tiene carga negativa, esto hace que el ADN presente carga negativa (Alejos et al., 2015).

1.9. Métodos de evaluación de la calidad de ADN

1.9.1. Electroforesis

La electroforesis es una técnica que permite separar biomoléculas basándose en su movilidad y naturaleza (generalmente ácidos nucleicos o proteínas) en un campo eléctrico sobre una matriz porosa, cuya composición varía según el tipo de biomolécula a analizar. Por otro lado, para la separación de ácidos nucleicos se utilizan matrices de agarosa y para la separación de proteínas se utilizan matrices de poliacrilamida (Montalvo & Lugo, 2019).

La electroforesis de ADN puede realizarse en geles de agarosa o de poliacrilamida. La electroforesis en geles de agarosa es el método estándar para separar y purificar fragmentos de ADN cuando no requerimos un alto poder de resolución. En un campo eléctrico, el ADN, que tiene una carga negativa, se mueve hacia el cátodo. Esto ocurre porque los materiales cargados negativamente son atraídos por el cátodo, que es el electrodo positivo (Cornejo et al., 2014).

1.9.2. Espectrofotometría

La capacidad del ADN de absorber luz UV a 260 nm facilita la estimación de su concentración en ng/μL. Además, los valores de absorbancia a 260 nm y 280 nm se emplean para evaluar la pureza y calidad del ADN (Alejos et al., 2015).

1.10. Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares, según la definición de Abriata et al. (2011), es un fragmento de ADN con una posición específica en un cromosoma, cuya herencia puede monitorearse en los individuos de una población. Estas secuencias pueden corresponder a regiones codificantes como a aquellas sin función conocida (p. 75).

Según Ramírez & Roca (2000) un marcador molecular es un segmento específico de ADN correspondiente a regiones codificantes o no codificantes del genoma y cuya secuencia puede o no ser conocido. Los marcadores moleculares permiten realizar la caracterización y evaluación directa de los genomas de los individuos (p.74).

1.10.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Establecido por Kary Mullis en 1985. Es una técnica *in vitro* de la biología molecular que permite obtener millones de copias de un fragmento de ácido desoxirribonucleico (ADN) a partir de una sola molécula (Mas et al., 2001). La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática que es capaz de amplificar millones de veces una secuencia de ADN específica durante varios ciclos repetitivos en los que la secuencia blanca es copiada fielmente (Tamay de Dios et al. 2013). Para lo cual, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), enzima, los cebadores o primers, los desoxirribonucleótidos trifosfatados que se abrevian dNTPs (A, T, C, G), el ión magnesio, una solución buffer y agua libre de nucleasas (Tamay de Dios et al., 2013).

La PCR es una herramienta fundamental en la investigación fúngica, como indica Cenís (1992); una de las ventajas fundamentales es la capacidad para amplificar cantidades mínimas de ADN, incluso con la presencia de varios contaminantes. Muchos de los protocolos de extracción de ADN fúngico se han diseñado para valorar el uso de esporas o micelio como fuente de ADN en experimentos de PCR, lo cual es beneficioso para la detección. Sin embargo, al trabajar con cientos de cepas en estudios poblacionales, la colección del material de cultivo puede volverse una tarea complicada que incrementa el riesgo de contaminación.

A partir de este fundamento, la reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla mediante la repetición de un ciclo compuesto por tres fases:

- a. Desnaturalización.** En esta fase, la doble hélice de ADN se divide en dos hebras monocatenarias a una temperatura de 94-96°C, y este proceso tiene una duración de entre 20 y 30 segundos; el tiempo varía según la secuencia del templado; es decir, si la cantidad de G-C es alta, se tarda más tiempo para romper sus uniones debido a que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces, uno más que las bases de A-T. Finalmente las cadenas separadas que servirán como molde para el siguiente paso (Tamay de Dios et al., 2013).
- b. Hibridación.** Durante esta fase, los primers se adhieren a una secuencia específica complementaria delimitándola. Para que se forme el complejo templado-primers, se necesita una temperatura de 50-65 °C. Esta secuencia es

de interés y será amplificada (Cornejo et al., 2014 & Tamay de Dios et al., 2013)

- c. **Extensión.** En esta fase la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primers y comienza su función catalítica a una velocidad variable incorporando dNTP's complementarios para crear las cadenas completas de ADN. A una temperatura óptima de 72°C, la enzima funciona mejor y se sintetiza una nueva cadena en dirección 5' a 3'. (Tamay de Dios et al., 2013).

1.10.2. Primers

Conocidos también como iniciadores, cebadores; es una secuencia corta de ADN de cadena simple que se emplea en una reacción en cadena de polimerasa (PCR). En el método PCR se utiliza un par de primers para hibridar con el ADN de la muestra y definir la región del ADN que será amplificada (Vázquez et al., 2020). Los primers son secuencias de oligonucleótidos que flanquean y delimitan la secuencia blanco que se desea amplificar y son complementarios a ésta (Tamay de Dios et al., 2013)

Tamay de Dios et al. (2013) mencionan que al diseñar primers es necesario seguir ciertas pautas, como mantener la proporción de guanina y citosina entre 40 y 60%, y que la longitud sea de 15 a 30 pares de bases. También se sugiere que los extremos de los primers terminen en pares de bases G-C. Asimismo, es fundamental evitar la complementariedad entre los primers para prevenir la formación de estructuras en forma de bucle.

1.10.3. Región ITS (espaciador transcrito interno)

La región espaciadora transcrita interna (ITS) del ADN ribosómico (ITS1, gen ARNr 5.8S e ITS2) constituye uno de los marcadores moleculares más utilizados. La región transcrita interna es una secuencia de ADN situada entre los genes que codifican el ARN ribosómico (ARNr) en eucariotas. Esta región se encuentra específicamente entre los genes del 18S rRNA, 5.8S rRNA y 28S rRNA. Los genes del ARN ribosómico (ADNr) de los eucariotas están organizados en grupos de unidades repetidas en tándem, cada una de las cuales consta de regiones codificantes y espaciadores transcritos y no transcritos. La unidad comienza en el extremo 5' con el espaciador transcrito externo (ETS), seguido aguas abajo por el gen del ARNr 18S, el espaciador transcrito interno 1

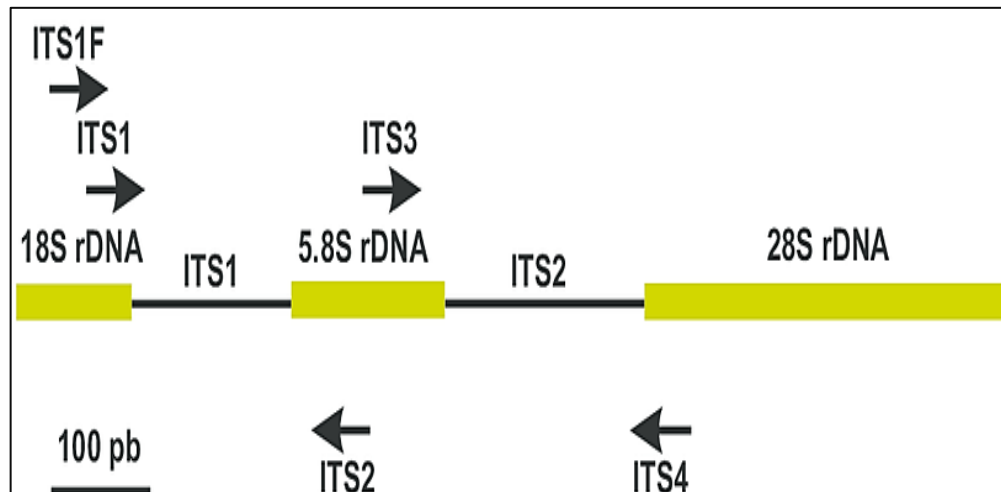
(ITS1), el gen del ARNr 5.8S, el espaciador transcrito interno 2 (ITS2), el gen del ARNr 28S y termina con el espaciador intergénico (IGS) (Freire et al., 2010).

Según White et al. (1990), el espaciador transcrito interno (ITS) es el fragmento de ADN localizado entre los genes de ARN ribosómico (ARNr) de la subunidad pequeña y la subunidad grande en el transcripto de ARNc policistrónico. Dentro de las regiones del cistron ribosómico, el ITS ofrece la mayor posibilidad de identificación efectiva para un amplio rango de hongos, con una clara distinción en los códigos de barras entre la variación inter e intraespecífica.

Vicuña (2023) señala que los genes que codifican el ARN ribosomal y los espaciadores se generan en repeticiones en tándem, que constan de miles de copias de longitud, cada una separada por regiones de ADN no transcrito denominadas espaciadores intergénicos (IGS) o espaciadores no transcritos (NTS).

Figura 1.2

Esquema parcial del gen ADN ribosomal y sus espaciadores internos ITS1 e ITS2



Fuente: Fontecha et al. (2012)

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La investigación se llevó a cabo en dos ambientes, en el laboratorio de Fitopatología donde se realizó trabajos de aislamiento, identificación morfológica de muestras y prueba de patogenicidad de hongos que causan daños en tallos de palto. Los trabajos de evaluación de protocolo pre-molecular, extracción de ADN y prueba de PCR se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal, ambos laboratorios pertenecientes a la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, Escuela Profesional de Agronomía, situándose en las coordenadas 13°08'53" Latitud sur y 74°13'12" Longitud oeste, a 2792 msnm de altitud, en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga y región de Ayacucho.

2.1.1. Lugares de muestreo

Las muestras proceden de campos de palto comerciales situados en la provincia de La Mar, los distritos y la cantidad de muestras colectadas de cada zona se detallan en la tabla.

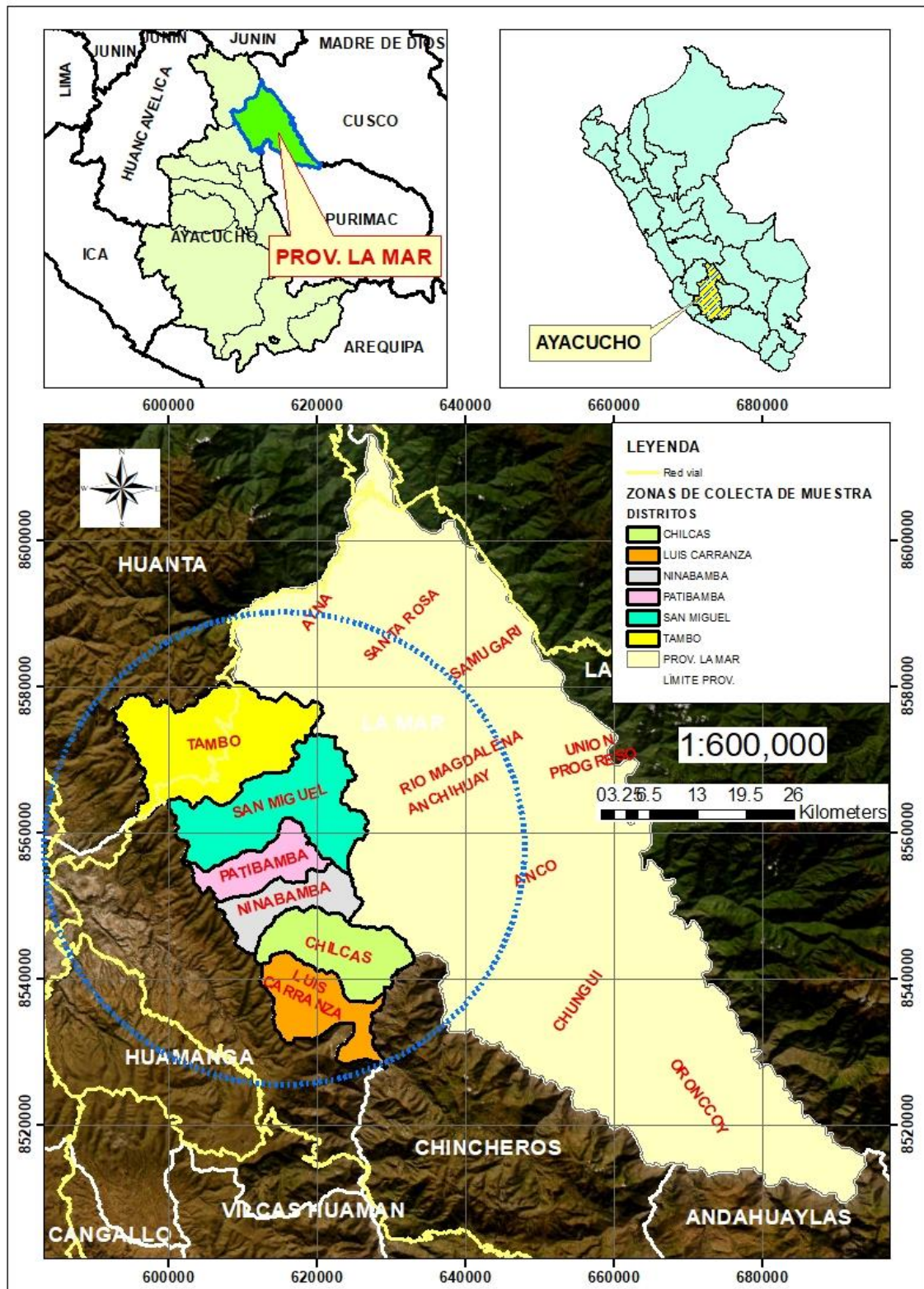
Tabla 2.1

Muestras de tallo obtenidas de las zonas de producción de palto de la provincia de La Mar

Departamento	Provincia	Distrito	Nº Muestras
Ayacucho	La Mar	Tambo	6
Ayacucho	La Mar	San Miguel	6
Ayacucho	La Mar	Patibamba	10
Ayacucho	La Mar	Ninabamba	12
Ayacucho	La Mar	Chilcas	6
Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	10
Total			50

Figura 2.1

Mapa de ubicación de los distritos donde se colectaron las muestras: Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, Chilcas y Luis Carranza.



Nota. (*) Elaborado en ArcGIS 10.5, a partir de las cartas nacionales en shapefile de GEOGPSERÚ.

Los **problemas específicos** del presente trabajo de investigación son:

1. ¿Cuáles son las características morfológicas a nivel de géneros de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho?
2. ¿Cuál es el protocolo estandarizado para extracción de ADN de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.)?
3. ¿Cuál es el pre-PCR estandarizado con marcadores moleculares de genes ITS del ADN ribosomal, que identifican y confirman géneros de hongos que causan daños en tallo de palto (*Persea americana* Mill.)?
4. ¿Cuáles son los hongos que causan daños a los tallos de palto (*Persea americana* Mill.) confirmados con prueba de patogenicidad?

2.2. Colección de muestras

Las muestras se colectaron de las diferentes zonas de producción de Tambo, San Miguel, Ninabamba, Patibamba, Chilcas y Luis Carranza. Se inspeccionaron varios árboles de las plantaciones de palto Hass para detectar síntomas. En cada plantación los árboles fueron revisados y evaluados para identificar la presencia de tizones en el tallo, muerte regresiva, necrosis y canchros en los tallos laterales, marchitez, amarillamiento, corteza hundida y oscura (Anexo 1). Se tomaron muestras de tallos y de ramas primarias, secundarias y terciarias de estos árboles, varios segmentos que miden entre 5 y 10 cm de largo de cada planta sintomática, independientemente de la edad de la planta. Las muestras se colocaron primero en bolsas de papel kraf y polietileno rotuladas con sus datos de pasaporte; todas las muestras fueron colocadas en cajas de tecnopor conteniendo gel pack refrigerante, lo que permitió mantener una temperatura baja constante en el transcurso del traslado al laboratorio.

La recolección de muestras, aislamiento del patógeno, estandarización de protocolo para la extracción de ADN, caracterización, identificación morfológica y pre-molecular se realizó durante todo el año 2023 y los meses de enero a junio del 2024.

Figura 2.2

Recolección de muestras en las zonas de producción de palto de la provincia de La Mar



Figura 2.3

Registro de datos pasaporte de las muestras obtenidas de palto en las zonas de producción de la provincia de La Mar.



Tabla 2.2

Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (Persea americana Mill.) del distrito Tambo, provincia La Mar, región Ayacucho.

N° Muestra	Datos de colección de muestras					Nombre del Productor	Aislamientos
	Distrito	Comunidad	Altitud	latitud	Longitud		
1	Tambo	Santa Rosa	2869msnm	12°58'18.59"S	73°59'26.33"O	Edgar Huicho Medina	T1 T2 T3 T4
2	Tambo	Santa Rosa	2879 msnm	12°58'22.61"S	73°59'29.22"O	Felipe Figueroa Taype	T5 T6 T7
3	Tambo	Santa Rosa	2830 msnm	12°58'20.49"S	73°59'20.56"O	Cesar Tineo Bendezú	T8 T9 T10
4	Tambo	Santa Rosa	2805msnm	12°58'20.89"S	73°59'7.48"O	Teofilo Mucha Urbano	T11 T12 T13
5	Tambo	Santa Rosa	2796 msnm	12°58'25.49"S	73°59'11.87"O	Jony Huicho Tineo	T14 T15 T16
6	Tambo	Santa Rosa	2778 msnm	12°58'21.69"S	73°59'6.62"O	Herminio Saume Tineo	T17 T18

Nota. (*) T1-T18 representa los aislados obtenidos de las muestras colectadas del distrito de Tambo.

Tabla 2.3

Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (Persea americana Mill.), del distrito San Miguel, provincia La Mar, región Ayacucho.

N° Muestra	Datos de colección de muestras					Nombre del Productor	Aislamiento
	Distrito	Comunidad	Altitud	latitud	Longitud		
1	San Miguel	Huayanay	2629 msnm	13° 0'50.38"S	73°58'39.15"O	Paulino Arce Vila	M1 M2 M3 M4
2	San Miguel	Capillapampa	2516 msnm	13° 2'22.17"S	73°57'59.10"O	Maximo Illaura	M5 M6 M7
3	San Miguel	Huayanay	2623 msnm	13° 0'54.09"S	73°58'34.50"O	Luis Mauricio Gutiérrez	M8 M9 M10
4	San Miguel	Capillapampa	2503 msnm	13° 2'22.79"S	73°57'52.10"O	Rolando Santiago García	M11 M12 M13
5	San Miguel	Cullpampa	2497 msnm	13° 2'25.84"S	73°57'48.38"O	Melissa García Gómez	M14 M15
6	San Miguel	Huayanay	2504 msnm	13° 2'9.67"S	73°58'4.70"O	Erick Gálvez Santiago	M16 M17

Nota. (*) M1-M17 representa los aislados obtenidos de las muestras colectadas del distrito de San Miguel.

Tabla 2.4

Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (Persea americana Mill.), del distrito Patibamba, provincia La Mar, región Ayacucho.

N° Muestra	Datos de colección de muestras					Nombre del Productor	Aislamiento
	Distrito	Comunidad	Altitud	Latitud	Longitud		
1	Patibamba	Miskibamba	2423 msnm	13° 3'40.12"S	73°56'30.26"O	Nivar Añaños Gutiérrez	P1 P2 P3
2	Patibamba	Incarracay	2425 msnm	13° 3'38.29"S	73°56'54.91"O	Betsy López Aguilar	P4
3	Patibamba	Miskibamba	2382 msnm	13° 4'11.72"S	73°55'39.93"O	Teófilo Santa Cruz	P5 P6
4	Patibamba	Miskibamba	2392 msnm	13° 4'2.99"S	73°55'56.24"O	Mario Santa Cruz	P7
5	Patibamba	Incarracay	2471 msnm	13° 3'32.31"S	73°57'2.53"O	Julio Olivera Contreras	P8
6	Patibamba	Patibamba	2443 msnm	13° 3'51.14"S	73°56'19.15"O	Efraín Ponce Guillén	P9
7	Patibamba	Miskibamba	2331 msnm	13° 4'25.39"S	73°55'19.98"O	Paulina Vásquez Campos	P10
8	Patibamba	Patibamba	2434 msnm	13° 3'54.48"S	73°56'7.68"O	Janeth Huaman Mejia	P11
9	Patibamba	Incarracay	2502 msnm	13° 3'23.64"S	73°57'9.72"O	Marcelina Cordova Anyosa	P12
10	Patibamba	Miskibamba	2350 msnm	13° 4'20.12"S	73°55'33.51"O	Julio Valencia Saume	P13 P14

Nota. (*) P1-P14 representa los aislados obtenidos de las muestras colectadas del distrito de Patibamba.

Tabla 2.5

Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (Persea americana Mill.), del distrito Ninabamba, provincia La Mar, región Ayacucho.

N° Muestra	Datos de colección de muestras					Nombre del Productor	Aislamiento
	Distrito	Comunidad	Altitud	Latitud	Longitud		
1	Ninabamba	Accobamba	2271 msnm	13° 5'56.06"S	73°54'42.99"O	Nancy Flores Pozo	N1 N2 N3
2	Ninabamba	Accobamba	2257 msnm	13° 5'45.48"S	73°54'31.44"O	Hugo Flores Pozo	N4 N5
3	Ninabamba	Accobamba	2296 msnm	13° 5'46.89"S	73°54'47.25"O	Enrique Flores Pozo	N6 N7
4	Ninabamba	Accobamba	2283 msnm	13° 5'42.05"S	73°54'48.28"O	Wilma Flores Pozo	N8 N9
5	Ninabamba	Accobamba	2285 msnm	13° 6'36.85"S	73°54'30.43"O	Yolanda Florez Pozo	N10 N11 N12
6	Ninabamba	Accobamba	2323 msnm	13° 5'18.02"S	73°54'53.12"O	Mare liz Flores Pozo	N13 N14
7	Ninabamba	Accobamba	2331 msnm	13° 5'51.91"S	73°54'44.05"O	Antonio Florez Pozo	N15 N16 N17
8	Ninabamba	Tranca	2307 msnm	13° 6'31.02"S	13° 6'31.02"S	Flora Castro	N18 N19
9	Ninabamba	Tranca	2349 msnm	13° 5'25.85"S	73°55'3.55"O	Nerio Palomino	N20 N21
10	Ninabamba	Condoray	2272 msnm	13° 6'34.75"S	73°54'24.41"O	Wilder tikuña Castro	N22 N23
11	Ninabamba	Magnupampa	2260 msnm	13° 6'20.47"S	73°54'25.59"O	Betsy Delgado	N24 N25
12	Ninabamba	Magnupampa	2362 msnm	13° 6'59.13"S	73°54'29.71"O	Vaneza Laurente López	N26 N27

Nota. (*) N1-N27 representa los aislados obtenidos de las muestras colectadas del distrito de Ninabamba.

Tabla 2.6

Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (Persea americana Mill.), del distrito Chilcas, provincia La Mar, región Ayacucho.

N° Muestra	Datos de colección de muestras					Nombre del Productor	Aislamiento
	Distrito	Comunidad	Altitud	Latitud	Longitud		
1	Chilcas	Chilcas	2894 msnm	13° 9'34.28"S	73°54'8.39"O	Teodor Aramburú Contreras	C1 C2 C3 C4
2	Chilcas	Ccoyama	2797 msnm	13° 8'50.85"S	73°54'49.50"O	Edwin Ramirez Sosa	C5 C6 C7
3	Chilcas	Chilcas	2874 msnm	13° 9'28.21"S	73°54'6.80"O	Elmer Loayza Palomino	C8 C9 C10
4	Chilcas	Retama	2695 msnm	13° 8'27.71"S	73°54'47.08"O	Dionisio Espino Guillén	C11 C12 C13
5	Chilcas	Ccoyama	2811 msnm	13° 8'58.41"S	73°54'49.50"O	Eliseo Ochoa Ayala	C14 C15 C16
6	Chilcas	Retama	2704 msnm	13° 8'30.65"S	73°54'50.05"O	Claudio Delgado	C17 C18

Nota. (*) C1-C18 representa los aislados obtenidos de las muestras colectadas del distrito de Chilcas.

Tabla 2.7

Datos de pasaporte de las muestras obtenidas de tallos de palto (Persea americana Mill.), del distrito Luis Carranza, provincia La Mar, región Ayacucho.

N° Muestra	Datos de colección de muestras							Aislamiento
	Departamento	Provincia	Distrito	Comunidad	Altitud	Latitud	Longitud	
1	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Ñeccepampa Cucho	2188 msnm	13°15'9.53"S	73°52'10.02"O	Sócrates Yaranga Candia L1 L2 L3 L4
2	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Occuypuquio	2258 msnm	13°14'45.80"S	73°52'16.69"O	Emilio Quispe Prado L5 L6 L7
3	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Ccollay	2227 msnm	13°14'48.88"S	73°52'6.52"O	Valentín Chuchón Bellido L8 L9 L10
4	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Ccollay	2247msnm	13°14'50.81"S	73°52'11.11"O	Jorge Prado Chuchón L11 L12 L13
5	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Occuypuquio	2225 msnm	13°14'54.56"S	73°52'5.13"O	Isacc Gómez Gutiérrez L14 L15 L16
6	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Alfapampa	2249 msnm	13°15'15.36"S	73°52'21.28"O	Cesar Candia Gutiérrez L17 L18 L19
7	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Occuypuquio	2296 msnm	13°14'41.31"S	73°52'23.97"O	Erineo Candia Méndez L20 L21 L22
8	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Alfapampa	2215 msnm	13°15'19.31"S	73°52'17.01"O	Nazario Quispe Limaco L23 L24 L25
9	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Ñeccepampa Cucho	2179 msnm	13°15'6.66"S	73°52'5.81"O	Urbano Candia Badajoz L26 L27
10	Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	Ccollay	2316 msnm	13°14'40.10"S	73°52'25.89"O	Serapio Anyosa Méndez L28

Nota. (*) L1-L28 representa los aislados obtenidos de las muestras colectadas del distrito de Luis Carranza.

2.3. Aislamiento del patógeno

Los segmentos de tallos, ramas primarias, secundarias y terciarias recolectadas pasaron por una serie de lavados (Anexo 3). La desinfección se realizó teniendo en cuenta lo recomendado por Rodríguez-Gálvez et al. (2021) & Vicuña (2023), las muestras se cortaron en porciones con un área de 5 mm aproximadamente de la zona de avance del síntoma (interfase entre tejido vegetal sano y enfermo), en el borde del tejido de la madera necrosada utilizando una tijera de podar y un bisturí estéril; luego se realizó una desinfección superficial para eliminar microorganismos y contaminantes externos sumergiendo las muestras cortadas en porciones pequeñas en alcohol de 70° por 2 minutos; enseguida se lavó dos veces con agua destilada estéril. Las porciones desinfectadas se colocaron en papel toalla y se dejaron secar dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente los trozos de madera se sembraron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) modificado con 0.5 gr/L de tetraciclina con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias. En cada placa se colocó cinco porciones del tejido (en forma de cruz). Las placas se incubaron a 27 °C por un período de 3 a 10 días, en condiciones de oscuridad para favorecer el crecimiento de los hongos. Una vez que se obtuvieron los crecimientos de las colonias, se llevaron a cabo repiques sucesivos en placas petri con medio PDA. Estos repiques consistieron en transferir fragmentos de los márgenes del micelio hasta obtener colonias puras (cultivo axénico).

2.4. Preparación de medio de cultivo específico para estimular la esporulación

Para estimular el desarrollo de estructuras reproductivas asexuales, se tomó en cuenta lo sugerido por Vicuña (2023).

Los aislamientos puros de *Lasiodiplodia* spp. y *Dotiorella* spp. se sembraron separadamente en placas con medio PDA modificados con 0.5 gr/L de tetraciclina y chips de pino esterilizados. Tras incubar las placas a 27 °C durante cuatro días, estas se expusieron bajo luz fluorescente blanca a temperatura ambiente por cuatro semanas para inducir la formación de estructuras reproductivas asexuales. Luego de verificar la producción de picnidios (estructuras de reproducción asexual), se extrajeron los cuerpos fructíferos y se realizaron montajes en el microscopio; después para la caracterización se realizó midiendo el ancho y largo de 100 conidios provenientes de un mismo picnidio.

2.5. Conservación de aislamientos

La conservación de los cultivos axénicos, se realizó en tubos esterilizados con medio PDA (tubo inclinado), estos se sellaron y se colocaron en racks, siendo almacenados en la refrigeradora a una temperatura de 4°C.

2.6. Caracterización e identificación morfológica de aislamientos

La caracterización morfológica de los aislamientos puros se realizó con el propósito de identificar el género de los patógenos. Este proceso involucró varios pasos y observaciones detalladas; para ello, se evaluó el desarrollo de hongos en medio de cultivo PDA. Se analizaron las características macroscópicas como el color del micelio, morfología de las colonias a 27°C tras un periodo de incubación que varió según el tipo de hongo; la presencia o ausencia de septos, la longitud y el ancho de 100 conidios, las mediciones se realizaron utilizando un microscopio compuesto (Accu-Scope), también se caracterizó la forma y color de los conidios (Anexo 3). El ratio de crecimiento de los micelios se determinó teniendo en cuenta la siguiente formula: el promedio de crecimiento es igual a incremento total (cm) entre tiempo total, expresando el resultado en centímetros por día (cm/día). La medición continuó hasta que el micelio del hongo cubrió por completo el medio de cultivo en la placa de petri. Por último, se identificó el género taxonómico a partir de las características microscópicas de las estructuras vegetativas y reproductivas asexuales, basándose en publicaciones científicas y las guías de Barnett & Hunter (1972).

a. *Lasiodiplodia* spp.

Los parámetros de caracterización, tanto macroscópica como microscópica, fueron determinados de acuerdo con las descripciones de los resultados de los estudios realizados por Picos-Muñoz et al. (2015), Vicuña (2023), Valle-De la Paz et al. (2019), Ko et al. (2004), Li et al. (2013).

b. *Dotiorella* spp.

La caracterización macroscópica y microscópica se realizó siguiendo las descripciones de los resultados de las claves taxonómicas de Barnett & Hunter (1972) siguiendo las descripciones de los resultados de los estudios de Lawrence et al. (2017), Wenjing et al. (2014), Váczy et al. (2018).

c. *Pestalotiosis* spp.

Los resultados obtenidos en la caracterización macroscópica y microscópica concuerdan con los hallazgos de diversos estudios realizados por autores como Maharachchikumbura et al. (2014) Jeewon et al. (2003), Espinoza et al. (2008), Lin et al. (2010) y la recomendación de Valencia et al. (2011).

d. *Colletotrichum* spp.

La obtención de los parámetros de caracterización, tanto a nivel macroscópico como microscópico, se realizó conforme a las descripciones de los resultados de los estudios de Trinidad-Ángel et al. (2014), Váldez et al. (2003), Espinoza et al. (2008), Sandoval et al. (2008), Qiao et al. (2021), Silva-Rojas & Ávila-Quezada (2011).

e. *Fusarium* spp.

Los parámetros de caracterización macroscópica y microscópica se establecieron siguiendo las descripciones proporcionadas en los estudios de Leyva-Mir et al. (2017), Hernández et al. (2019), Olalde-Lira et al. (2008), Sandoval et al. (2020), Sarkhosh (2018) y las recomendaciones de Leslie & Summerell. (2006).

2.7. Metodología para la identificación pre-molecular

Métodos de extracción de ADN

Las muestras se obtuvieron a partir de las colonias del patógeno (estructuras fúngicas) desarrolladas en placas a partir de la esporulación en el medio de cultivo (PDA) y se incubaron a 27°C durante 11 días.

2.7.1. Protocolo CTAB

Doyle & Doyle (1990), modificado en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

1. Se añadió pequeños grumos de micelio en tubos Eppendorf de capacidad 1.5 ml utilizando un bisturí para el raspado, se molió con palillo esterilizado para romper el micelio.
2. Se adicionó 700 µl de buffer 2X CTAB y 2 µl de beta-mercaptoetanol, agitando la mezcla con un Vortéx. Las muestras se incubaron en un baño maría a 65 °C durante 45 minutos, agitando de manera suave los tubos cada 15 minutos. Después, se dejó la muestra a temperatura ambiente por 2 minutos.

3. Se incorporó 700 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) en cada tubo, agitando de forma breve y lenta con el Vortéx para no dañar el ADN del micelio.
4. Se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga. Luego, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf y se etiquetó. Es importante tener cuidado para no arrastrar material de la interfase. El residuo de cloroformo: alcohol isoamílico debe ser desechado en un recipiente correctamente etiquetado.
5. Se añadió 50 µl de CTAB al 10% disuelto en 0.7 M NaCl; agitar suavemente con el Vortéx, para asegurar una mezcla completa.
6. Realizar nuevamente los pasos 3 y 4
7. Se incorporó un volumen equivalente de isopropanol frío (400 – 500 µl) en cada tubo. Luego, se invirtieron los tubos varias veces y se dejó -20 °C durante 15 minutos.
8. Se realizó una centrifugación por 20 minutos a 14,000 rpm, 4 °C. Se eliminó el sobrenadante con cuidado para no perder el pellet de ADN. Luego, se invirtió el tubo y se dejó secar al aire por 1 a 2 minutos.
9. El pellet de ADN se lavó con 1 ml de etanol al 70% durante 3 minutos y luego se centrifugó a 14,000 rpm por 30 minutos a 4 °C. Se desechó el etanol con precaución y se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 90%, centrifugando nuevamente a 14,000 rpm durante 30 minutos.
10. Se disolvió el DNA en 150 µl de T10E1 por muestra, se adicionó 1 – 2 µl de ARNasa 10 mg/ml (libre de ADNasa). La incubación se realizó a 37 °C por una hora.
11. Se almacenó a 4 °C (ó a -20 °C, para almacenamiento prolongado).

2.7.2. Protocolo Möller

Möller et al. (1992), modificado en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

1. Se añadió pequeños grumos de micelio a un tubo Eppendorf de 1.5 ml utilizando un bisturí para el raspado del micelio; se molió con perlititas.
2. Se añadió 500 µl de TES (Tris 100 mM, pH 8.0, EDTA 10 mM, SDS al 2 %); se agregó 5 µl de proteinasa K de una solución madre adecuada; incubar

durante 30 minutos (mínimo) hasta 1 hora entre 55 a 60 °C con mezclado suave ocasional.

3. Modificar la concentración de sal a 1.4 M mediante la adición de 140 µl de NaCl 5 M, añadir 65 µl de CTAB al 10% (1/10 del volumen) e incubar a 65 °C por 10 minutos.
4. Incorporar 1 volumen de SEVAG (equivalente a 700 µl), mezclar con cuidado, incubar durante 30 minutos a 0 °C y luego centrifugar durante 10 minutos a 40 °C, rpm_{máx}.
5. Se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 ml, se agregó 225 µl 5M NH₄Ac, mezclar suavemente; colocar en hielo durante aproximadamente 30 minutos (cuanto más el mejor); se centrifugó a 4°C (20 minutos), rpm_{máx}.
6. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, se agregó 0.55 vol de isopropanol (aproximadamente 510 µl) para la precipitación del ADN. Se centrifugó al instante durante 5 minutos rpm_{Max}. Si no aparecen los pellets de ADN, es necesario poner las muestras en hielo antes de la centrifugación por un periodo de 15 a 30 minutos.
7. Se Aspiró el sobrenadante y lavar el pellet dos veces con etanol frío al 70%, centrifugar por 5 minutos a 4°C (12600 rpm), secar el pellet y disolverlo en aproximadamente 50 µl TE.

2.7.3. Protocolo Lee y Taylor

Lee & Taylor (1990) modificado en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

1. Se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml de fondo cónico una porción de micelio (20 a 60 mg) o micelio fresco (0.1 a 0.3 g húmedo) y molerlo con Nitrógeno líquido.
2. Se adicionó 400 ul buffer de lisis y agitar con vortéx para mezclar homogéneamente. Si la mezcla es demasiado viscosa, adicionar buffer de lisis (hasta 700 ul).
3. Se incubó a 65 °C por una hora.
4. Se adicionó 400 ul de Cloroformo: Fenol y agitar con el vortéx brevemente y cuidadosamente. (si se utilizaron más de 400 ul de buffer de lisis usado en el paso 2, añadir una cantidad igual de Cloroformo:Fenol).

5. Microcentrifugar a 10,000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente o hasta que la fase acuosa (superior) sea transparente.
6. Se retiró 300 a 350 μ l de la fase acuosa que contiene el ADN a un nuevo tubo. Cuidar de no tomar restos celulares de la interfase.
7. Se adicionó 10 μ l de 3M NaOAc a la fase acuosa seguida por 0.54 volúmenes de isopropanol. Invertir suavemente para mezclar. Los coágulos de ADN que precipitan pueden o no ser visibles dependiendo de la cantidad de material inicial.
8. Microcentrifugar como en el paso 5, por 2 minutos a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante. Lavar el pellet una vez con etanol a 70%. Invertir los tubos por 1 minuto y secarlos sobre el papel toalla.
9. Se colocó los tubos en cámara de vacío y a temperatura de 50°C por 15 minutos o hasta que seque.
10. Resuspender el pellet en 100 a 500 μ l TE (10 mM tris-HCL, 0.1 mM EDTA) o agua destilada. La cantidad de TE usada depende de la cantidad de ADN en el pellet. Se requiere que la concentración final de ADN esté en un rango de 0.1 a 10 μ g/ μ l.

2.7.4. Protocolo Ristaino

Ristaino et al. (1998), modificado por Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

El ADN se extrajo del micelio congelado mediante un procedimiento CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio).

1. El micelio congelado se colocó en tubos de 1.5 μ l de capacidad, se incorporó 150 μ l de tampón de extracción (sorbitol 0.35 M, Tris 0.1 M, EDTA 0.005 M [pH 7.5], bisulfito de sodio 0.02 M) y se agitaron los tubos.
2. Se añadió tampón de lisis nuclear (150 μ l) que contenía Tris 0.2 M, EDTA 0.05 M (pH 7.5), NaCl 2.0 M y CTAB al 2 % (pH 7.5), seguido de 60 μ l de Sarkosyl al 5 % (5 g de N- Lauroylsarcosine por 100 ml de H₂O), y los tubos se agitaron y luego se incubaron a 65°C durante 15 a 30 minutos.
3. Se añadió cloroformo-alcohol isoamílico (mezcla en proporción 24:1) (1 volumen) en cada tubo, después se mezclaron y centrifugaron durante 15 minutos a 13 000 rpm.

4. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se repitió la extracción con cloroformo.
5. El ADN se precipitó durante la noche a -20 °C después de la adición de 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 8.0) y 2 volúmenes de etanol al 100 % frío.
6. Se descartó el sobrenadante y los sedimentos se lavaron con etanol al 70 % y luego se secaron mediante centrifugación al vacío.
7. El ADN se resuspendió en 100 µl de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM [pH 8.0]) y luego se diluyó 1:100 para su uso en PCR en TE.

2.7.5. Protocolo Huanca-Mamani

Huanca-Mamani et al. (2014) modificado por Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

El procedimiento utilizado en la extracción de ADN (Anexo 5) se explica a continuación:

1. Se añadió pequeños grumos de micelio a un tubo Eppendorf de 1.5 ml utilizando un bisturí para el raspado de micelio; se molió con perlititas, se trituró con Nitrógeno líquido para romper el micelio.
2. Luego, se agregó 500 µL de tampón de lisis CTAB al 2 % (Tris-HCl 100 mM, NaCl 1.4 M, PVP al 1 %, Na₂EDTA 20 mM+ LiCl (0,2 % de CTAB). El pH se ajustó a ~8, se molió nuevamente y se incubó a 65 °C durante al menos 30 minutos.
3. La mezcla se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos a una temperatura de 4°C. El sobrenadante se transfiere a un tubo nuevo y se añadió un volumen igual (500 µl) de cloroformo-isoamilalcohol (24: 1 vol/vol).
4. Luego, se volteó suavemente varias veces y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente.
5. La fase superior se transfirió a un tubo nuevo. Se añade 10 gotas (200 µl aproximadamente) de isopropanol frío (-20 °C) para precipitar el ADN (opcional, almacenar la mezcla a -20 °C durante 30 minutos).
6. La muestra se precipitó a 12.073,6 g (12000 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se elimina el sobrenadante y se añade la muestra 500 µL de etanol al 70% (4 °C) y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos.

7. Se descarta el sobrenadante y se seca el sedimento a temperatura ambiente (TA). El sedimento se disolvió en 50 μ L de TE y la solución de ADN se almacenó a -20 °C.

2.8. Evaluación de la calidad de ADN

2.8.1. Por espectrofotometría

Se evaluó la concentración de ADN mediante el valor de absorbancia de 260 nm., mientras que la pureza se determinó a través de la razón ADN/proteínas a 280 nm. De acuerdo con Bancoadn (2020), se considera que el ADN es de calidad cuando la relación A260/A280 está entre 1.8 y 2.0.

Se presenta el protocolo estandarizado que se realizó en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la E. P. Agronomía

1. Inicialmente, el sedimento de ADN extraído se disolvió en 50 μ L de T₁₀E1, para asegurar una disolución completa.
2. Para el blanqueo, se usaron 1.5 μ L de T₁₀E1, y se tomó la misma cantidad de ADN disuelto para realizar la lectura en el espectrofotómetro. Antes de cada lectura las muestras se homogeneizaron mediante un suave movimiento. Es importante destacar que el blanco se preparó con la misma solución utilizada para disolver el pellet de ADN.
3. Finalmente, se procedió a realizar la medición de la concentración de ADN en ng/ μ L. Esta concentración será ajustada para el ADN molde, que se utilizará en la amplificación por PCR.

2.8.2. Por densitometría (electroforesis)

El siguiente protocolo fue utilizado para evaluar la integridad y calidad del ADN:

1. Se preparó gel de agarosa al 2.0 % utilizando 90mL de buffer TBE 1X y añadiendo 2 μ L de Bromuro de Etidio.
2. El gel preparado se vertió en la cubeta con peine y se dejó solidificar.
3. Seguidamente se transfirió gel endurecido en la cámara de electroforesis; para cubrir completamente el gel se llenó con buffer de corrida TBE 1X, luego se removió el peine para permitir el acceso a los pocillos.
4. El Cocktail-Mix para la corrida se preparó con 2 μ L de agua libre de nucleasas (NFW), 1 μ L de loading 6X y 3 μ L de ADN de la muestra, para obtener un volumen final de 6 μ L.

5. Se sirvió el mix en el orden adecuado en los pocillos de gel según el orden adecuado, después se corrió en electroforesis a 90 voltios por 1 hora y 45 minutos, posteriormente se visualizó en el transluminador UV la integridad del ADN y por último se capturó la imagen del gel para su verificación.

2.9. Pre PCR

a. Homogenización de la concentración de ADN

El proceso comenzó homogenizando las concentraciones de ADN extraído a una concentración de trabajo (ADN molde) de 15 ng/uL; utilizando agua libre de nucleasas (NFW). Los valores de concentración inicial se obtuvieron mediante espectrofotometría, expresados en nanogramos por microlitro (ng/uL).

b. Preparación de la mezcla Master Mix

La preparación de la mezcla maestra (master mix) se llevó a cabo para el marcador molecular ITS 1-4. La tabla 2.8 muestra la composición de esta mezcla para cuatro reacciones. El proceso comenzó con el cálculo de las cantidades para una única reacción (1Rxx), que luego se multiplicaron por el número total de reacciones requeridas. Este total comprendía las tres muestras más una reacción extra para cubrir las pérdidas ocasionadas por el contacto con las puntas de las micropipetas, sumando un total de cuatro reacciones.

Tabla 2.8

Mezcla de Master mix para amplificación en PCR, para 4 reacciones.

Reactivos	[°	[f	Volumen 1Rx (uL)	Volumen 4 Rx(uL)
NFW			14.3	57.2
buffer 5X	5X	1X	5.0	20.0
MgCl ₂	25mM	2mM	2.0	8.0
dNTPs	10mM	0.2mM	0.5	2.0
rward (ITS 1)	10uM	1pM/uL	0.5	2.0
Reverse (ITS 4)	10uM	1pM/uL	0.5	2.0
Taq DNA polimerasa	5U/uL	0.025U/uL	0.2	0.8
DNA molde	x	15ng/ul	2.0	(*)
volumen total			25.0 uL	92.0 uL

Nota. (*) Se añadió 4.0 uL de ADN molde, a cada muestra de forma independientemente al realizar la amplificación por PCR. 1Rxx: 1 reacción, 4 Rxx: 4 reacciones.

2.10. PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Para el marcador molecular ITS1-4, se realizó la técnica de PCR, tomando en consideración las longitudes de los cebadores expresadas en pares de bases (tabla 2.9). El perfil térmico empleado se estructuró de la siguiente manera: desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos que incluían desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 58.1 °C por 1 minuto, y extensión a 73.1 °C por 1 minuto, finalizando con una extensión a 74 °C durante 7 minutos. El termociclador empleado fue un Eppendorf pro S.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ejecutó con primers diseñados para amplificar la región ITS (Espacio Transcrito Interno)

Los cebadores utilizados en el estudio (Toju et al. 2012) son:

Tabla 2.9

Secuencias del cebador ITS en dirección 5'-3'

Región	Nombre del primer	Secuencia (5' a 3')	Fuente
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Toju, 2012
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Toju, 2012

2.11. Post PCR

a. Preparación del gel de agarosa

Los productos PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa horizontal al 1.8%.

b. Preparación del mix de carga

Se elaboró un mix de corrida que consistió en 3 µL de producto PCR, 1 µL de loading 6X y 2 µL de NFW, sumando un total de 6 µL. Por otro lado, el marcador de peso molecular (Gen ruler) se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante: 4 µL de NFW, 1 µL de DNA ladder y 1 µL de DNA loading 6X. Estos marcadores, que son fragmentos de ADN de tamaños ya conocidos, se cargaron en el gel de agarosa junto con las muestras durante la electroforesis, funcionando como referencia para determinar el tamaño de los fragmentos de ADN amplificados por PCR. La tensión de corrida fue de 90V (4V/cm) durante 2h con 30 minutos en 90 ml de TBE (Anexo 6).

c. Visualización de las bandas

Se visualizó en el transiluminador UV star 312 nm, la integridad del ADN, luego se tomó captura a la imagen del gel para su verificación.

d. Comparación con marcadores de peso molecular

Se comparan las bandas con el marcador de peso molecular para determinar sus tamaños, al comparar la migración de las bandas de la muestra con las bandas de los marcadores, se determinó el tamaño aproximado de los fragmentos.

2.12. Prueba de patogenicidad

Para realizar la prueba de patogenicidad se tomó en cuenta lo mencionado por Vicuña (2023).

a. Preparación del inóculo

Las cepas puras mantenidas en conservación fueron reactivadas utilizando medio PDA en placas de Petri, incubándose a una temperatura de 27°C por 10 días. Antes de realizar las inoculaciones los plantones fueron sometidos a estrés hídrico, es decir, se mantuvieron sin riego por 12 días.

b. Inoculación

Se inocularon 18 plantones de palto de un año de edad los cuales estaban injertados con la variedad Hass. Cada tratamiento se realizó con tres repeticiones tanto para *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp, y dos cepas de *Fusarium* spp; 12 días después de la inoculación se regó a los plantones para activar las defensas de éstas. Para llevar a cabo la inoculación, se realizó una herida utilizando un sacabocado esterilizado (Anexo 4), luego se colocó un disco circular de agar colonizado por el hongo de estudio, con un diámetro aproximado de 5mm, similar al del sacabocado empleado. Se envolvió con algodón estéril el área inoculada y este se humedeció con agua estéril, el procedimiento finalizó sellando todo con una capa de Parafilm.

c. Evaluaciones

Durante 30 días, los plantones se mantuvieron en el laboratorio bajo condiciones ambientales no controladas. En este período, se evaluó la aparición de síntomas, que

progresaron desde pequeñas manchas superficiales en las proximidades de la herida de inoculación hasta el desarrollo de canchros hundidos (Anexo 4). Tras la inoculación, las plantas se mantuvieron sin riego durante tres días, restableciendo posteriormente un régimen de riego interdiario adaptado al consumo hídrico individual. Para analizar la progresión interna de la pudrición, se practicó un corte transversal en el tallo utilizando un bisturí, lo que permitió observar el avance del área necrótica.

2.13. Porcentaje de incidencia

Es la proporción de plantas en una población que están infectadas por un patógeno. Este porcentaje se calculó dividiendo el número de plantas infectadas, por el número total de plantas evaluadas y multiplicando el resultado por 100 (Agrios, 2005).

$$\text{Incidencia} = \left(\frac{\text{Número de plantas infectadas}}{\text{Número total de plantas evaluadas}} \right) \times 100$$

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Identificación de las características morfológicas

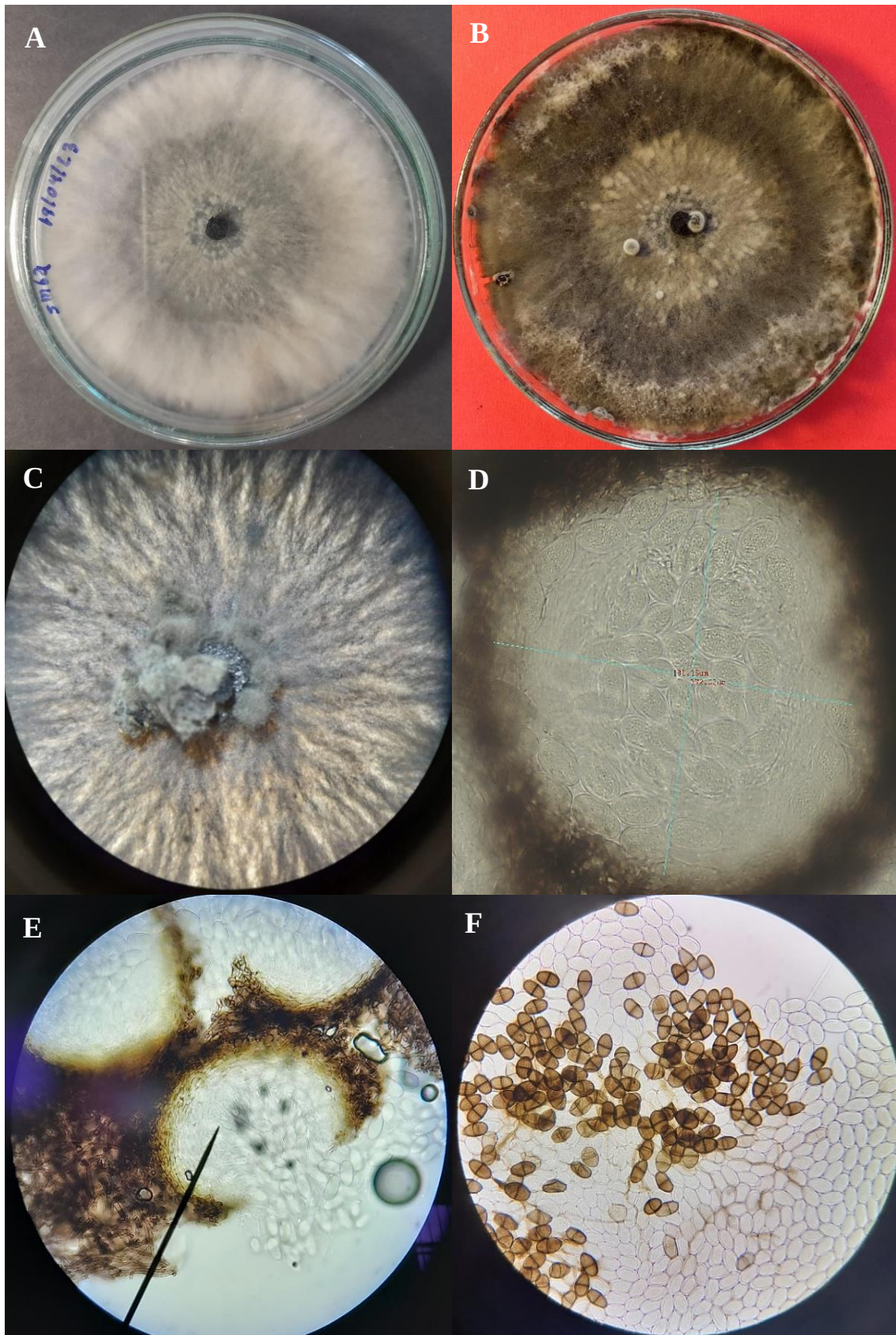
3.1.1. *Lasiodiplodia* spp.

Al observar las características macroscópicas de los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., reveló la formación de micelio denso que al principio fue de color blanco gradualmente fue adquiriendo tonalidades que se iban tornando de gris olivo a gris oscuro (figura 3.1a-b), las colonias llenaron la placa en 4 días, con un ratio de crecimiento promedio de 2.98 cm/día a una temperatura de 27°C. A partir de las características microscópicas, se observaron en las colonias la formación de masas estromáticas grises, (figura 3.1b-c) las cuales que al ser examinadas bajo microscopio revelaron que albergaban diversas picnidias de pared color marrón oscuro a negro (figura 3.1d-e) con tamaños promedios de $200.66 \times 156.36 \mu\text{m}$. Las células conidiogénicas y paráfisas no se evidenciaron. Las conidias presentan una formación acrógena, con una forma que varían de subovoide a elipsoidal, un ápice redondeado y una base ligeramente truncada, al principio es hialina y aseptada, pero luego se torna marrón oscuro, debido al depósito de melanina. Tienen un septo al centro, al madurar, muestran estrías de forma longitudinal en la superficie (figura 3.2) tal como lo mencionan Vicuña (2023) , Phillips et al. (2013), Picos-Muñoz et al. (2015) y Valle-De la Paz et al. (2019).

El tamaño de las conidias promedio es de $27.05 \times 16.02 \mu\text{m}$ que coincide con lo mencionado por Vicuña (2023) cuyo promedio reportado fue de $12 - 16 \times 23 - 31 \mu\text{m}$, asimismo Ko et al. (2004) expresan que el promedio de las mediciones fue de $(20 - 32 \times 12 - 16) \mu\text{m}$, Li et al. (2013) añaden que los conidios son ovoides a alargados.

Figura 3.1

Características macroscópicas y microscópicas de *Lasiodiplodia* spp.



Nota. (*) Identificación del hongo A. Crecimiento de *Lasiodiplodia* spp. en placa 4 DDS, con un micelio blanquecino. B-C. Placa de *Lasiodiplodia* spp. mostrando la formación de masas estromáticas 15DDS. D-E. Observación de picnidias al microscopio. F. Conidios.

Figura 3.2

Conidias de Lasiodiplodia spp.



Nota. (*) A- Conidias inmaduras hialinas en formación de septo. B- C. Conidias maduras pigmentadas con septación y estriaciones longitudinales de *Lasiodiplodia* spp.

3.1.2. *Dotiorella* spp.

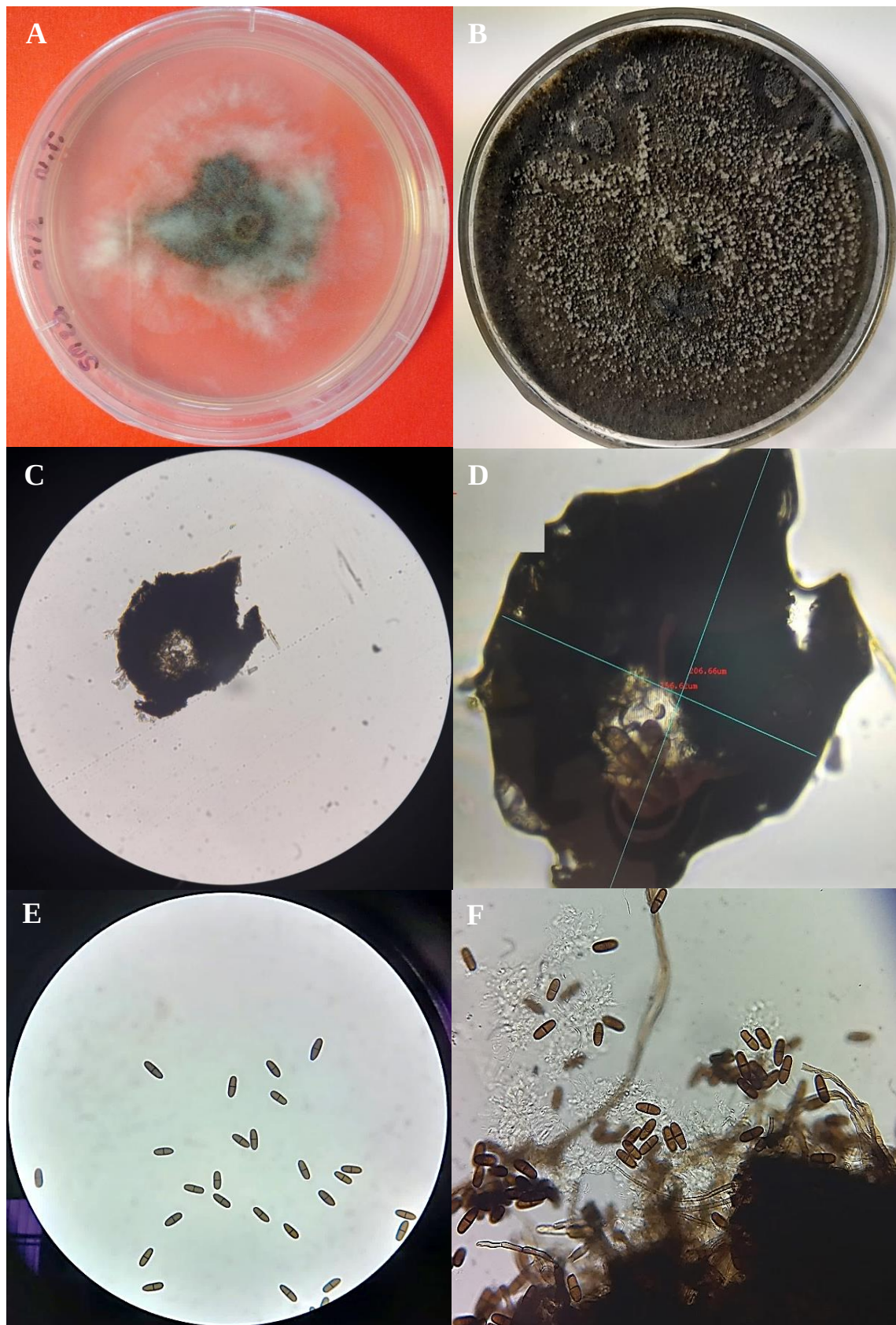
El análisis macroscópico de las colonias de *Dotiorella* spp. cultivadas reveló la presencia de un micelio denso, que en sus etapas iniciales exhibió una coloración olivácea en el centro de la colonia y blancas en los bordes, que luego se tornó olivácea (Figura 3.3a), las colonias llenaron la placa en 8 días, con ritmo promedio de crecimiento de 2.29 cm/día, a una temperatura de 27°C; tornándose de color gris oliváceo pálido a negro oliváceo (figura 3.3b) después de unos días; la presencia de paráfisis y ostiolas no se observaron. La observación de las características microscópicas de *Dotiorella* spp. permitió identificar las colonias la formación de picnidios oscuros, globosos que miden en promedio 172.02 x 131.15 μm (figura 3.3c-d), éstos están agrupados en un estroma bien desarrollado, el estroma es subcortical; los conidióforos son simples y cortos de acuerdo a Barnett & Hunter (1972) y también mencionado por Lawrence et al. (2017).

Inicialmente, los conidios de *Dotiorella* spp. son hialinos de paredes finas, con formas que van de oblongas a elípticas. Luego, sus paredes se engrosan, se vuelven marrones y desarrollan un tabique central grueso (figura 3.3e-f); como lo indican Wenjing et al. (2014).

El tamaño de las conidias promedio fue de 22.49 x 8.46 μm , coincide con lo mencionado por Váczy et al. (2018) cuyo promedio reportado fue de 20-26 x 8-10 μm ; asimismo, Lawrence et al. (2017) expresan que el promedio de las mediciones fue de 19.4-24.3 x 8.7-11.6 μm .

Figura 3.3

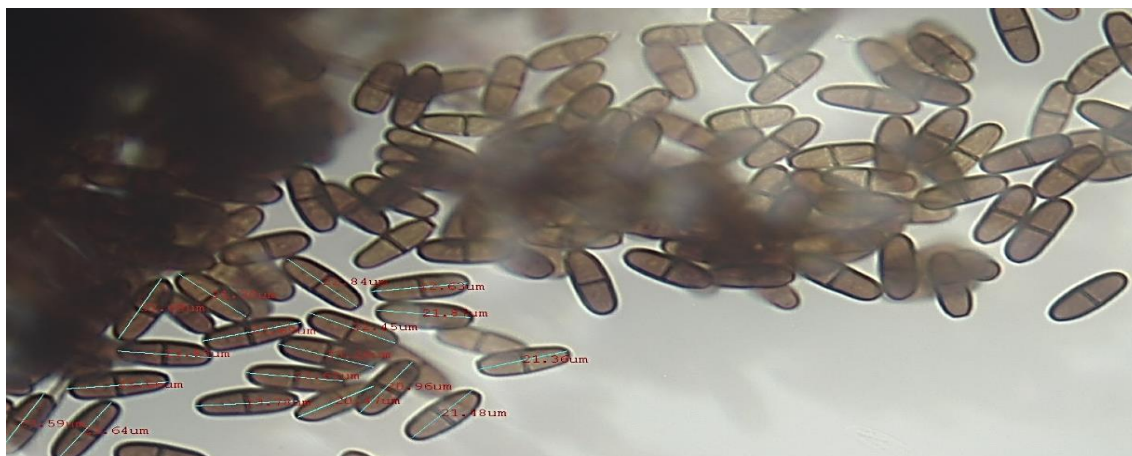
Características macroscópicas y microscópicas de Dotiorella spp.



Notas. (*) Identificación del hongo A. crecimiento de *Dotiorella* spp. en placa 6 DDS. B. Placa de *Dotiorella* spp. con formación de masas estromáticas 20 DDS. C-D. Picnidia observada al microscopio. E- F. Conidios septados de *Dotiorella* spp.

Figura 3.4

Conidias de *Dotiorella* spp.



Nota. (*) Conidias maduras pigmentadas *Dotiorella* spp., de color marrón y forman un tabique central grueso, las conidias son de forma oblongas a elípticas.

3.1.3. *Pestalotiopsis* spp.

Al examinar las propiedades macroscópicas, se constató que las colonias obtenidas de *Pestalotiopsis* spp. se distinguían por la formación de un micelio de aspecto algodonoso. La colonia fue de color blanco (figura 3.5 a-b), la presencia de acérvulos negro brillante fue abundante en los aislados (figura 3.5 c). Las colonias llenaron la placa en 11 días, con un ratio promedio de crecimiento del micelio de 3.01 cm/día a una temperatura de 27°C. El resultado de la caracterización morfológica microscópica se reporta de acuerdo a su media muestral. *Pestalotiopsis* spp. presenta especies con conidios de 5 células, se caracteriza por presentar conidios con tres células medias pigmentadas, mientras las células de los extremos son hialinas, los conidios poseen ornamentaciones apicales y basales; la forma de los conidios oscila entre curvado y recto, presentan 5 células, 2 hialinas en los extremos y 3 versicolas en el centro (figura 3.6) coincide con los resultados mostrados en la investigación de Maharachchikumbura et al. (2011).

El tamaño de las conidias promedio fue de 27.54 x 5.89 µm; coincide con lo reportado por Espinoza et al. (2008), quien señala que el promedio de las mediciones de las conidias es de 22.7 ± 2.3 a 27.0 ± 2.5 µm y 7,4 ± 0.3 a 9.3 ± 0.7 µm de ancho; Lin et al. (2018) mencionan que el promedio de las mediciones de 100 conidias fue de 5.4 - 9.6 × 18.2 - 25.6 µm , asimismo Valencia et al. (2011), indica que el promedio reportado fue de 22.2 - 30.4 × 6.3 - 9.8 µm; además resalta que las células apicales y basales eran incoloras, mientras que las tres células medianas eran de color marrón oscuro. Los

conidios tenían un apéndice basal y de dos a cuatro apéndices apicales largos, el cual está en concordancia con lo señalado en esta investigación, donde se muestra que el número de ornamentaciones apicales es de 3 a 4, el número de ornamentaciones basales es de 1; la longitud de las ornamentaciones apicales mide en promedio 15.75, 15.36 y 14.71 μm .

Figura 3.5

Características macroscópicas y microscópicas de Pestaloptiosis spp.

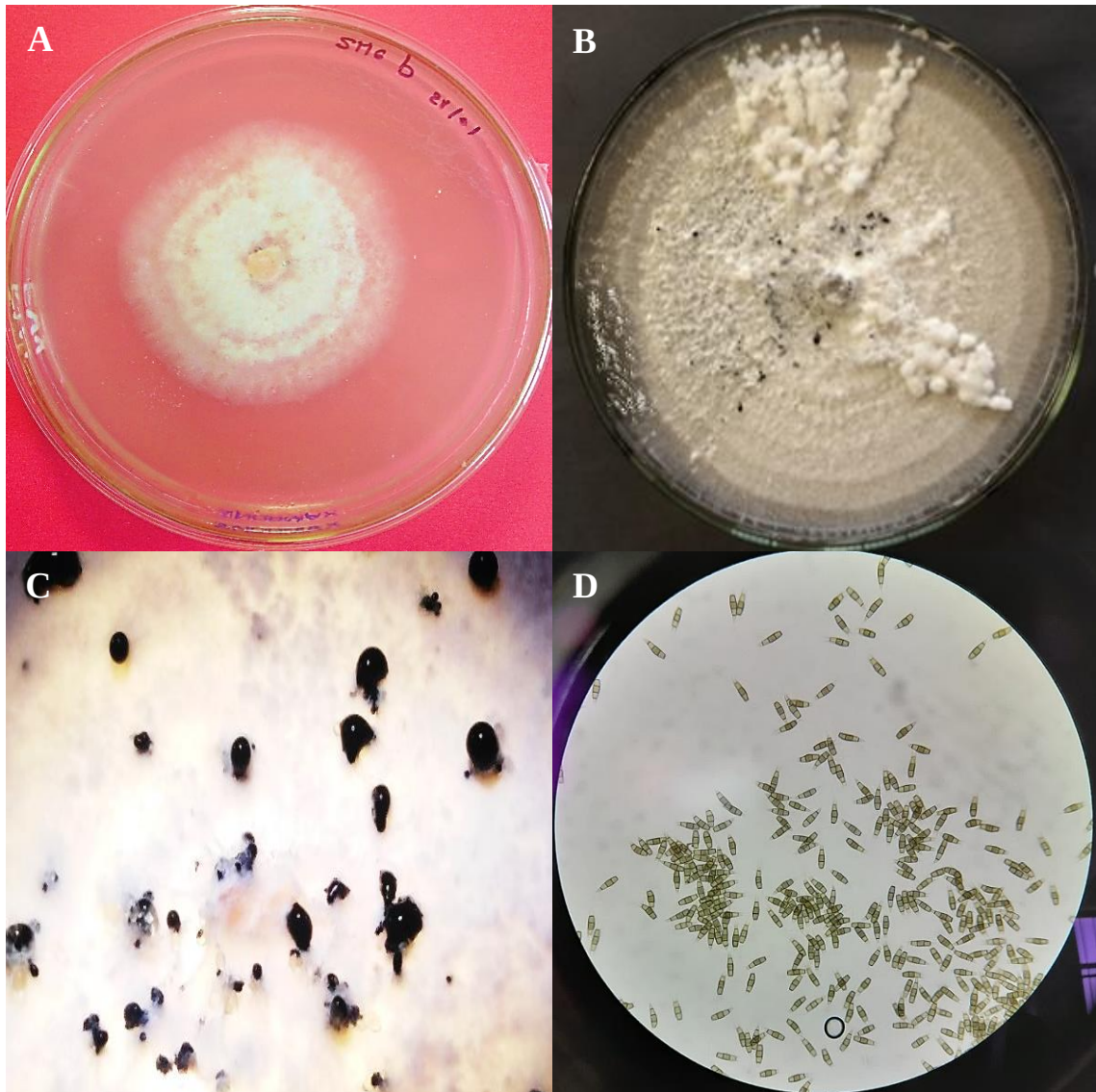
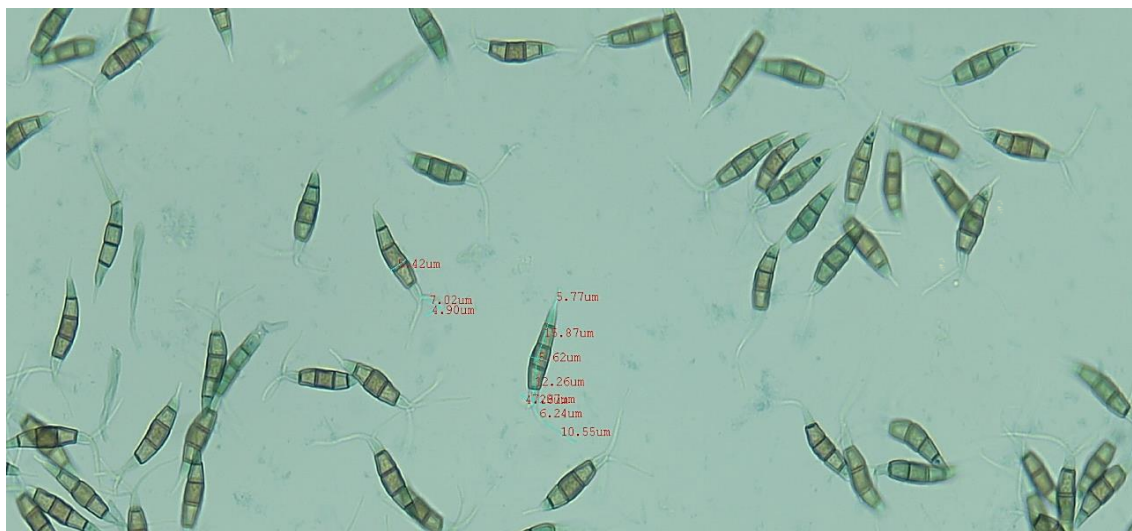


Figura 3.6

Conidias de Pestalotiopsis spp.



Nota. (*) Conidias maduras de *Pestalotiopsis* spp. pigmentadas con septación, presentan 5 células, 2 hialinas en los extremos y 3 versicolas en el centro. La forma de los conidios oscila entre curvado y recto.

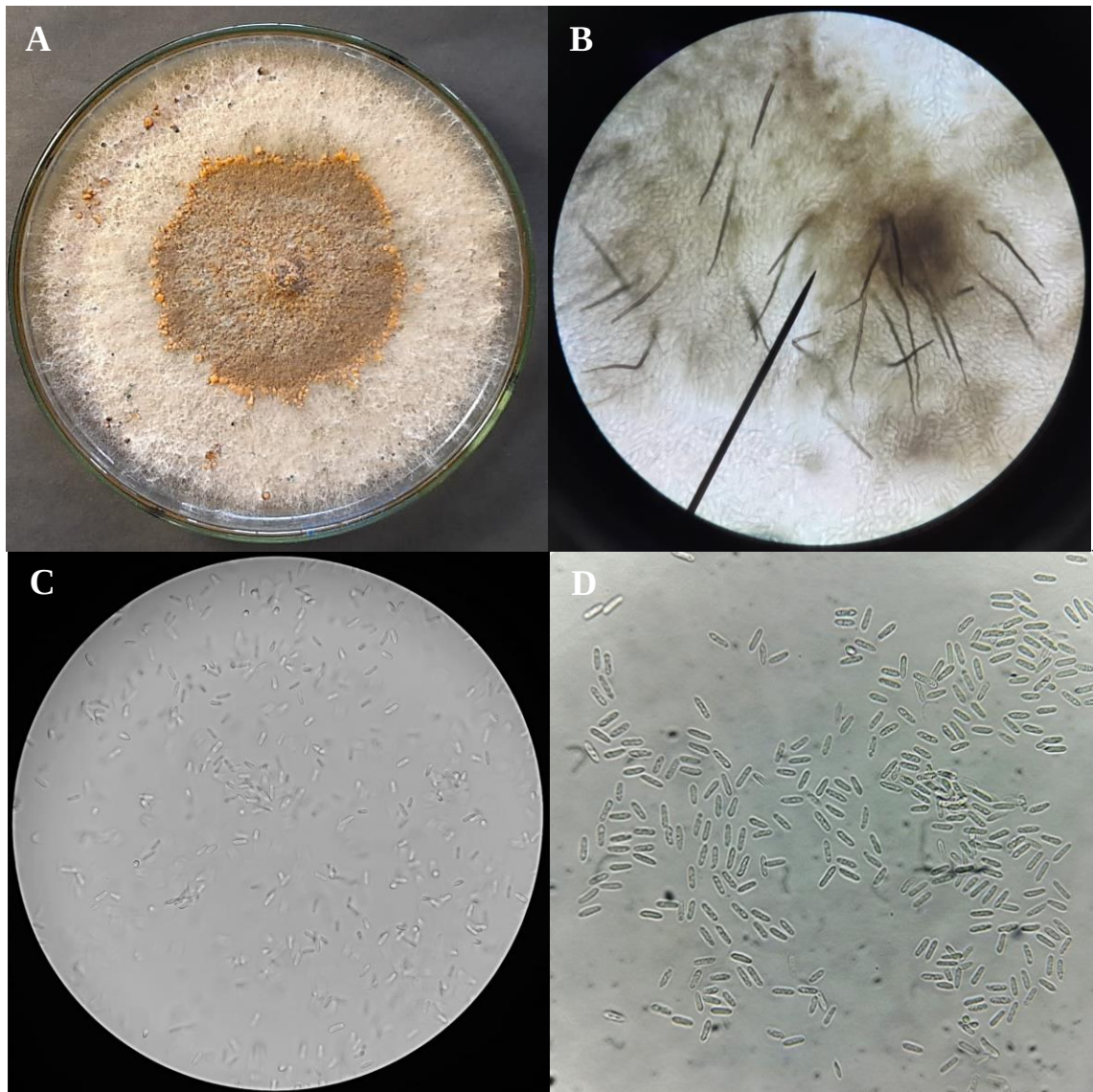
3.1.4. *Colletotrichum* spp.

Las colonias de *Colletotrichum* spp. exhibieron, mediante observación macroscópica, la formación de micelio harinoso (abundante y superficial) que al principio tenían un color blanco y gradualmente se volvía crema con centro color naranja, (figura 3.7 a) coincide con lo mencionado por Valdés et al. (2017) y Trinidad-Ángel et al. (2017); las masas conidiales fueron abundante, salmón y negras con una distribución aleatoria, se aprecian cirros cremosos de color naranja. Las colonias llenaron la placa en 11 días, con un ratio promedio de crecimiento de 2.63 cm/día a una temperatura de 27°C.

Mediante la observación microscópica, se pudo evidenciar la presencia de cuerpos irregulares con setas escasas rectas (figura 3.7 b) coincide con lo expresado por Barnett & Hunter (1972) quienes menciona que *colletotrichum* spp. presenta estructuras en forma de disco llamadas arcérvulos, que son cubiertas de una sustancia cerosa, subepidérmicos, a menudo tienen espinas oscuras; las conidias eran de forma cilíndrico hialino con extremos redondeados (figura 3.7 c-d) concuerda con lo mencionado por (Sandoval et al., 2008), las mediciones de las conidias en promedio fue de 15.16 x 5.90 μm coincide con lo expresado por Silva-Rojas & Ávila-Quezada (2011), quienes sustentan el promedio oscila entre 13.5–23.8 μm de largo y 4.3–6.8 μm de ancho; asimismo Qiao et al. (2021) expresan que el promedio es de 12.2–17.1 μm x 4.2–6.4 μm .

Figura 3.7

Características macroscópicas y microscópicas de *Colletotrichum* spp.



Nota. (*) Identificación del hongo A. crecimiento de *colletotrichum* spp. en placa 11 dds, micelio harinoso (abundante y superficial), color crema con centro color naranja. B. Formación de setas rectas C-D. Conidias observadas al microscopio, forma cilíndrica.

Figura 3.8

Conidias de Colletotrichum spp.



Nota. () Conidias hialinas de Colletotrichum spp. de forma cilíndrico con extremos redondeados.*

3.1.5. *Fusarium* spp.

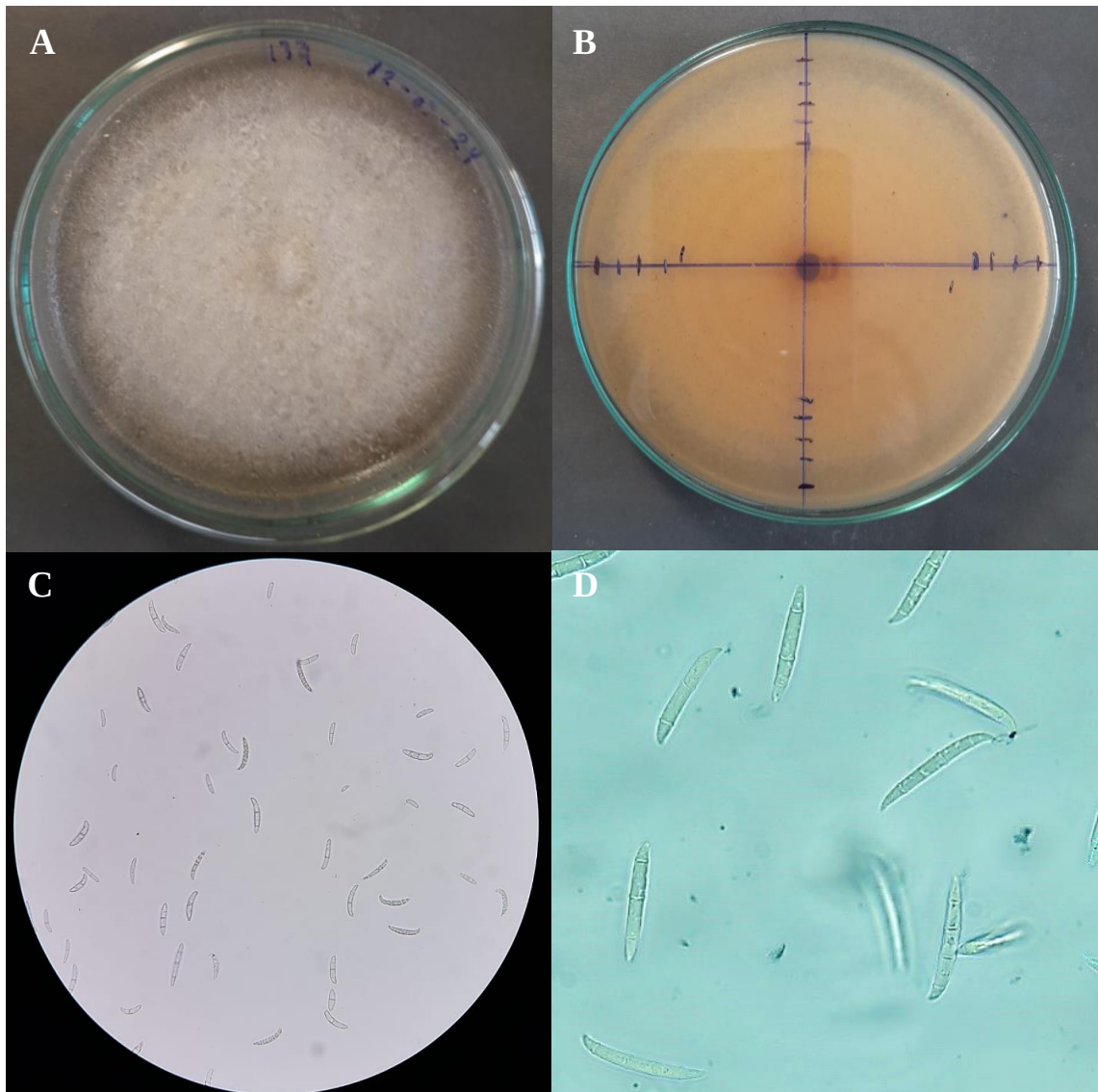
Cepa 1. *Fusarium* spp.

La observación de las características macroscópicas, evidenció que las colonias de *Fusarium* spp. obtenidas formaron un micelio denso que inicialmente fue de color blanco y luego se iba tornando crema, un patrón de crecimiento radial, (figura 3.9 a-b) corresponde con lo expresado por Leslie & Summerell. (2006) y Hernández et al. (2019). Las colonias llenaron la placa en 10 días, con ritmo de crecimiento promedio de 2.53 cm/día a una temperatura de 27°C.

Basado en las características microscópicas, se constató la presencia de macroconidios, en las colonias ausencia de microconidias y clamidosporas, lo cual fue confirmado en un análisis microscópico subsecuente, puso de manifiesto que las macroconidios oscilan entre relativamente anchos, rectas a ligeramente curvadas, con paredes delgadas (figura 3.9 c-d), el tamaño de las conidias promedio fue de $41.10 \times 5.07 \mu\text{m}$ con 3 a 4 septos, célula apical redondeada y célula basal en forma de pie, abundante en esporodoquios, coincide con lo expresado por Leyva-Mir et al. (2017) quienes reportan que el promedio que obtuvieron fue de $22-48 \times 2.5-4.2 \mu\text{m}$, con paredes delgadas ; asimismo Sarkhosh et al. (2018) mencionan que el promedio obtenido fue de $24.5-35.3 \times 4.1-5.4 \mu\text{m}$. Todas las características observadas en microscopía de luz fueron consistentes con las reportadas por Leslie & Summerell (2006) para *Fusarium Solani* quienes añaden que los conidios pueden tener de 3-7 septos.

Figura 3.9

Características macroscópicas y microscópicas de Fusarium spp



Nota. (*) Identificación del hongo A-B. Crecimiento de *Fusarium* spp. en placa 10 DDS y medición de ritmo de crecimiento del micelio. El micelio blanquecino se iba tomando crema. C-D. Observaciones microscópicas de las conidias de *Fusarium* spp.

Figura 3.10

Conidias de Fusarium spp.



Nota. (*) Medición y observaciones microscópicas de las conidias de *Fusarium* spp. que son relativamente anchos, rectas a ligeramente curvadas, con paredes delgadas.

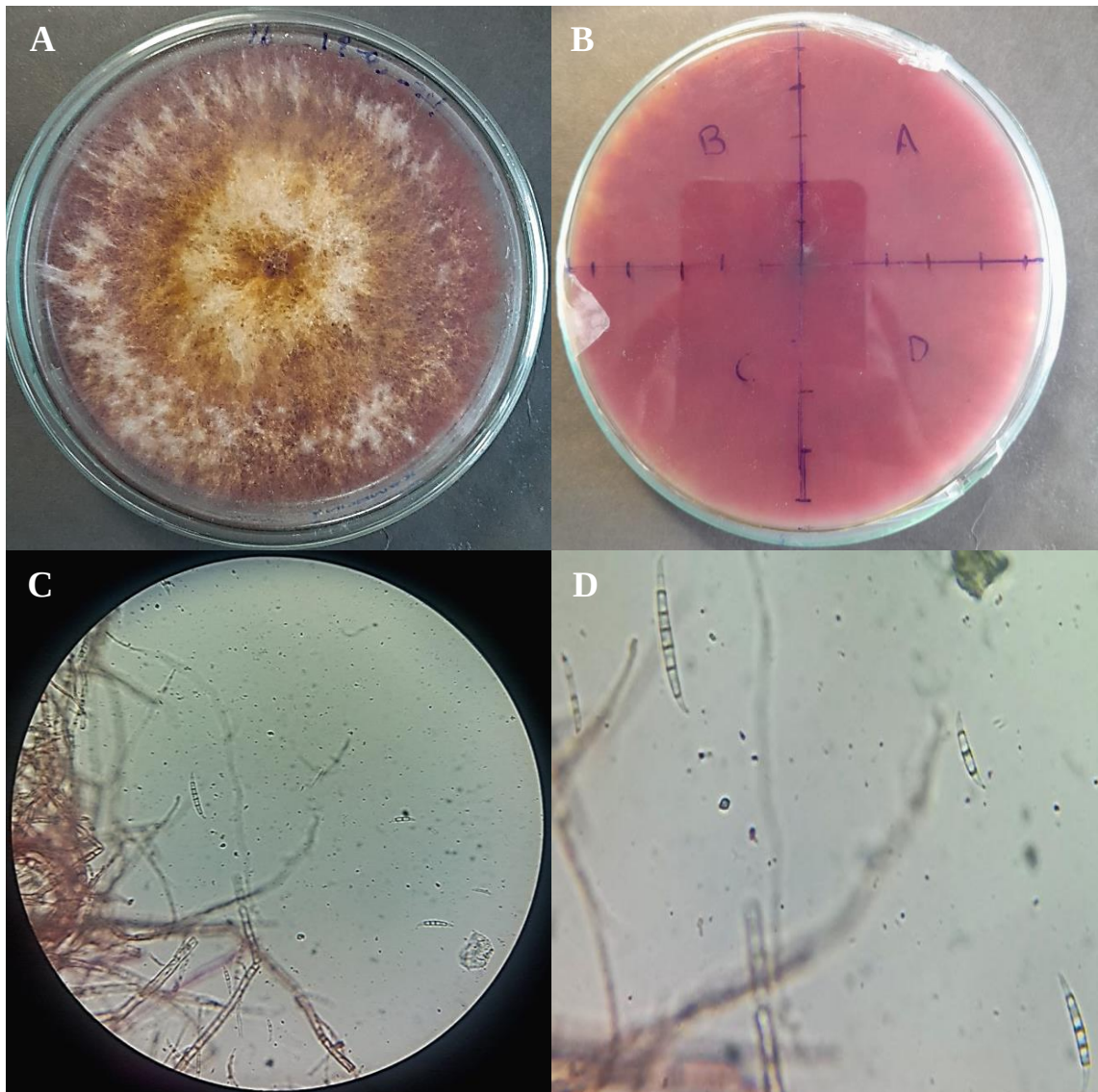
Cepa 2. *Fusarium* spp.

Las colonias de *Fusarium* spp. presentaron características macroscópicas que incluían un micelio algodonoso, el cual inicialmente era de color púrpura que fue tornándose violeta, (Figura 3.11 a-b) con una apariencia de amarillo a naranja cuando se cultiva en PDA coincide con lo expuesto por (Leslie & Summerell., 2006) y Hernández et al. (2019) para *Fusarium oxysporum*. Las colonias llenaron la placa en 6 días, con un ratio de crecimiento promedio de 2.77 cm/día a una temperatura de 27°C.

Con base en las características y observaciones microscópicas, se identificó en las colonias la presencia de macronidios, ausencia de microconidias y clamidosporas, la subsiguiente observación bajo el microscopio demostró que las macroconidios son ligeramente rectos, curvados, relativamente esbeltas y de paredes delgadas (Figura 3.11 c-d). El tamaño de las conidias promedio fue de $41.30 \times 4.16 \mu\text{m}$, con 4-5 septos, células apicales: cónicas y curvadas, a veces con un ligero gancho y células basales de forma puntiaguda a pie, coincide con lo expresado por Leyva-Mir et al. (2017) quienes reportan que el promedio que obtuvieron fue de $22 - 48 \times 2.5 - 4.2 \mu\text{m}$, con paredes delgadas, con 5 o 6 septos.

Figura 3.11

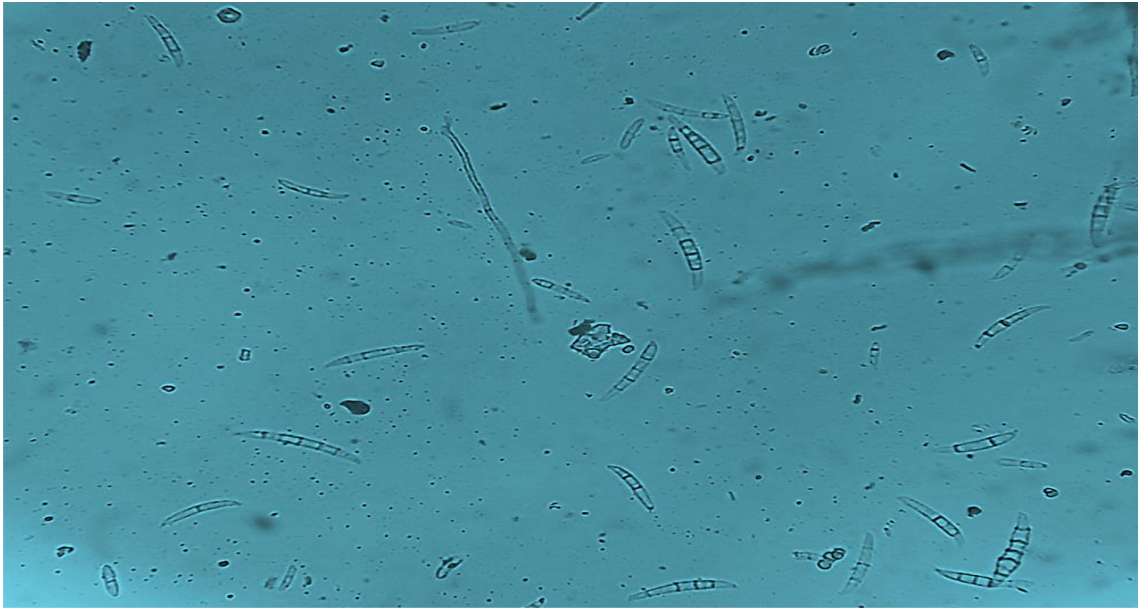
Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium* spp.



Nota. (*) Identificación del hongo A-B. Muestra el crecimiento de *Fusarium* spp. en placa 6 DDS, micelio inicialmente de color púrpura que se iba tornando violeta. C-D. Conidios observados al microscopio.

Figura 3.12

Conidias de Fusarium spp.



Nota. (*). Conidias maduras de *Fusarium* spp. con septación y son rectas o ligeramente curvadas; células apicales cónicas con ligera forma de gancho y células basales en forma puntiaguda.

3.1.6. Número de aislamientos caracterizados por zonas

De las 50 muestras colectas de campo de los distritos de Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, chilcas y Luis Carranza pertenecientes a la provincia de La Mar, se obtuvo 124 aislamientos puros. Teniendo en cuenta las características morfológicas y culturales se obtuvo 14 aislamientos similares a *Lasiodiplodia* spp., 3 aislamientos similares a *Dotiorella* spp., 3 aislamientos similares a *Pestalotiopsis* spp., 5 aislamientos similares a *Colletotrichum* spp y 8 aislamientos similares a *Fusarium* spp.

Tabla 3.1

Géneros identificados morfológicamente del total de aislamientos obtenidos en las zonas muestreadas de la provincia de La Mar.

Distrito	Géneros identificados	N° aislamientos	Código (aislado)
Tambo	<i>Colletotrichum</i> spp.	1	T1
	<i>Fusarium</i> spp.	1	T14
San Miguel	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	1	M17
	<i>Fusarium</i> spp.	3	M3, M5, M8
Patibamba	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	2	P10, P13
	<i>Dotiorella</i> spp.	1	P11
	<i>Fusarium</i> spp.	3	P1, P3, P6
Ninabamba	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	6	N1, N8, N15, N17, N18, N27
	<i>Dothiorella</i> spp.	1	N2
	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	1	N3
	<i>Colletotrichum</i> spp.	3	N4, N6
	<i>Fusarium</i> spp.	1	N5
Chilcas	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	1	C18
	<i>Pestalotiopsis</i> spp.	1	C17
Luis Carranza	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	5	L6, L7, L11, L12, L13
	<i>Dotiorella</i> spp.	1	L10
	<i>Colletotrichum</i> spp.	1	L24

3.1.7. Distribución de los géneros en las zonas muestreadas

El porcentaje de representación de cada género identificado en relación a las 50 muestras totales (figura 3.13) obtenidas de los distritos de Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, chilcas y Luis Carranza, provincia de La Mar, región Ayacucho; indican la predominancia de los aislamientos patogénicos que han sido identificados como *Lasiodiplodia* spp. (43%) con 14 aislamientos, seguido de *Fusarium* spp. (24%), con 8 aislamientos, *Colletotrichum* spp. (15 %) con 5 aislamientos, *Dotiorella* spp. (15%) con 3 aislamientos y finalmente *Pestalotiopsis* spp. (15 %). con 3 aislamientos.

Figura 3.13

Porcentaje de participación de los géneros patogénicos



Notas. (*) Porcentaje de participación de los géneros *Lasiodiplodia* spp., *Dothiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., a *Colletotrichum* spp. y *Fusarium* spp. con respecto al total de muestras patogénicas obtenidas.

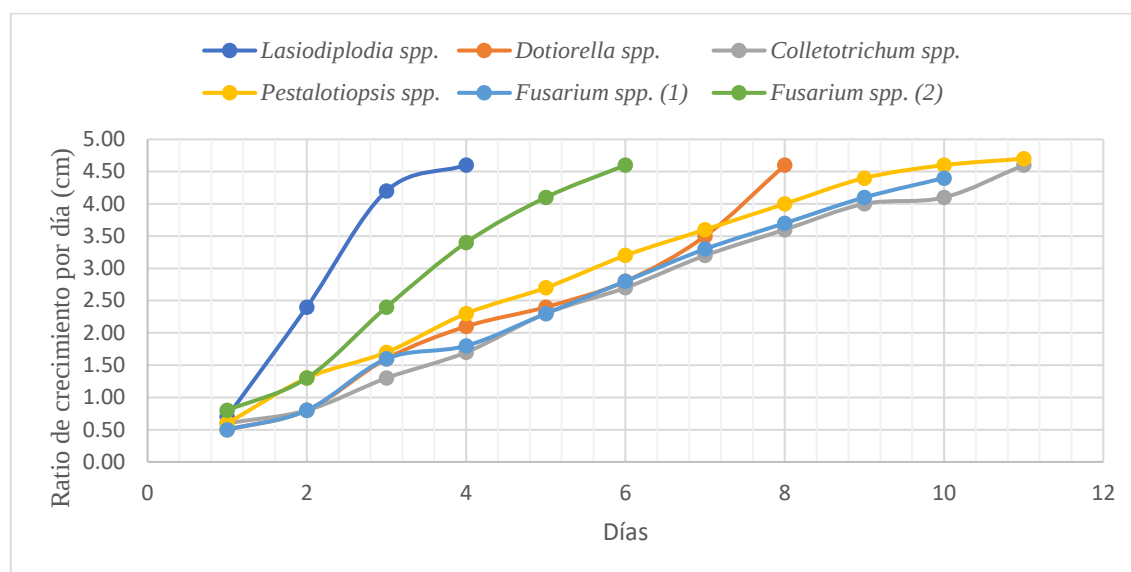
Tabla 3.2

Resumen de principales características macroscópicas y microscópicas de aislamientos patogénicos que causan daños en tallos de palto (Persea Americana Mill).

Aislamiento	N° de mediciones	Largo (μm)	Ancho (μm)	N° septos	Forma de la conidia	Ratio de crecimiento (cm/día)	Tipo de micelio	Color de micelio
<i>Lasiodiplodia</i> spp.	$\bar{X} = 100$	27.05	16.02	1	Subovoide - Elipsoidal	2.98	Denso	Gris olivo - Negro
<i>Dotiorella</i> spp.	$\bar{X} = 100$	22.49	8.46	1	Oblonga - Elíptica	2.29	Denso	Gris oliváceo - Negro oliváceo
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	$\bar{X} = 100$	27.54	5.89	4	Ligeramente Curvado - Recto	3.01	Algodonoso	Blanco
<i>Colletotrichum</i> spp.	$\bar{X} = 100$	15.16	5.90	0	Cilíndrica	2.63	Harinoso (abundante y superficial)	Blanco-crema
<i>Fusarium</i> spp.	$\bar{X} = 100$	41.1	5.07	4	Rectas o ligeramente curvadas: Célula apical redondeada y célula basal en forma de pie	2.53	Denso	Blanco-crema
<i>Fusarium</i> spp.	$\bar{X} = 100$	41.3	4.16	5	Rectas o ligeramente curvadas: Células apicales cónicas con ligera forma de gancho y células basales en forma puntiaguda	2.77	Aéreo Algodonoso	Púrpura-Violeta

Figura 3.14

Comparación del ratio de crecimiento de los aislamientos



Se muestra la comparación de medias de la ratio de crecimiento de los micelios en los diferentes géneros identificados. Este análisis revela que *Pestalotiopsis* spp. exhibió la mayor ratio de crecimiento con 3.01 cm/día, *Colletotrichum* spp. con 2.63 cm/día, seguido de la cepa 2 de *Fusarium* spp. 2.77 cm/día, *Lasiodiplodia* spp. con 2.98 cm/día, *Dotiorella* spp. con 2.29 cm/día y la cepa 1 de *Fusarium* spp. con 2.53 cm/día.

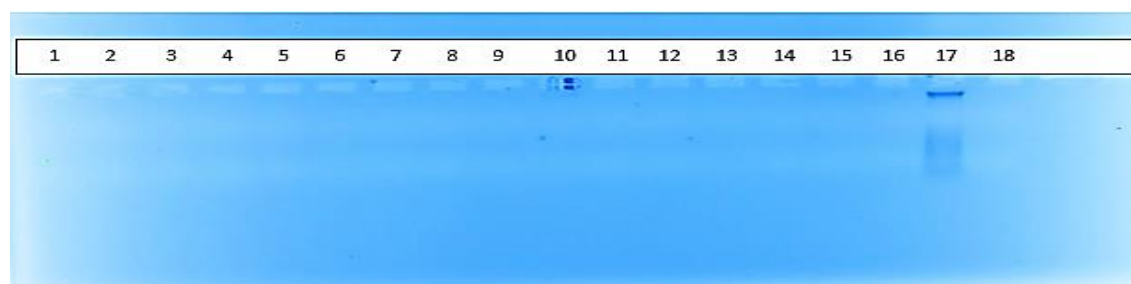
3.2. Resultados de la estandarización para la extracción de ADN de hongos

En las figuras 3.15, 3.16, 3.17, 3.18 y 3.19 se presenta la fotodocumentación de ADN extraído de hongos que causan daños en tallos de palto según el protocolo CETAB, Moller, Taylor, Ristaino y Huanca-Mamani respectivamente. El protocolo de Huanca - Mamani demostró ser más eficaz, debido a la mejor calidad y cantidad de ADN obtenido.

Protocolo CETAB

Figura 3.15

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo CETAB

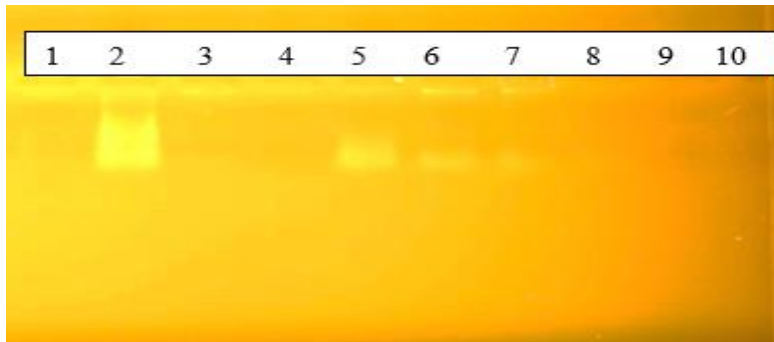


Nota. (*) Muestras de ADN extraído de hongos que causan daños en tallos de palto en gel de agarosa al 1%, corrida de gel 90 voltios durante 50 minutos. 1-16: muestras de ADN extraído de hongos de tallo de palto, 17: muestra de ADN de hojas de papa (control positivo), M18: control negativo (NFW).

Protocolo Möller

Figura 3.16

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Möller

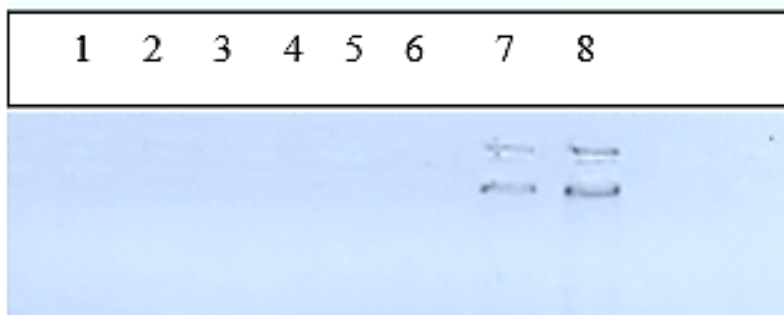


Nota. (*) Muestras del 1 al 10 pertenecen a hongos que causan daños en tallos de palto, estas fueron diluidas en 200 ml de TE. La corrida se realizó en gel de agarosa (1 %) a 90 voltios por 40 minutos. Se utilizó perlitas para moler todas las muestras.

Protocolo Taylor

Figura 3.17

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Taylor.

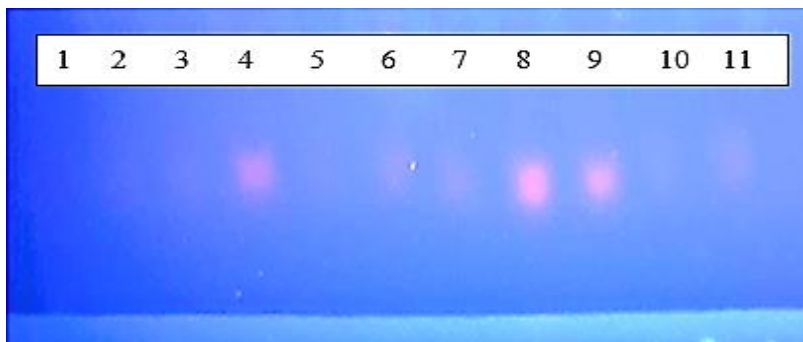


Nota. (*) Las muestras de ADN extraídas del 1 al 8 corresponde a hongos que causan daños en tallos de palto. La corrida se realizó en gel de agarosa (1 %) a 90 voltios por 40 minutos. Se utilizó perlitas para moler en todas las muestras.

Protocolo Ristaino

Figura 3.18

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo Ristaino.



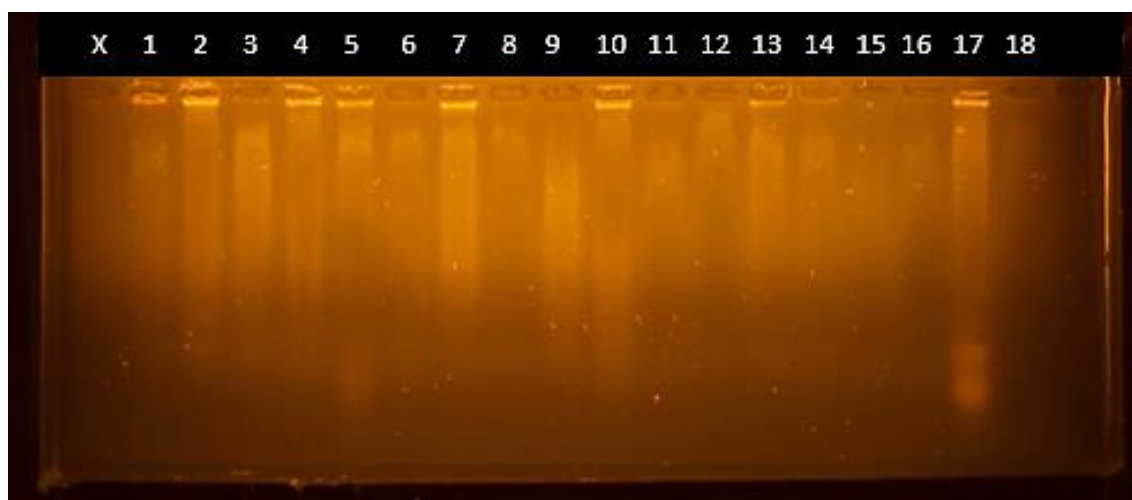
Nota. (*) Las muestras de ADN extraídas del 1 al 11 corresponde a hongos que causan daños en tallos de palto. La corrida se realizó en gel de agarosa (1 %) a 90 voltios por 40 minutos. Se utilizó perlitas para moler en todas las muestras.

Protocolo Huanca-Mamani

Los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp. y *Fusarium* spp. fueron sometidos a un proceso de extracción de ADN. La eficacia del procedimiento se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.8%. Este método demostró ser más práctico y eficiente que otros, logrando extraer ADN de alta calidad y en cantidades suficientes para todos los aislamientos estudiados.

Figura 3.19

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo de Huanca-Mamani.



Nota. (*) Las muestras de ADN extraídas del 1 al 18 corresponde a hongos que causan daños en tallos de palto. La foto documentación de ADN pertenecen a 5 géneros con 3 repeticiones, x: control (blanco).

En la figura 3.19 se muestra lo siguiente:

- 1, 6, 7, 13 (Aislamientos de *Lasiodiplodia* spp.)
- 2, 8, 14 (Aislamientos s de *Dotiorella* spp.)
- 3, 9, 15 (Aislamientos de *Pestalotiopsis* spp.)
- 4, 10, 16 (Aislamientos de *Colletotrichum* spp.)
- 18, 12 (Aislamientos de *Fusarium* spp.)
- X (blanco)

La corrida se realizó en gel de agarosa de 2 % a 90 voltios por 1H y 45 minutos.

3.3. Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectrofotetría

En la figura 3.19 se presenta los resultados de la calidad de ADN extraído en 18 aislamientos de hongos que causan daños en tallos de palto, teniendo presente a los géneros: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp. y *Fusarium* spp.; luego de ser analizados mediante espectrofotometría y electroforesis

horizontal en gel de agarosa. Se reporta una concentración de ADN en promedio de 183.27 ng/uL y la calidad en base a la absorbancia (absorbancia A260/A280) en un promedio de 2.0.

Tabla 3.3

Cuantificación de ADN mediante Espectrofotetría

Género	Carril	Muestra	Absorbancia A260/A280	Cantidad (ng/ul)
<i>Lasiodiplodia</i> spp.	1	N1A	2.02	132
	2	N1B	2.14	270.2
	3	N1C	1.91	147
<i>Dotiorella</i> spp.	4	N2A	1.55	79.8
	5	N2B	1.88	311
	6	N2C	1.69	85.3
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	7	N3A	2.23	52.5
	8	N3B	2.28	254.8
	9	N3C	1.49	25.7
<i>Colletotrichum</i> spp.	10	N4A	2.11	404.3
	11	N4B	2.02	233.3
	12	N4C	2.24	505.5
<i>Fusarium</i> spp.	13	N5A	2.30	110.23
	14	N5B	2.17	77.3
	15	N5C	2.21	60.06
<i>Fusarium</i> spp.	16	T1A	1.59	24.1
	17	T1B	1.69	37.9
	18	T1C	2.05	139.6
	19	blanco		

Nota. (*). Las muestras de ADN extraídas del 1 al 18 corresponde a hongos que causan daños en tallos de palto. N1A-N1B-N1C-T1C: Muestras de *Lasiodiplodia* spp. con 4 repeticiones. N2A-N2B-N2C: Muestras de *Dotiorella* spp. con 3 repeticiones. N3A-N3B-N3C: Muestras de *Pestalotiopsis* spp. con 3 repeticiones. N4A-N4B-N4C: Muestras de *Colletotrichum* spp. con 3 repeticiones. N5A-N5B-N5C: Muestras de cepa 1 de *Fusarium* spp. con 3 repeticiones. T1A-T1B: Muestras de cepa 2 de *Fusarium* spp. con 2 repeticiones. La foto documentación de ADN pertenecen a 5 géneros con 3 repeticiones, x: control (blanco).

3.4. Resultados de la estandarización del pre-PCR con marcadores moleculares de genes ITS del ADN ribosomal

3.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

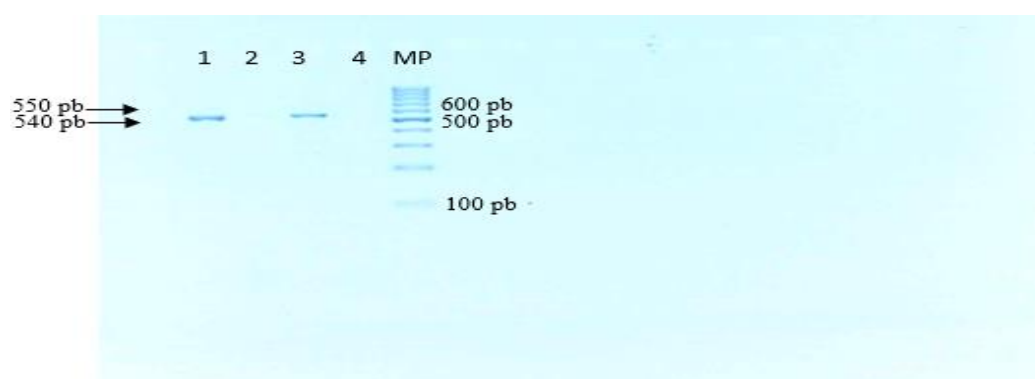
Para validar la efectividad del perfil térmico y la composición de la mezcla de PCR, se amplificó la región ITS empleando los cebadores:

- ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
- ITS4 5' TCCTC CGCTTATTGATA TGC 3'

En la figura 3.20 muestra los productos de PCR empleando los cebadores ITS1/ITS4 en la amplificación correspondiente, ofrecieron como resultado la amplificación de fragmentos de ADN de 540 pb y 550 pb, obtenido a partir de ADN extraído de los micelios fúngicos de las muestras.

Figura 3.20

Productos de PCR amplificados para la región ITS.



Nota. (*). Las figuras muestran las bandas amplificadas (540pb-550pb) que corresponde al gen ITS del ADN ribosomal, para diferentes géneros que causan daños en tallos de palto, 4: Blanco. MP: marcador de peso molecular de 100pb -1000pb. La corrida se realizó en gel de agarosa (1.8 %) en 90ml de TE por 2h con 30 minutos.

La banda obtenida es universal, los hongos analizados con los primers ITS1 y ITS4 muestran una señal dentro de ese rango de pares de bases. Esto confirma la funcionalidad del protocolo de PCR, pero no proporciona detalles sobre el género, ya que representa un amplicón generado a partir de muestras in vitro de hongos de madera del palto con secuencias específicas para esos géneros.

Flores et al. (2021) reportan que, de las cepas aisladas en su trabajo de investigación, se obtuvieron 17 secuencias consenso de 542 pares de bases de la región ITS; las diecisiete secuencias de la región ITS mostraron homología de 100% con la especie *Lasiodiplodia theobromae*. Estas secuencias no mostraron diferencias genéticas entre sí; por lo anterior, fueron agrupadas en una sola secuencia consenso.

Contreras-Pérez et al. (2019) sostiene que en la investigación que realizaron para la secuencia de la región ITS ADNr tuvo una longitud de 539 pb (exhibiendo una

identidad del 99.81% con múltiples aislados de *Lasiodiplodia theobromae* y *Lasiodiplodia parva*).

Quintero et al. (2019) afirma que en el estudio que llevaron a cabo en los aislamientos se obtuvieron productos de amplificación de la PCR parciales de la región ITS-ADNr con una longitud aproximada de 550 pb para *colletotrichum* spp.

Kamel et al. (2003) señala que utilizando cebadores fúngicos universales (ITS1/ITS4), se generaron productos PCR (550-570 pb) de todas las especies tipificadas para *Fusarium* spp.

Ren et al. (2013) manifiestan que el proceso de amplificación por PCR implicó el uso de dos pares de oligonucleótidos, incluyendo entre ellos los cebadores universales de la región ITS, en particular el ITS4. El tamaño de la región ITS fue de 574 pb para los aislados. El análisis filogenético con estas secuencias ITS y las de especies representativas de *Pestalotiopsis* spp. extraídas de la base de datos Gen Bank del NCBI indicaron que las especies de *Pestalotiopsis* spp. formaban dos grupos, con un valor del 45 % y 44 % respectivamente.

Piškur et al. (2011) describe que en la investigación que realizaron se amplificaron regiones de aproximadamente 550 (ADNr ITS) y 300 (EF1-a) (pb). Los datos de las secuencias de las regiones ITS rDNA y EF se combinaron y utilizaron para los análisis filogenéticos; se agruparon en los clados de *Botryosphaeria* y *Dothiorella* spp.

3.5. Resultados de la Prueba de patogenicidad

15 días después de la inoculación se observó que las repeticiones uno y tres del tratamiento de *Lasiodiplodia* spp. empezaron a emitir exudados, *Dotiorella* spp. inicio a marchitarse, secarse y se observó una ligera clorosis en las hojas de las tres repeticiones, *Pestalotiopsis* spp. se observó clorosis en las hojas en las tres repeticiones, *Colletotrichum* spp. empezó a salir manchas necróticas y emitir exudados en la zona de inoculación en las tres repeticiones, en *Fusarium* spp. cepa 1, se observó marchitez en las hojas de la repetición y en las repeticiones dos y tres empezó a liberar exudaciones, en la cepa 2 de *Fusarium* spp. se observó que empezó a emitir exudaciones. A los 30 días se observó que las tres repeticiones del tratamiento de *Lasiodiplodia* spp. presentaron exudaciones, *Dotiorella* spp. presenta ligeras exudaciones y manchas marrones en la zona de inoculación en las tres repeticiones, *Pestalotiopsis* spp. presenta exudaciones en las 3 repeticiones; de la misma manera *Colletotrichum* spp., y las 2 cepas de *Fusarium* spp., se observa una marchitez en las hojas. Alrededor de 30 días, se evidencio una pérdida de pigmentación en la capa epidérmica, acompañada de la presencia de secreciones, exudaciones; los daños externos presentaron un patrón irregular a diferencia de los daños internos que se localizaron bajo la epidermis; ya que estos plantones inoculados mostraron daños en forma elíptica que avanzaron internamente en sentido vertical ascendente y descendente; también, en sentido horizontal, tendiendo a circundar el tronco. Dentro de los cinco géneros género *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp. *Pestalotiopsis* spp y *Colletotrichum* spp, mostraron un daño más extenso, tanto en dirección ascendente como descendente, así como en su diámetro; las dos cepas de *Fusarium* spp. en menor dimensión. Los plantones de palto inoculadas después de 30 días muestran similares signos y síntomas a los constatados en los plantones originalmente colectadas de donde se obtuvo los aislamientos.

Figura 3.21.

Presencia de exudados alrededor del punto de inoculación



Figura 3.22

Prueba de patogenicidad en plantones de palto Hass



Nota. (*). Prueba de patogenicidad en plantones de palto Hass que muestran daños internos para los aislamientos: A- *Lasiodiplodia* spp., B-*Dotiorella* spp., C-*Pestalotiopsis* spp., D-*Colletotrichum* spp., E-*Fusarium* spp., F-*Fusarium* spp., a los 30 días después de la inoculación.

Tabla 3.4*Porcentaje de incidencia de los resultados obtenidos de la prueba patogenicidad*

Tratamientos	Aislamientos	Repeticiones			% Incidencia
		R1	R2	R3	
T1	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	1	1	1	100
T2	<i>Dotiorella</i> spp.	1	1	1	100
T3	<i>Pestalotiosis</i> spp.	1	1	1	100
T4	<i>Colletotrichum</i> spp.	1	1	1	100
T5	Cepa 1: <i>Fusarium</i> spp.	0	1	1	66.67
T6	Cepa 2: <i>Fusarium</i> spp.	1	1	0	66.67

Notas. (*) 1: presenta sintomatología; 0: No presenta sintomatología. En la tabla 3.4 se muestra que el porcentaje de incidencia de los géneros *Lasiodiplodia* spp. (100%), *Dotiorella* spp. (100%), *Pestalotiosis* spp. (100%), *Colletotrichum* spp. (100%), cepa 1 y 2 de *Fusarium* spp. (66.67%),

En la tabla 3.4 se muestra el Porcentaje de incidencia de los resultados obtenidos de la prueba patogenicidad. Se presenta 6 tratamientos, y cada tratamiento con tres repeticiones.

- Para el tratamiento 1: representa al género *Lasiodiplodia* spp. con tres repeticiones, muestra una incidencia de 100%.
- Para el tratamiento 2: representa al género *Dotiorella* spp. con tres repeticiones, muestra una incidencia de 100%.
- Para el tratamiento 3: representa al género *Pestalotiosis* spp con tres repeticiones, muestra una incidencia de 100%.
- Para el tratamiento 4: representa al género *Colletotrichum* spp. con tres repeticiones, muestra una incidencia de 100%.
- Para el tratamiento 5: representa al género *Fusarium* spp. cepa 1 con tres repeticiones, muestra una incidencia de 66.67 %.
- Para el tratamiento 6: representa al género *Fusarium* spp. cepa 2 con tres repeticiones, muestra una incidencia de 66.67 %.

CONCLUSIONES

1. Se identificó mediante características morfológicas cinco géneros de hongos: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestalotiosis* spp. y *Fusarium* spp. que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.) en la provincia de La Mar, Ayacucho.
2. Se estandarizó en base al protocolo de Huanca-Mamani et al. (2014) para la extracción de ADN de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.).
3. Se estandarizó en base a un protocolo para el pre-PCR con marcadores moleculares de genes ITS del ADN ribosomal, que identifican y confirman el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.)
4. La prueba de patogenicidad confirmó que los hongos identificados son agentes causales de los daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.) ocasionados por: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestalotiosis* spp. y *Fusarium* spp.

RECOMENDACIONES

1. Realizar la secuenciación del amplicón resultante de la PCR, para llevar a cabo el análisis Bioinformático de la secuencia resultante con el propósito de determinar tanto el género como la especie de los hongos reportados.
2. Llevar a cabo evaluaciones que abarquen controles químicos, biológicos, genéticos y culturales; además, implementar estrategias tanto in vitro como en plantaciones en producción para establecer planes de control fitosanitario.
3. Se sugiere realizar estudios de investigación más exhaustivos, partiendo de los trabajos previos realizados en este estudio con respecto a la caracterización morfológica e identificación molecular para determinar posibles diferencias entre los géneros y especies de: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestalotiosis* spp. y *Fusarium* spp.
4. Realizar investigaciones afines en los diferentes cultivos tanto anuales y perennes de valor comercial en distintas zonas de la región Ayacucho, con el fin de determinar los agentes causales de las enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahzadeh, J., Javadi, A., Zare, R. & Phillips, A. J. L. (2014). A phylogenetic study of *Dothiorella* and *Spencermartinsia* species associated with woody plants in Iran, New Zealand, Portugal and Spain. *Persoonia: Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 32, 1–12. <https://doi.org/10.3767/003158514X678606>
- Agrios, G. (2005). *Fitopatología* (Editorial Limusa S.A. De C.V., Ed.; 2° Edición). <https://infoagronomo.net/fitopatologia-gn-agrios-pdf/>
- Alama, I., Maldonado, E. & Rodríguez-Gálvez, E. (2006). *Lasiodiplodia theobromae* afectando el Cultivo de Palto (*Persea americana*) en las condiciones de Piura-Perú. *Dialnet*, 4–13.
- Alejos, L., Aragón, M. & Cornejo, A. (2015). Extracción y purificación de ADN. In A. Cornejo, A. Serrato, & B. Rendon (Eds.), *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología* (Vol. 36, pp. 1–3). https://www.researchgate.net/publication/280731680_Microsatelites
- Avilán, L., Leal, F. & Bautista, D. (1989). *Manual de Fruticultura: principios y manejo de la producción* (2da.Edición).
- Baiza, V. (2003). *Guía Técnica del Cultivo de Aguacate* (J. Escobar, Ed.; Primera). www.minec.gob.sv
- Barnett, H., & Hunter, B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (third edition).
- Bernal, J. A., Cipriano, E., & Díaz Díez, A. (2020). Actualización tecnológica y buenas prácticas agrícolas (bpa) en el cultivo de aguacate. In *Capítulo I Generalidades del cultivo*. <https://doi.org/10.21930/agrosavia.manual.7403831>
- Capriles, R., Reyes, L., Molina, H., & Sornes, H. (1979). *Situación actual y potencial del cultivo de cacao*.
- Catalogue of Life. (2022). *catalogue of Life*. Royal Botanic Garden Kew . <https://n9.cl/1ahp5>
- Cenis, J. L. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*, 20(9), 2380–2380. <https://doi.org/10.1093/nar/20.9.2380>
- Contreras-Pérez, M., Santoyo-Pizano, G., De los Santos-Villalobos, S., Gutiérrez-García, M. A., Orozco-Mosqueda, M. D. C. & Rocha-Granados, M. D. C. (2019). Primer reporte de *Lasiodiplodia* en plantas de zarzamora (*Rubus* subgénero *Eubatus*) en el estado de Michoacan, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1905-4>

- Cornejo, A., Serrato, A., Rendon, B. & Graciela, M. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología* (A. Ruíz Cortines, Ed.; Primera edición).
- Dann, E. K., Ploetz, R. C., Coates, L. M. & Pegg, K. G. (2013). Foliar, fruit and soilborne diseases. In *The avocado: botany, production and uses* (pp. 380–422). CABI. <https://doi.org/10.1079/9781845937010.0380>
- De Souza, J. (2021, June 18). *La muerte regresiva en palto*. ECOFERTILIZING. <https://ecofertilizing.pe/la-muerte-regresiva-en-palto/>
- Delgado, A., Ñique, M.s & Mendez, E. (2019). *Actualización en el control de Lasiodiplodia en palto*. <https://redagricola.com/descargue-las-presentaciones-la-2a-conferencia-redagricola-trujillo/>
- Denman, S., Crous, P., Taylor, J., Kang, J., Pascoe, I. & Wingfield, M. (2000a). An overview of the taxonomichistory of Botryosphaeria and a re evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. *Stusies in Mycology*, 139–140.
- Denman, S., Crous, P., Taylor, J., Kang, J.-C., Pascoe, I. & Wingfield, M. (2000b). An overview of the taxonomic history of Botryosphaeria, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. In *Article in Studies in Mycology*. <https://www.researchgate.net/publication/254811739>
- Doyle, J., & Doyle Jane. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12, 12–15.
- Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Keith, L. M., & Latorre, B. A. (2008). Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease*, 92(10), 1407–1414. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1407>
- Flores, H., Flores, J., Varela, S. E., Pérez, A., Azuara, A., & Monteon-Ojeda, A. (2021). Reporte de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon y Maubl. en árboles cítricos de Tamaulipas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(3), 499–511. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i3.2640>
- Flores-Izquierdo, M. A. & Espinoza-Villanueva, L. E. (2023). Situación actual y perspectivas de la producción de palta (*Persea americana*) peruana en el contexto del comercio internacional. *Ingeniería Industrial*, 45, 157–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.26439/ing.ind2023.n45.6316>
- Fontecha, G., Trabanino, R., Pérez-Borrero, B., Catalán, P., Aguilar, E., Gallego, F. J., Figueiras, A. M. & Benito, C. (2012). Caracterización Molecular de Aislados

- Centroamericanos de *Beauveria bassiana* para el Control de la Broca del Café. *Revista Ciencia y Tecnología*, 39–61. <https://doi.org/10.5377/rct.v0i8.699>
- Freire, R., Arias, A., Mendez, J. & Insua, A. (2010). Sequence variation of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA in Cerastoderma species (Bivalvia: Cardiidae). *Journal of Molluscan Studies*, 76(1), 77–86. <https://doi.org/10.1093/mollus/eyp047>
- Galindo, E., Arzate, A., Ogata, N., Murguía, J., Lee, H. & Landero, I. (2008). *Origen y domesticación del aguacate (Persea americana Mill.) en Mesoamérica*.
- García, O., Perera, S., Rodríguez, A. & Siverio, F. (2017). *Enfermedades del aguacate causadas por especies de hongos de la familia Botryosphaeriaceae*. <https://www.icia.es/icia/download/publicaciones/Botryosphaeriaceae01.pdf>
- García Pérez, O., Perera González, S., Rodríguez Pérez, A. & Siverio de la Rosa, F. (2021). *Estudio de parcelas de aguacate afectadas por hongos de la familia Botryosphaeriaceae en la isla de Tenerife*. www.researchgate.net/publication/351450662
- Gardiazabal, F. (2001). Historia y Desarrollo del Palto en Chile. In *California Avocado Society* (Vol. 85).
- Granados, E. (2018). *Caracterización Morfológica de phytophthora cinnamomi como patógeno causante de la enfermedad de la tristeza del palto variedad hass y fuerte en el distrito de Moquegua*. Universidad Nacional de Moquegua.
- Hartill, W. F. T. & Everett, K. R. (2002). Inoculum sources and infection pathways of pathogens causing stem-end rots of ‘Hass’ avocado (*Persea Americana*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 30(4), 249–260. <https://doi.org/10.1080/01140671.2002.9514221>
- Hernández, A., Pineda, A., Noriega-Córdova, H. & Noriega-Córdova, I. (2019). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” *Capsicum annumm* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *ARNALDOA*. <https://doi.org/doi.org/10.22497/arnaldoa.262.26211>
- Huanca-Mamani, W., Salvatierra, R. & Sepúlveda-Chavera, G. (2014). *A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi* (Vol. 32). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010>
- Instituto Nacional de Estadística e Informática. (2024). *Producción Nacional* [Instituto Nacional de Estadística e Informática]. <https://acortar.link/936E1Q>
- Integrated Taxonomic Information System. (2011). *ITIS*. <https://n9.cl/jvjg4>

- Iyanyi, N. G., Ataga, A. E., Rotimi, I. S. & Blessing, I. (2021a). Molecular identification of fungi associated with avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. *Agro-Science*, 20(1), 80–86. <https://doi.org/10.4314/as.v20i1.13>
- Iyanyi, N. G., Ataga, A. E., Rotimi, I. S. & Blessing, I. (2021b). Molecular identification of fungi associated with avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. *Agro-Science*, 20(1), 80–86. <https://doi.org/10.4314/as.v20i1.13>
- Jan, J. & LeBorgne, S. (2001). Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. In *Biotecnología* (pp. 103–109).
- Jeewon, R., Liew, E. C. Y. & Hyde, K. D. (2004). Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity*, 39–55. <https://www.researchgate.net/publication/228952303>
- Kamel, A. A.-E., Ibrahim, N. A., Mohamed, A. A.-S., Mohamed, S. K. & Joseph, A. V. (2003). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *African Journal of Biotechnology*, 2(4), 82–85. <https://doi.org/10.5897/ajb2003.000-1016>
- Khodadadi, F., González, J. B., Martin, P. L., Giroux, E., Bilodeau, G. J., Peter, K. A., Doyle, V. P. & Acimović, S. G. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. noveboracense* sp. nov. *Scientific Reports*, 10(1), 11043. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66761-9>
- Ko, W. H., Wang, I. T. & Ann, P. J. (2004). *Lasiodiplodia theobromae* as a Causal Agent of Kumquat Dieback in Taiwan. *Plant Disease*, 88(12), 1383–1383. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1383A>
- Lawrence, D. P., Peduto Hand, F., Gubler, W. D. & Trouillas, F. P. (2017). Botryosphaeriaceae species associated with dieback and canker disease of bay laurel in northern California with the description of *Dothiorella californica* sp. nov. *Fungal Biology*, 121(4), 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.09.005>
- Lee, S. B. & Taylor, J. W. (1990). Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores. In *PCR Protocols* (pp. 282–287). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50038-X>
- Leslie, J. & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (First edition). <https://doi.org/10.1002/9780470278376>

- Leyva-Mir, S., Vega-Portillo, H., Villaseñor-Mir, H., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M. & Tovar-Pedraza, J. (2017). Characterization of *fusarium* species causing root rot of wheat in the bajío, Mexico. *Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 33(2), 142–142.
- Li, Q.-L., Guo, T.-X., Pan, Z.-B., Huang, S.-P., Mo, J.-Y., Ning, P. & Hsiang, T. (2013). An Outbreak of Gummosis of Mango Trees Caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Guangxi, South China. *Plant Disease*, 97(5), 690–690. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-12-0969-PDN>
- Li, W., Liu, J., Bhat, D. J., Camporesi, E., Xu, J. & Hyde, K. D. (2014). Introducing the novel species, *dothiorella symphoricarposicola*, from Snowberry in Italy. *Cryptogamie, Mycologie*, 35(3), 257–270. <https://doi.org/10.7872/crym.v35.iss3.2014.257>
- Limón, M. (2017). *Caracterización morfológica y molecular de Pestalotiopsis spp. asociado a cáncer de tallo de arándano (Vaccinium corymbosum L.) en el occidente de México* [Universidad de Guadalajara]. <http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/6048>
- Lin, C.-H., Dong, P.-P., Fang, S.-Q., Li, M.-F., Liu, W.-B. & Miao, W.-G. (2018). First Report of Avocado Dieback Disease Caused by *Pestalotiopsis longiseta* in China. *Plant Disease*, 102(12), 2660. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-18-0939-PDN>
- Llanos Melo, A. K. & Apaza-Tapia, W. E. (2021). Distribution of stem-end rot on the canopy in ‘Hass’ avocado trees in two coastal areas in Peru. *Peruvian Journal of Agronomy*, 5(2), 60–70. <https://doi.org/10.21704/pja.v5i2.1771>
- Ma, X., Nontachaiyapoom, S., Jayawardena, R. S., Hyde, K. D., Gentekaki, E., Zhou, S., Qian, Y., Wen, T. & Kang, J. (2018). Endophytic *Colletotrichum* species from *Dendrobium* spp. in China and Northern Thailand. *MycKeys*, 43, 23–57. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.43.25081>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Guo, L. D., Chukeatirote, E., Bahkali, A. H. & Hyde, K. D. (2011). *Pestalotiopsis*-morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50, 167–187. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0125-x>
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J. & Crous, P. W. (2014). *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121–186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Manion, P. D. (1991). *Tree disease concepts*. Prentice-Hall, L (p. 402).

- Mas, E., Poza, J., Ciriza, J., Zaragoza, P. & Osta Clementina Rodellar, R. (2001). Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). *AquaTIC*. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7446017>
- Mayfield, A., Fraedrich, S. & Merten, P. (2019). *Laurel Wilt*. <https://www.fs.usda.gov/main/r8/forest->
- McDonald, V. & Eskalen, A. (2011). Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California. *Plant Disease*, 95(11), 1465–1473. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-11-0136>
- Mehl, J. W. M., Slippers, B., Roux, J. & Wingfield, M. J. (2017). Overlap of latent pathogens in the Botryosphaeriaceae on a native and agricultural host. *Fungal Biology*, 121(4), 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.015>
- Ministerio de Comercio Exterior y Turismo. (2022). *Reporte regional de comercio Regional 2021, Anual-Ayacucho*. <https://n9.cl/2zg4hb>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2024, April 4). *Exportación de palta superó las 36 mil toneladas en primer bimestre de 2024*. Sierra y Selva Exportadora. <https://www.gob.pe/institucion/sse/noticias/930071-midagri-exportacion-de-palta-supero-las-36-mil-toneladas-en-primer-bimestre-de-2024>
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H. & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research*, 20(22), 6115–6116. <https://doi.org/10.1093/nar/20.22.6115>
- Mondragón, A., Rodríguez-Alvarado, G., Gmez-Dorantes2, N., Guerra-Santos, J. J. & Fernández-Pavía, S. P. (2021). Botryosphaeriaceae: una familia de hongos, compleja, diversa y cosmopolita. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(4), 643–654. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i4.2620>
- Montalvo, C. & Lugo, M. (2019). Electroforesis: fundamentos, avances y aplicaciones. *EPISTEMUS*, 13(26), 48–54. <https://doi.org/10.36790/epistemus.v13i26.96>
- Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-de Ita, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V. & Contreras-Paredes, C. A. (2020). Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2005-7>
- Olalde-Lira, G., Raya, Y., Apáez, P., Vargas-Sandoval, M., Pedraza, M., Raymundo, T., Valenzuela, R. & Lara-Chávez. (2020). Characterization of *Fusarium* spp., a

- Phytopathogen of avocado (*Persea americana* Miller var. *drymifolia* (Schltdl. and Cham.)) in Michoacán, México. *Revista de La Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo*, 301–316. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1853-86652020000200024&lng=es&tlng=en.
- Oviedo, J. (2018). *Identificación Biomolecular de Peronosporales radicales en palto, mango, chirimoya y mandarina en la costa Peruana*. Universidad Agraria La Molina.
- Pavlic, D., Slippers, B., Coutinho, T. A., Gryzenhout, M. & Wingfield, M. J. (2004). *Lasiodiplodia gonubiensis* sp. nov., a new Botryosphaeria anamorph from native Syzygium cordatum in South Africa. In *STUDIES IN MYCOLOGY* (Vol. 50).
- Pérez, L., Saquero, M. & Beltrán, J. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum* sp. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea* sp. *Revista Colombiana de Biotecnología*, V, 24–35.
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Picos-Muñoz, A., García-Estrada, S., León-Felix, A., Sañudo- Barajas, A. & Allende Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *SciELO*, 33, 54–74. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054
- Pillpe, D. (2022). *Dosis de biosílice en la tolerancia a Phytophthora cinnamomi de plantones de palto con y sin abonamiento. Ayacucho. 2021*. Universidad Nacional San Cristóbal De Huamnga.
- Pinto, A., Álvarez, M., & Tobar, G. (1986). *Pudrición de frutos y canchros en ramas de palto, causados dotiorella spp.en la V región de chile*. 499–501. <https://biblioteca.inia.cl/items/177eacec-b3af-489a-b711-ca717a96709b>
- Piškur, B., Pavlic, D., Slippers, B., Ogris, N., Maresi, G., Wingfield, M. J. & Jurc, D. (2011). Diversity and pathogenicity of Botryosphaeriaceae on declining Ostrya carpinifolia in Slovenia and Italy following extreme weather conditions. *European Journal of Forest Research*, 130(2), 235–249. <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0424-x>

- Pulido, V. (2015). Nanoencapsulados de extractos foliares de *Eucaliptus globulus* L sobre el clavo de la guayaba (*Psidium guajava* L) en cultivos comerciales del frutal en Boyacá. *ResearchGate*.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.13140/RG.2.2.36315.92962>
- Qiao, M., Li, J., Fang, L., Li, J. & Yu, Z. (2021). Morphology, Phylogeny and Pathogenicity of *Colletotrichum menglaense* sp. nov., Isolated from Air in China. *Pathogens*, 10(10), 1243. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101243>
- Quintero, A., Dagon-Bernier, F., & Páez-Redondo, A. (2019). Aislamientos endofíticos de *Colletotrichum* spp. a partir de hojas y ramas de mango (*Mangifera indica* L.) cultivar Azúcar en el municipio de Ciénaga, Magdalena, Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 43(166), 65. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.788>
- Ramírez, H., & Roca, W. (2000). *Introducción a la Biotecnología Vegetal* (Vicente Zapata, Ed.; 1ra ed.). https://www.academia.edu/11710955/Introducci%C3%B3n_a_la_Biotecnolog%C3%ADa_Vegetal
- Ramón, J., Agriculture, Ú.-T., & Canada, A.-F. (2011). The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, 50. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-9316
- Reina, J. (2017). *Fungosis en las paltas o aguacates (Persea americana L.) en los principales mercados de la ciudad de Cajamarca (Perú)*. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Ren, H. Y., Li, G., Qi, X. J., Fang, L., Wang, H. R., Wei, J. G., & Zhong, S. (2013). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing twig blight disease of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc) in China. *European Journal of Plant Pathology*, 137(3), 451–461. <https://doi.org/10.1007/s10658-013-0255-y>
- Rios, J., Quintero, J., Apodaca, M., Loredo, J., & Fierro, D. (2008). *Manual de prácticas de Micología*. Departamento de Parasitología Rama de Fitopatología. Universidad autónoma de Sinaloa. Escuela superior de agricultura del Valle del Fuerte.
- Ristaino, J. B., Madritch, M., Trout, C. L., & Parra, G. (1998). PCR amplification of ribosomal DNA for species identification in the plant pathogen genus *Phytophthora*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(3), 948–954. <https://doi.org/10.1128/aem.64.3.948-954.1998>

- Rodríguez-Gálvez, E., Hilário, S., Batista, E., Lopes, A., & Alves, A. (2021). *Lasiodiplodia* species associated with dieback of avocado in the coastal area of Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 161(1), 219–232. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02317-5>
- Romero, M. (2012). *Etiología, Epidemiología y Control del Chancro de los Quercus causado por Botryosphaeria spp* [Universidad de Córdoba]. www.uco.es/publicaciones
- Sandoval, E. (2022). *Monitoreo de conidias de Lasiodiplodia sp. en palto 'Hass' (Persea americana Mill.) En distintas zonas de la costa del Perú*. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Sandoval, M. C., Noelting, M. C. I. & Cristobal, E. H. (2008). *Colletotrichum gloesporioides*. primera notificación como agente causal de la muerte regresiva de *Rosmarinum officinalis* L en Buenos Aires, Argentina. In *Rev. Protección Veg* (Vol. 23, Issue 1).
- Sarkhosh, A., Schaffer, B., Vargas, A. I., Palmateer, A. J., Lopez, P. & Soleymani, A. (2018). In vitro evaluation of eight plant essential oils for controlling *Colletotrichum*, *Botryosphaeria*, *Fusarium* and *Phytophthora* fruit rots of avocado, mango and papaya. *Plant Protection Science*, 54(3), 153–162. <https://doi.org/10.17221/49/2017-PPS>
- Schoch, C. L., Shoemaker, R. A., Seifert, K. A., Hambleton, S., Spatafora, J. W. & Crous, P. W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98(6), 1041–1052. <https://doi.org/10.3852/mycologia.98.6.1041>
- SCRIBD. (2018). *Métodos de Extracción y Purificación de ADN*. <https://es.scribd.com/document/148656790/Metodos-de-Extraccion-y-Purificacion-de-ADN>
- Servicio de Sanidad Agraria del Perú. (2024, March 8). *Productores y SENASA oficializan inicio de campaña de exportación de palta*. <https://www.gob.pe/institucion/senasa/noticias/903792-productores-y-senasa-oficializan-inicio-de-campana-de-exportacion-de-palta>
- Servicio Nacional de Sanidad Agraria del Perú. (2019, May 10). *Senasa: Ayacucho exportó más de 5 mil toneladas de Palta Hass a China*. SENASA Contigo. <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/senasa-ayacucho-exporto-mas-de-5-mil-toneladas-de-palta-hass-a-china/>

- Silva-Rojas, H. V. & Ávila-Quezada, G. D. (2011). Phylogenetic and morphological identification of *Colletotrichum boninense*: A novel causal agent of anthracnose in avocado. *Plant Pathology*, 60(5), 899–908. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02452.x>
- Sinclair, W., Lyon, Howard & Johnson, W. (1987). Diseases of trees and shrubs. In *Diseases of trees and shrubs* (segunda edición).
- Slippers, B., Crous, P. W., Jami, F., Groenewald, J. Z. & Wingfield, M. J. (2017). Diversity in the Botryosphaeriales: Looking back, looking forward. *Fungal Biology*, 121(4), 307–321. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.02.002>
- Slippers, B. & Wingfield, M. J. (2007). Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact. In *Fungal Biology Reviews* (Vol. 21, Issues 2–3, pp. 90–106). <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2007.06.002>
- Tadey, S. (2023). *Control Químico y Biológico de Lasiodiplodia spp. causante de muerte regresiva en el cultivo de palto 'hass' (Persea americana Mill)*. Universidad Agraria La Molina .
- Tamay de Dios, Ibarra C & Velasquillo. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2, 70–78. <http://www.medigraphic.org.mx/>
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S. & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Tous, J. (2008). *Caracterización morfológica y molecular del hongo Colletotrichum spp agente causal de la antracnosis en Ñame (discórea spp) en los departamentos de Bolívar, Córdoba y Sucre*. Universidad de Sucre .
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. de J., Ulloa, O. A., Ramírez-Ramírez, O. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M. & Bautista Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19, 3953–3964. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>
- Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D. H., Adaskaveg, J. E. & Eskalen, A. (2013a). Identification and Pathogenicity of Fungal Pathogens Associated with Stem-End Rot of Avocado in California. *Plant Disease*, 97(12), 1580–1584. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0230-RE>

- Twizeyimana, M., Förster, H., McDonald, V., Wang, D. H., Adaskaveg, J. E. & Eskalen, A. (2013b). Identification and Pathogenicity of Fungal Pathogens associated with Stem-end rot of avocado in California. *Plant Disease*, 97(12), 1580–1584. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0230-RE>
- UNAH. (2014). *Aislamiento de hongos fitopatógenos*. Universidad Nacional Autónoma de Honduras.
- Váczy, K. Z., Németh, M. Z., Csikós, A., Kovács, G. M. & Kiss, L. (2018). *Dothiorella omnivora* isolated from grapevine with trunk disease symptoms in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 150(3), 817–824. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1323-5>
- Valdés, L. A., Calero Consuegra, D. L., Gómez, A., Carballo, M. E., Capote, M., González, I., Alvarez, J. M. & Rohde, W. (2017). Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* sp. produciendo antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). *La Granja*, 26(2), 38. <https://doi.org/10.17163/lgr.n26.2017.04>
- Valencia, A. (2019). *Factors that Predisposing to Persea americana Mill. to Infections of Botryosphaeriaceae Species in Central Zone of Chile*. Pontificia Universidad Católica de Chile .
- Valencia, A. L., Torres, R. & Latorre, B. A. (2011). First report of *Pestalotiopsis clavispora* and *Pestalotiopsis* spp. causing postharvest stem end rot of avocado in Chile. *Plant Disease*, 95(4), 492–492. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-10-0844>
- Valle-De la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Perales-Rosas, D., López-Martínez, V., Juárez-López, P., Martínez-Fernández, E., Hernández-Arenas, M., Ariza-Flores, R. & Gijón-Hernández, A. R. (2019). Distribucion, incidencia y severidad de la muerte descendente (*Lasiodiplodia* spp.) en Lima persa en Morelos, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-7>
- Vázquez, L., Carreira, M., Balsa, C. & Orengo, D. (2020). *16SPyPrimer: un paquete en python para el análisis de la cobertura de primers del gen 16S rRNA*. <http://hdl.handle.net/10609/120626>
- Ventura, J. A., Costa, H. & Tatagiba, J. da S. (2004). Papaya diseases and integrated control. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II* (pp. 201–268). Kluwer Academic Publishers. https://doi.org/10.1007/1-4020-2607-2_7

- Vicuña, A. (2023). *Caracterización de especies de Lasiodiplodia que afectan el cultivo de palto (Persea americana) en la costa peruana*. [Universidad Agraria La Molina]. <http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3158/MALMPR00T.pdf>
- Whiley, A., Schaffer, B. & Wolstenholme, B. (2002). *The Avocado: Botany Production and uses* (Segunda Edición).
- White, T., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. (1990). *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics*. <https://www.researchgate.net/publication/223397588>

ANEXOS

Anexo 1. *Colección de muestras con síntomas característicos en campo y selección de muestras aptas en el laboratorio.*



Nota. (*) A: Tizón de tallos y ramas, B: Árbol de palto evidenciando muerte regresiva. C-D: canchros con exudaciones blanquecinas, E. Heridas internas del tejido en ramas F: Síntomas de muerte en una rama e inflorescencia de un árbol adulto de palto, G: Heridas internas del tejido en tallos, H-I: Exudaciones de ramas y tallos.

Anexo 2. Protocolo de preparación de medio de cultivo PDA

Ingredientes:

- Papa Dextrosa Agar (PDA), 20gr por litro de agua
- Trozos de papa pelada, 250 gr por litro de agua
- Azúcar (dextrosa), 10 gr por litro de agua.
- Agua, 1000 ml.

Preparación:

Hervir la papa en 500 ml de agua por 30 minutos, mientras se derrite el agar en otros 500 ml; filtrar el caldo de papa con tamiz y gaza. Juntar las dos preparaciones, agregar y disolver la dextrosa, y reconstituir el agua hasta completar 1000 ml. Distribuir y esterilizar en autoclave.



Nota. (*) Elaboración del medio de cultivo PDA

Anexo 3. Procedimiento de aislamiento e identificación del patógeno.



Nota. (*) A: Muestras rotuladas con sus datos pasaporte, B: muestras seleccionadas para la realización del corte y siembra in vitro D: siembra de trozos de muestras de tallo con daños en placas Petri. E: Se colocó las muestras en estufa a 27°C, G: mediciones del largo y ancho de los conidios en Microscopio Accu-Scope, H: Caja con portaobjetos (muestras de estructuras del patógeno), I: hongo purificado, J: identificación por medio

Anexo 4. Procedimiento para realizar la prueba de patogenicidad.



Nota. (*) A: Platanos de Palto var. Hass sometidos a estrés por radiación solar, B-C: herida en el tallo del plantón utilizando un sacabocado estéril, D: Se insertó un disco de agar colonizado con micelio del hongo, E-F: Se cubrió con algodón húmedo esterilizado y se selló con Parafilm, G: plantones 5 días después de realizar la prueba de patogenicidad, H: raspado cortical con la ayuda de un bisturí y evaluación del avance del área necrótica

Anexo 5. Procedimiento para realizar extracción de ADN



Nota: (*) A: Raspado de micelio y puesta en tubos Eppendorf, B-C: Se añadió los reactivos según el protocolo D: Muestras en tubos Eppendorf, E: Centrifugación de muestras, F: se extrajo el sobrenadante del ADN G: Cuantificación de las muestras de ADN, H: Curva de la cuantificación, I: Foto del gel y observación de bandas ADN.

Anexo 6. Procedimiento para realizar PCR.



Nota: A: Puesta de materiales en cámara de flujo laminar con rayos UV, B: libreta de notas, C-D: muestra para la realización del PCR, E: Perfil térmico para realizar el PCR, F: servido del mix, G: ADN extraído de todas las accesiones, H: servido del mix de PCR.

Anexo 7. Mediciones de conidios de *Lasiodiplodia* spp.

N°	Largo	Ancho	N° septos	Pres. estrias longitudinales	Color de conidios	N° de células
1	28.71	15.00	1	si	Marrón oscuro	2
2	26.56	15.93	1	si	Marrón oscuro	2
3	24.70	16.49	1	si	Marrón oscuro	2
4	28.91	14.72	1	si	Marrón oscuro	2
5	25.48	16.57	1	si	Marrón oscuro	2
6	26.58	15.19	1	si	Marrón oscuro	2
7	27.81	15.52	1	si	Marrón oscuro	2
8	24.78	15.26	1	si	Marrón oscuro	2
9	27.52	16.06	1	si	Marrón oscuro	2
10	24.12	17.14	1	si	Marrón oscuro	2
11	29.47	14.20	1	si	Marrón oscuro	2
12	29.38	16.82	1	si	Marrón oscuro	2
13	26.33	12.78	1	si	Marrón oscuro	2
14	22.68	15.96	1	si	Marrón oscuro	2
15	27.75	15.64	1	si	Marrón oscuro	2
16	26.22	15.19	1	si	Marrón oscuro	2
17	26.75	17.38	1	si	Marrón oscuro	2
18	27.16	15.09	1	si	Marrón oscuro	2
19	24.95	14.69	1	si	Marrón oscuro	2
20	25.19	16.49	1	si	Marrón oscuro	2
21	27.85	15.93	1	si	Marrón oscuro	2
22	24.45	16.66	1	si	Marrón oscuro	2
23	24.09	15.69	1	si	Marrón oscuro	2
24	25.48	14.45	1	si	Marrón oscuro	2
25	25.18	15.72	1	si	Marrón oscuro	2
26	28.18	17.61	1	si	Marrón oscuro	2
27	26.82	15.02	1	si	Marrón oscuro	2
28	27.41	17.59	1	si	Marrón oscuro	2
29	26.69	15.83	1	si	Marrón oscuro	2
30	28.50	16.44	1	si	Marrón oscuro	2
31	29.30	18.28	1	si	Marrón oscuro	2
32	26.35	14.46	1	si	Marrón oscuro	2
33	30.17	15.75	1	si	Marrón oscuro	2
34	26.90	14.73	1	si	Marrón oscuro	2
35	27.49	16.02	1	si	Marrón oscuro	2
36	23.84	15.19	1	si	Marrón oscuro	2
37	26.31	16.65	1	si	Marrón oscuro	2
38	24.86	14.83	1	si	Marrón oscuro	2
39	27.47	14.62	1	si	Marrón oscuro	2
40	27.02	16.42	1	si	Marrón oscuro	2
41	29.14	16.65	1	si	Marrón oscuro	2
42	26.49	15.46	1	si	Marrón oscuro	2
43	27.67	15.26	1	si	Marrón oscuro	2
44	28.50	18.21	1	si	Marrón oscuro	2
45	28.65	18.95	1	si	Marrón oscuro	2
46	25.96	16.53	1	si	Marrón oscuro	2
47	26.93	15.34	1	si	Marrón oscuro	2
48	28.43	16.16	1	si	Marrón oscuro	2
49	27.93	17.08	1	si	Marrón oscuro	2
50	28.34	15.76	1	si	Marrón oscuro	2

N°	Largo	Ancho	N° septos	Pres. estrias longitudinales	color de conidios	N° de células
51	26.50	15.73	1	si	Marrón oscuro	2
52	27.99	16.01	1	si	Marrón oscuro	2
53	29.72	17.50	1	si	Marrón oscuro	2
54	28.20	18.69	1	si	Marrón oscuro	2
55	29.02	15.94	1	si	Marrón oscuro	2
56	28.71	17.82	1	si	Marrón oscuro	2
57	27.03	16.55	1	si	Marrón oscuro	2
58	27.18	15.23	1	si	Marrón oscuro	2
59	26.15	15.93	1	si	Marrón oscuro	2
60	25.11	17.55	1	si	Marrón oscuro	2
61	28.71	15.35	1	si	Marrón oscuro	2
62	29.20	14.81	1	si	Marrón oscuro	2
63	28.36	17.56	1	si	Marrón oscuro	2
64	28.75	16.28	1	si	Marrón oscuro	2
65	27.85	18.53	1	si	Marrón oscuro	2
66	28.40	16.27	1	si	Marrón oscuro	2
67	27.95	16.03	1	si	Marrón oscuro	2
68	25.95	15.51	1	si	Marrón oscuro	2
69	28.04	15.53	1	si	Marrón oscuro	2
70	25.44	14.29	1	si	Marrón oscuro	2
71	28.68	14.06	1	si	Marrón oscuro	2
72	29.02	14.62	1	si	Marrón oscuro	2
73	26.07	16.50	1	si	Marrón oscuro	2
74	25.31	15.30	1	si	Marrón oscuro	2
75	27.45	16.33	1	si	Marrón oscuro	2
76	27.88	16.66	1	si	Marrón oscuro	2
77	25.28	15.58	1	si	Marrón oscuro	2
78	27.06	16.36	1	si	Marrón oscuro	2
79	24.99	15.75	1	si	Marrón oscuro	2
80	26.64	19.54	1	si	Marrón oscuro	2
81	28.48	14.61	1	si	Marrón oscuro	2
82	26.75	16.81	1	si	Marrón oscuro	2
83	28.52	16.27	1	si	Marrón oscuro	2
84	29.36	16.52	1	si	Marrón oscuro	2
85	25.55	16.03	1	si	Marrón oscuro	2
86	28.74	15.59	1	si	Marrón oscuro	2
87	25.39	15.75	1	si	Marrón oscuro	2
88	24.64	15.63	1	si	Marrón oscuro	2
89	24.16	15.88	1	si	Marrón oscuro	2
90	23.95	15.35	1	si	Marrón oscuro	2
91	28.27	16.01	1	si	Marrón oscuro	2
92	25.52	15.27	1	si	Marrón oscuro	2
93	25.15	14.85	1	si	Marrón oscuro	2
94	27.36	15.93	1	si	Marrón oscuro	2
95	26.85	15.87	1	si	Marrón oscuro	2
96	28.89	16.13	1	si	Marrón oscuro	2
97	25.99	16.49	1	si	Marrón oscuro	2
98	28.16	14.85	1	si	Marrón oscuro	2
99	27.08	16.16	1	si	Marrón oscuro	2
100	29.83	18.38	1	si	Marrón oscuro	2
	27.05	16.02	1	si	Marrón oscuro	2

Tipo de micelio	Denso
Ratio de crecimiento	2.98 cm/día
Color de colonia	Gris olivo- Negro
Forma de la conidia	Elipsoidal
N° septos	1
Pres. estrías longitudinales	si
Color de conidia	Marrón oscuro
N° de células	2

	Picnidas
Formade la picnidia	Globosa
Color	Marrón oscuro
Largo	200.66
Ancho	156.36
Presencia de ostiolo en el ápice	No
Parafísas	No
Color de conidióforo	Hialino
Conidióforos	Hialino

Anexo 8. Mediciones de conidios de Dotiorella spp.

Tipo de micelio	Denso
Ratio de crecimiento	2.29cm/día
Color de colonia	Gris oliváceo pálido a negro oliváceo
Forma de la conidia	Oblonga a elíptica
N° de Septos	1
Pres. estrías longitudinales	No
Color de conidia	Marrón oscuro
N°de Células	2

	Picnidas
Forma de la picnidia	Globosa
Color	Marrón oscuro
Largo	172.02
ancho	131.15
Presencia de ostiolo en el ápice	si
Parafísas	si
Color de Conidióforo	Hialino

Mediciones de conidios de *Dotiorella* spp.

N°	Largo	Ancho	Color de conidia	N° de septas	N° de Células	Pres. estrías longitudinales
1	24.46	9.13	Márron oscuro	1	2	No
2	24.92	10.09	Márron oscuro	1	2	No
3	25.75	9.77	Márron oscuro	1	2	No
4	28.64	10.34	Márron oscuro	1	2	No
5	22.33	9.37	Márron oscuro	1	2	No
6	23.34	9.42	Márron oscuro	1	2	No
7	21.11	7.80	Márron oscuro	1	2	No
8	24.04	9.12	Márron oscuro	1	2	No
9	24.37	9.15	Márron oscuro	1	2	No
10	24.52	9.78	Márron oscuro	1	2	No
11	24.22	9.50	Márron oscuro	1	2	No
12	22.57	8.60	Márron oscuro	1	2	No
13	25.30	9.29	Márron oscuro	1	2	No
14	22.87	8.63	Márron oscuro	1	2	No
15	23.43	9.44	Márron oscuro	1	2	No
16	21.51	8.20	Márron oscuro	1	2	No
17	23.07	8.24	Márron oscuro	1	2	No
18	20.92	8.01	Márron oscuro	1	2	No
19	24.93	9.14	Márron oscuro	1	2	No
20	21.52	8.49	Márron oscuro	1	2	No
21	22.37	8.65	Márron oscuro	1	2	No
22	24.32	9.01	Márron oscuro	1	2	No
23	22.39	8.33	Márron oscuro	1	2	No
24	22.45	7.76	Márron oscuro	1	2	No
25	21.19	8.98	Márron oscuro	1	2	No
26	22.52	7.70	Márron oscuro	1	2	No
27	23.25	9.30	Márron oscuro	1	2	No
28	21.25	7.70	Márron oscuro	1	2	No
29	19.11	8.52	Márron oscuro	1	2	No
30	20.40	8.11	Márron oscuro	1	2	No
31	23.37	8.02	Márron oscuro	1	2	No
32	21.88	7.50	Márron oscuro	1	2	No
33	22.99	8.29	Márron oscuro	1	2	No
34	23.36	8.96	Márron oscuro	1	2	No
35	22.55	8.24	Márron oscuro	1	2	No
36	23.88	8.39	Márron oscuro	1	2	No
37	22.30	7.84	Márron oscuro	1	2	No
38	19.26	8.44	Márron oscuro	1	2	No
39	23.08	8.17	Márron oscuro	1	2	No
40	23.64	8.45	Márron oscuro	1	2	No
41	23.59	8.81	Márron oscuro	1	2	No
42	23.66	8.52	Márron oscuro	1	2	No
43	23.78	8.49	Márron oscuro	1	2	No
44	20.47	7.59	Márron oscuro	1	2	No
45	20.96	8.51	Márron oscuro	1	2	No
46	21.48	8.65	Márron oscuro	1	2	No
47	22.61	8.21	Márron oscuro	1	2	No
48	21.83	9.14	Márron oscuro	1	2	No
49	23.69	8.11	Márron oscuro	1	2	No
50	23.26	8.68	Márron oscuro	1	2	No

N°	Largo	Ancho	Color de conidia	N° de septas	N° de Células	Pres. estrías longitudinales
51	22.45	8.34	Márron oscuro	1	2	No
52	21.36	8.68	Márron oscuro	1	2	No
53	22.84	7.61	Márron oscuro	1	2	No
54	22.63	8.28	Márron oscuro	1	2	No
55	21.87	8.99	Márron oscuro	1	2	No
56	21.30	9.12	Márron oscuro	1	2	No
57	22.69	7.60	Márron oscuro	1	2	No
58	23.37	8.96	Márron oscuro	1	2	No
59	22.88	8.84	Márron oscuro	1	2	No
60	21.72	7.87	Márron oscuro	1	2	No
61	22.55	7.75	Márron oscuro	1	2	No
62	21.47	8.06	Márron oscuro	1	2	No
63	23.01	8.43	Márron oscuro	1	2	No
64	22.26	7.88	Márron oscuro	1	2	No
65	21.12	8.02	Márron oscuro	1	2	No
66	19.23	7.84	Márron oscuro	1	2	No
67	22.85	7.78	Márron oscuro	1	2	No
68	21.90	8.65	Márron oscuro	1	2	No
69	22.23	9.58	Márron oscuro	1	2	No
70	21.23	9.08	Márron oscuro	1	2	No
71	19.26	6.69	Márron oscuro	1	2	No
72	22.33	8.18	Márron oscuro	1	2	No
73	24.05	8.31	Márron oscuro	1	2	No
74	22.33	8.00	Márron oscuro	1	2	No
75	23.86	8.25	Márron oscuro	1	2	No
76	23.05	8.76	Márron oscuro	1	2	No
77	20.98	7.69	Márron oscuro	1	2	No
78	23.19	7.20	Márron oscuro	1	2	No
79	22.72	8.27	Márron oscuro	1	2	No
80	22.04	8.22	Márron oscuro	1	2	No
81	21.53	7.39	Márron oscuro	1	2	No
82	21.50	9.42	Márron oscuro	1	2	No
83	24.13	8.90	Márron oscuro	1	2	No
84	21.24	8.78	Márron oscuro	1	2	No
85	22.09	8.22	Márron oscuro	1	2	No
86	22.88	7.56	Márron oscuro	1	2	No
87	23.16	8.45	Márron oscuro	1	2	No
88	21.36	7.45	Márron oscuro	1	2	No
89	22.00	8.08	Márron oscuro	1	2	No
90	22.74	8.43	Márron oscuro	1	2	No
91	20.78	8.23	Márron oscuro	1	2	No
92	21.38	8.47	Márron oscuro	1	2	No
93	21.59	8.14	Márron oscuro	1	2	No
94	21.31	7.61	Márron oscuro	1	2	No
95	20.95	8.72	Márron oscuro	1	2	No
96	22.45	8.21	Márron oscuro	1	2	No
97	20.44	8.33	Márron oscuro	1	2	No
98	22.57	8.70	Márron oscuro	1	2	No
99	23.36	8.40	Márron oscuro	1	2	No
100	22.34	8.55	Márron oscuro	1	2	No
$\bar{x}$	22.49	8.46	Márron oscuro	1	2	No

Anexo 9. *Mediciones de conidios de Colletotrichum spp.*

N°	Largo	Ancho	Color de conidia	N° de células
1	14.58	4.34	Hialino	Unicelular
2	13.11	4.2	Hialino	Unicelular
3	14.33	4.62	Hialino	Unicelular
4	15.04	4.62	Hialino	Unicelular
5	14.21	4.33	Hialino	Unicelular
6	14.42	5.03	Hialino	Unicelular
7	14.87	4.46	Hialino	Unicelular
8	13.99	4.51	Hialino	Unicelular
9	15.05	4.46	Hialino	Unicelular
10	14.94	4.17	Hialino	Unicelular
11	13.91	4.65	Hialino	Unicelular
12	16.25	4.42	Hialino	Unicelular
13	14.45	4.72	Hialino	Unicelular
14	15.43	4.34	Hialino	Unicelular
15	13.55	5.06	Hialino	Unicelular
16	15.15	4.31	Hialino	Unicelular
17	14.09	5.05	Hialino	Unicelular
18	15.62	4.16	Hialino	Unicelular
19	14.45	3.95	Hialino	Unicelular
20	15.67	4.17	Hialino	Unicelular
21	14.61	4.12	Hialino	Unicelular
22	14.84	4.45	Hialino	Unicelular
23	14.89	4.57	Hialino	Unicelular
24	16.39	3.74	Hialino	Unicelular
25	13.89	4.08	Hialino	Unicelular
26	13.72	4.16	Hialino	Unicelular
27	14.6	4.02	Hialino	Unicelular
28	16.36	4.59	Hialino	Unicelular
29	13.88	4.31	Hialino	Unicelular
30	15.01	4.34	Hialino	Unicelular
31	15.14	4.79	Hialino	Unicelular
32	15.08	4.13	Hialino	Unicelular
33	14.71	4.91	Hialino	Unicelular
34	14.54	4.16	Hialino	Unicelular
35	16.18	4.08	Hialino	Unicelular
36	13.46	4.51	Hialino	Unicelular
37	13.16	4.79	Hialino	Unicelular
38	13.38	4.02	Hialino	Unicelular
39	14.77	5.05	Hialino	Unicelular
40	15.19	4.75	Hialino	Unicelular
41	15.48	4.34	Hialino	Unicelular
42	15.75	4.41	Hialino	Unicelular
43	16.25	4.76	Hialino	Unicelular
44	16.02	4.56	Hialino	Unicelular
45	14.58	4.65	Hialino	Unicelular
46	16.32	4.78	Hialino	Unicelular
47	14.31	4.49	Hialino	Unicelular
48	44.97	4.78	Hialino	Unicelular
49	15.75	4.45	Hialino	Unicelular
50	14.28	4.66	Hialino	Unicelular

N°	Largo	Ancho	Color de conidia	N° de células
51	14.37	4.26	Hialino	Unicelular
52	16.07	4.62	Hialino	Unicelular
53	14.6	4.78	Hialino	Unicelular
54	15	4.21	Hialino	Unicelular
55	14.07	4.52	Hialino	Unicelular
56	15.79	3.87	Hialino	Unicelular
57	15.45	4.78	Hialino	Unicelular
58	14.8	5.01	Hialino	Unicelular
59	14.47	4.1	Hialino	Unicelular
60	14.87	4.59	Hialino	Unicelular
61	15.7	4.65	Hialino	Unicelular
62	13.27	4.16	Hialino	Unicelular
63	15.73	4.05	Hialino	Unicelular
64	13.25	4.1	Hialino	Unicelular
65	14.68	3.7	Hialino	Unicelular
66	14.06	4.1	Hialino	Unicelular
67	14.43	4.35	Hialino	Unicelular
68	13.81	4.44	Hialino	Unicelular
69	13.72	4.35	Hialino	Unicelular
70	13.72	4.26	Hialino	Unicelular
71	15.58	3.52	Hialino	Unicelular
72	13.56	9.69	Hialino	Unicelular
73	13.72	4.27	Hialino	Unicelular
74	13.26	4.11	Hialino	Unicelular
75	13.76	4.45	Hialino	Unicelular
76	14.81	4.18	Hialino	Unicelular
77	14.61	3.51	Hialino	Unicelular
78	14.46	4.2	Hialino	Unicelular
79	15.9	4.02	Hialino	Unicelular
80	13.62	3.88	Hialino	Unicelular
81	13.84	4.56	Hialino	Unicelular
82	12.98	4.53	Hialino	Unicelular
83	14.05	4.01	Hialino	Unicelular
84	15.75	3.64	Hialino	Unicelular
85	14.63	3.84	Hialino	Unicelular
86	15.25	4.23	Hialino	Unicelular
87	15.73	4.16	Hialino	Unicelular
88	15.78	4.01	Hialino	Unicelular
89	15.02	4.16	Hialino	Unicelular
90	13.18	4.05	Hialino	Unicelular
91	14.83	3.65	Hialino	Unicelular
92	14.1	3.64	Hialino	Unicelular
93	14.13	4.08	Hialino	Unicelular
94	15.09	3.95	Hialino	Unicelular
95	12.84	4.39	Hialino	Unicelular
96	15.18	3.99	Hialino	Unicelular
97	15.74	4.05	Hialino	Unicelular
98	13.46	4.05	Hialino	Unicelular
99	12.51	3.69	Hialino	Unicelular
100	15.05	3.23	Hialino	Unicelular
$\bar{x}$	14.95	4.36	Hialino	Unicelular

Anexo 10. Mediciones de conidios de la Cepa 1: *Fusarium* spp.

N°	Largo	Ancho	N° Septos
1	38.21	4.98	4
2	39.07	5.01	4
3	41.5	4.56	4
4	41.41	4.8	4
5	43.45	5.19	4
6	49.51	5.19	4
7	40.81	5.11	4
8	49.51	4.41	4
9	46.82	4.82	4
10	44.14	5.16	4
11	42.82	5.34	4
12	43.47	4.85	4
13	43.59	5.47	4
14	42.41	5.39	3
15	34.37	4.98	3
16	35.85	4.94	4
17	40	4.96	4
18	47.91	4.36	4
19	45.05	5.37	4
20	48.07	4.91	3
21	41.03	4.91	4
22	44.37	4.8	4
23	44.8	5.05	4
24	28.31	5.67	4
25	36.64	4.98	4
26	42.81	5.43	3
27	37.3	5.25	4
28	33.85	4.79	4
29	43.46	5.11	3
30	33.71	4.79	3
31	44.51	5.32	4
32	45.34	4.96	4
33	34.54	5.73	4
34	36.76	5.15	4
35	42.92	5.01	3
36	28	5.4	4
37	45.74	5.01	4
38	36.15	5.37	4
39	43.11	4.77	3
40	36.36	5.13	4
41	37.12	4.2	4
42	44.32	6.64	4
43	43.28	5.14	4
44	42.75	5.5	3
45	43.45	4.75	4
46	45.23	4.49	4
47	30.86	4.41	4
48	44.3	5.44	4
49	45.96	5.23	4
50	35.58	4.96	4

N°	Largo	Ancho	N° Septos
51	43.24	4.96	4
52	36.54	5.06	4
53	44.17	4.76	4
54	42.32	5.01	4
55	41.04	4.57	4
56	34.73	5.16	4
57	41.07	4.8	3
58	37.16	6.04	4
59	41.77	5.16	4
60	38.4	5.12	4
61	43.13	4.76	4
62	43.98	4.62	4
63	45.82	5.77	4
64	39.43	5.5	3
65	31.82	5.37	3
66	42.54	5.11	4
67	38.52	4.69	4
68	38.8	4.69	4
69	41.83	5.05	4
70	41.71	4.79	3
71	41.79	5.47	4
72	41.93	7.04	4
73	43.35	5.08	4
74	39.3	4.2	4
75	39.81	4.66	3
76	40.97	5.09	3
77	35.99	4.82	3
78	33.74	5.49	4
79	45.48	4.98	4
80	42.71	4.56	4
81	43.01	5.28	4
82	44.4	5.05	4
83	44.78	5.05	4
84	40.21	5.34	4
85	46.2	4.65	4
86	36.4	5.23	3
87	44.89	5.12	4
88	40.33	4.57	4
89	35.25	4.59	4
90	37.64	4.62	4
91	36.77	5.3	3
92	41.16	4.58	4
93	47.55	4.62	4
94	38.52	4.9	4
95	45.02	5.72	4
96	43.81	5.11	4
97	45.78	5.73	4
98	46.56	5.73	4
99	41.06	5.07	4
100	47.39	4.96	4
$\bar{x}$	41.10	5.07	3.8

Anexo 11. Mediciones de conidios de la Cepa 2. *Fusarium* spp.

N°	Largo	Ancho	N° Septos
1	39.87	4.66	5
2	34.29	4.53	4
3	44.35	5.73	5
4	41.05	4.49	4
5	36.93	4	4
6	39.64	4.74	5
7	37.97	4.8	4
8	39.42	4.41	5
9	37.97	4.57	4
10	37.97	4.41	4
11	38.32	5.08	4
12	35.43	4.21	4
13	34.43	4.9	5
14	41.1	4.56	4
15	42.32	3.91	5
16	42.09	5.25	4
17	41.05	3.52	5
18	29.04	4.41	4
19	43.67	4.74	4
20	41.18	4.41	4
21	33.21	4.62	4
22	42.58	4.51	4
23	44.73	4.34	5
24	45.7	4.41	5
25	43.83	4.41	5
26	50.44	3.49	5
27	46.9	4.9	5
28	36.35	3.76	5
29	37.65	5.11	4
30	39.12	4.44	5
31	31.45	4.41	5
32	49.28	4.41	5
33	45.12	4.9	5
34	48.56	3.67	5
35	38.89	3.64	5
36	43.58	4.56	5
37	38.44	4.39	5
38	52.04	5.4	5
39	39.55	4.31	5
40	54.25	5.03	6
41	51.62	5.25	6
42	39.4	4.1	5
43	42.7	4.05	5
44	38.61	4.39	5
45	41.5	4.26	5
46	44	4.02	5
47	43.87	3.54	4
48	40.26	3.35	5
49	46.75	3.44	5
50	36.16	4.08	4

N°	Largo	Ancho	N° Septos
51	36.57	3.99	5
52	48.03	4.47	5
53	49.2	4.71	5
54	47	3.44	5
55	41.49	3.87	5
56	42.87	4.02	4
57	56.05	3.76	5
58	48.04	3.76	5
59	63.82	3.36	7
60	48.13	3.94	5
61	37.35	3.87	4
62	29.41	4.1	4
63	41.79	4.26	4
64	34.08	4.61	4
65	33.18	3.19	4
66	42.34	4.58	4
67	42.41	4.44	5
68	37.76	3.67	5
69	38.13	4.03	5
70	33.73	3.12	4
71	43.21	3.47	5
72	39.62	3.87	5
73	42.95	4.17	5
74	39.15	4.27	5
75	31.94	3.9	5
76	34.36	4.05	5
77	44.32	3.29	5
78	36.49	4.41	5
79	44.32	3.29	5
80	36.49	4.41	5
81	44.32	3.29	5
82	36.49	4.41	5
83	37.62	4.26	5
84	56.62	5.43	5
85	42.61	4.56	5
86	38.41	4.1	4
87	39.27	4.2	5
88	38.57	4.78	4
89	35.84	3.59	4
90	39.09	3.19	5
91	32.26	3.19	4
92	34.24	3.19	5
93	32.31	2.89	3
94	57.13	3.66	5
95	36.28	3.66	5
96	24.17	3.6	5
97	57.31	3.91	5
98	49.23	2.94	5
99	41.44	4.06	4
100	48.18	4	5
$\bar{x}$	41.30	4.16	4.7

Anexo 12. Mediciones de conidios de *Pestalotopsis* spp.

N°	N° de células	N° de septos	Coloración de células medias	Largo	Ancho	N° de ornament. apicales	N° de ornament. basales	Forma de la conidia	Medida de ornamentación basal	Medida de ornamentación apical			
										1	2	3	4
1	5	4	versicolor	26.44	5.77	1	3	curvado	4.71	15.69	9.12	11.29	
2	5	4	versicolor	27.18	6.12	1	3	recto	3.93	13.11	19.3	11.94	
3	5	4	versicolor	27.75	6.41	1	3	recto	3.85	17.42	14.26	10.71	
4	5	4	versicolor	27.51	5.88	1	3	recto	5.01	15.72	15.38	14.7	
5	5	4	versicolor	29.04	5.30	1	3	recto	4.13	14.54	7.72	13.02	
6	5	4	versicolor	25.39	5.48	1	3	recto	5.14	20.74	13.94	15.29	
7	5	4	versicolor	25.91	6.02	1	3	recto	4.65	18.68	11.72	13.43	
8	5	4	versicolor	29.53	6.04	1	2	curvado	4.96	14.98	17.7		
9	5	4	versicolor	25.04	5.67	1	3	recto	4.85	20.31	15.67	15.18	
10	5	4	versicolor	29.53	5.56	1	3	recto	3.76	14.87	7.51	11.77	
11	5	4	versicolor	25.29	5.88	1	3	curvado	5.77	16.1	13.33	6.71	
12	5	4	versicolor	25.97	6.39	1	2	curvado	5.83	15.19	12		
13	5	4	versicolor	29.61	5.67	1	3	recto	4.51	15.77	14.99	13.11	
14	5	4	concoloro	25.55	6.96	1	3	recto	3.99	10.55	13.08	16.84	
15	5	4	versicolor	29.28	5.92	1	3	recto	7.44	16.78	14.46	7.02	
16	5	4	versicolor	27.03	5.87	1	3	recto	3.47	12.47	19.49	11.89	
17	5	4	versicolor	26.29	6.20	1	3	recto	4.69	16.54	20.73	12.99	
18	5	4	versicolor	26.72	6.07	1	2	curvo	7.97	22.57	17.76		
19	5	4	versicolor	26.07	6.12	1	2	recto	5.39	19	15.47		
20	5	4	versicolor	26.39	6.61	1	2	curvado	5.31	15.65	13.27		
21	5	4	versicolor	27.63	5.56	1	3	curvado	5.26	17.27	16.39	16.55	
22	5	4	versicolor	26.30	6.39	1	3	curvado	4.62	16.83	14.15	7.78	
23	5	4	versicolor	27.63	5.60	1	3	curvado	3.67	12.84	16.71	13.69	
24	5	4	versicolor	26.19	5.84	1	2	curvado	4.51	15.66	11.76		
25	5	4	versicolor	28.75	5.96	1	3	curvado	3.30	13.68	16.43	12.66	
26	5	4	versicolor	25.77	5.48	1	3	curvado	4.83	10.99	15.25	9.97	
27	5	4	versicolor	25.38	5.22	1	2	curvado	5.97	14.09	17.44		
28	5	4	versicolor	25.04	5.73	1	3	recto	6.79	18.33	15.94	14.37	
29	5	4	versicolor	36.57	6.23	1	2	curvado	5.88	13.8	20.86		
30	5	4	versicolor	22.28	6.69	1	3	curvado	4.97	14.62	13.55	17.22	
31	5	4	versicolor	27.37	5.73	1	3	curvado	5.32	16.61	14.05	13.17	
32	5	4	versicolor	25.78	5.54	1	2	curvado	3.65	14.71	26.14		
33	5	4	versicolor	28.13	6.71	1	3	recto	4.31	11.67	13.28	13.67	
34	5	4	versicolor	28.96	5.39	1	2	recto	3.9	21.29	19.46		
35	5	4	versicolor	29.04	5.84	1	3	curvado	6.47	15.46	12.97	12.34	
36	5	4	versicolor	30.68	6.07	1	3	curvado	2.93	14.4	15.04	12.96	
37	5	4	versicolor	30.09	5.88	1	3	curvado	5.81	18.98	13.91	14.1	
38	5	4	versicolor	27.64	5.62	1	3	recto	4.26	20.21	12.98	16.37	
39	5	4	versicolor	27.92	5.98	1	3	recto	4.82	16.59	20.57	19.08	
40	5	4	versicolor	29.40	6.04	1	3	recto	6.13	13.32	19.31	17.26	
41	5	4	versicolor	24.47	6.39	1	2	curvado	6.77	21.84	18.85		
42	5	4	versicolor	27.33	6.43	1	3	curvado	6.02	18.94	15.06	14.79	
43	5	4	versicolor	29.16	6.21	1	2	curvado	5.39	21.08	18.25		
44	5	4	versicolor	26.92	5.49	1	3	curvado	5.01	13.32	17.58	11.74	
45	5	4	versicolor	27.74	6.20	1	3	curvado	4.98	16.2	15.67	16	
46	5	4	versicolor	26.06	5.39	1	2	recto	4.27	21.5	13.58		
47	5	4	versicolor	27.47	6.23	1	3	recto	4.24	15.74	14.14	13.28	
48	5	4	versicolor	28.88	5.84	1	3	curvado	4.04	19.8	13.9	17.49	
49	5	4	concoloro	26.62	5.80	1	2	recto	5.82	8.76	18.15		
50	5	4	versicolor	29.04	5.68	1	3	recto	2.99	14.64	18.32	11.27	

N°	N° de células	N° de septos	Coloracion de células medias	Largo	Ancho	N° de ornament. apicales	N° de ornament. basales	Forma de la conidia	Medida de ornamentación basal	Medida de ornamentacion apical			
										1	2	3	4
51	5	4	versicolor	29.27	5.20	1	3	curvado	5.94	16.71	19.44	13.28	
52	5	4	versicolor	27.30	6.02	1	2	recto	5.82	22.12	17.52		
53	5	4	versicolor	28.68	6.40	1	3	curvado	5.40	17.06	13.72	19.67	
54	5	4	versicolor	27.81	6.07	1	3	recto	4.20	14.49	14.19	17.34	17.27
55	5	4	versicolor	25.00	6.30	1	3	curvo	5.5	18.18	13.74	13.87	
56	5	4	versicolor	31.77	5.88	1	3	recto	5.78	15.55	15.01	14.54	
57	5	4	versicolor	26.48	5.88	1	3	recto	6.94	15.49	18.24	16.38	
58	5	4	versicolor	26.56	5.94	1	3	curvo	5.48	17.50	11.30	15.25	
59	5	4	versicolor	26.69	5.42	1	2	recto	3.47	19.61	13.42		
60	5	4	versicolor	26.82	6.22	1	3	curvado	5.55	9.36	14.25	15.45	
61	5	4	versicolor	27.88	5.59	1	3	curvado	5.07	14.49	14.63	15.65	
62	5	4	versicolor	29.41	5.43	1	3	curvado	5.3	12.40	11.15	18.19	
63	5	4	versicolor	28.16	5.98	1	3	recto	5.05	16.13	16.15	18.21	
64	5	4	versicolor	29.16	6.22	1	3	recto	3.39	12.03	10.96	9.98	
65	5	4	versicolor	27.57	5.67	1	3	curvado	4.75	13.87	12.63	13.49	
66	5	4	versicolor	29.55	6.10	1	3	recto	3.39	11.66	10.69	14.26	
67	5	4	versicolor	27.87	6.08	1	3	curvado	4.54	11.11	14.44	13.19	
68	5	4	versicolor	25.16	5.91	1	3	recto	5.70	15.68	15.71	14.17	
69	5	4	versicolor	28.57	5.77	1	2	tecto	4.45	20.78	15.78		
70	5	4	versicolor	31.72	5.73	1	3	curvado	8.30	13.62	14.09	12.75	
71	5	4	versicolor	29.30	5.59	1	3	recto	5.52	14.86	17.41	12.02	
72	5	4	versicolor	27.40	5.91	1	3	curvado	4.93	16.43	13.59	15.63	
73	5	4	versicolor	28.09	5.80	1	2	curvado	6.58	17.05	16.21		
74	5	4	versicolor	25.80	6.02	1	3	recto	6.17	10.62	16.97	10.22	
75	5	4	versicolor	26.83	6.23	1	3	recto	5.19	7.84	19.87	14.93	
76	5	4	versicolor	26.18	5.56	1	3	curvado	5.02	16.48	14.08	17.31	
77	5	4	versicolor	30.75	4.96	1	3	curvado	4.08	14.94	14.74	13.53	
78	5	4	versicolor	29.98	5.82	1	3	curvado	4.98	17.2	13.24	10.64	
79	5	4	versicolor	27.94	6.22	1	3	curvado	5.12	16.01	15.67	12.76	
80	5	4	versicolor	26.31	6.29	1	3	recto	4.58	17.57	13.02	65.3	
81	5	4	versicolor	27.01	6.09	1	2	recto	5.17	15	17.29		
82	5	4	versicolor	27.04	5.49	1	3	curvado	4.01	8.95	17.75	12.6	
83	5	4	versicolor	24.52	6.12	1	3	recto	4.56	13.11	12.34	12.26	
84	5	4	versicolor	23.84	5.70	1	2	recto	3.67	15.84	20.86		
85	5	4	concoloro	29.06	5.42	1	3	curvado	4.74	14.84	15.5	11.92	
86	5	4	versicolor	28.13	5.62	1	2	curvado	5.77	16.79	11.93		
87	5	4	versicolor	26.59	6.19	1	3	curvado	5.44	19.52	15.22	12.04	
88	5	4	versicolor	28.82	5.50	1	3	curvado	5.30	17.4	13.35	16.76	
89	5	4	versicolor	25.17	6.10	1	2	recto	8.40	15.89	18.62		
90	5	4	versicolor	28.3	5.90	1	3	recto	5.15	8.65	16.13	18.35	
91	5	4	versicolor	24.6	6.05	1	3	curvado	6.69	15.16	15.49	13.71	
92	5	4	versicolor	29.08	5.88	1	3	curvado	4.91	20.00	13.30	11.86	
93	5	4	versicolor	28.10	5.05	1	3	curvado	3.10	17.57	18.25	15.19	
94	5	4	versicolor	26.28	6.00	1	3	curvado	4.91	16.97	14.45	18.45	
95	5	4	versicolor	26.30	6.30	1	3	curvado	5.29	13.95	13.81	19.55	
96	5	4	versicolor	28.19	5.44	1	3	recto	4.85	17.78	16.62	11.46	
97	5	4	versicolor	26.48	5.84	1	3	recto	2.74	14.12	16.20	16.00	
98	5	4	versicolor	28.71	5.47	1	3	recto	4.68	13.60	17.85	15.76	
99	5	4	versicolor	27.43	5.56	1	2	curvado	4.66	15.63	19.58		
100	5	4	versicolor	25.60	5.73	1	3	curvado	4.85	14.98	15.12	17.02	
	5	4	versicolor	27.51	5.8876	1	2.77		5.01	15.58	15.25	14.56	11.27

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS
Bach. CIYNTHIA ISABEL BAUTISTA PRADO

R.D. N° 233-2024-UNSCH-FCA-D

En la ciudad de Ayacucho a los cinco días del mes de setiembre del año dos mil veinticuatro, siendo las dieciocho horas, se reunieron en el auditorio de la Facultad de Ciencias Agrarias, bajo la presidencia del Dr. Felipe Escobar Ramírez Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias; los miembros del jurado conformado por Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva, Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa como asesor, M.Sc. Francisco Condeña Almora y el M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla; actuando como secretario de actas el Mtro. Rodolfo Alca Mendoza, para recibir la sustentación de la Tesis titulado: **Caracterización morfológica y pre-molecular de genes ITS (ADN ribosomal) para la identificación de géneros de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho**, para obtener el Título Profesional de Ingeniera Agrónoma presentado por la Bachiller **CIYNTHIA ISABEL BAUTISTA PRADO**.

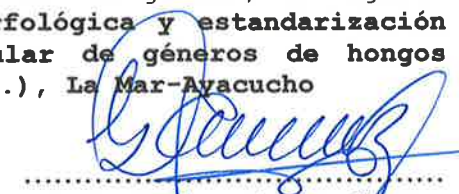
El señor Decano, previa verificación de los documentos exigidos solicitó se proceda con la sustentación y posterior defensa de la tesis en un periodo de cuarenta y cinco minutos de acuerdo al reglamento de grados y títulos vigente. Terminado la exposición, los miembros del Jurado, formularon sus preguntas, aclaraciones y/o observaciones correspondientes. Luego se invito a los miembros del jurado pasar a otra aula para la deliberación y calificación del trabajo de tesis, teniendo el siguiente resultado:

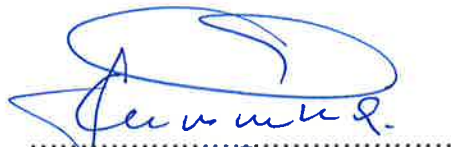
Jurado evaluador	Exposición	Respuestas a las preguntas	Generación de conocimiento	Promedio
Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva	16	14	17	16
Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa	18	18	19	18
M.Sc. Francisco Condeña Almora	18	18	18	18
M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla	18	18	18	18
PROMEDIO GENERAL				18

Acto seguido se invita a la sustentante y publico en general para dar a conocer el resultado final. Firman el acta.

OBSERVACION: Por acuerdo unánime de los miembros del jurado, se sugiere que el titulo debe ser: **Caracterización morfológica y estandarización de protocolo para la identificación molecular de géneros de hongos fitopatógenos en palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho**


.....
Ph.D. Nery Luz Santillana Villanueva
Presidente


.....
Ph.D. Germán Fernando De La Cruz Lapa
Asesor


.....
M.Sc. Francisco Condeña Almora
Jurado


.....
M.Sc. Angela Juana Requis Quintanilla
Jurado


.....
Mtro. Rodolfo Alca Mendoza
Secretario Docente



UNSCH

FACULTAD DE CIENCIAS
AGRARIAS

CONSTANCIA DE CONTROL DE ORIGINALIDAD DE TRABAJO DE TESIS

El que suscribe coordinador responsable de la valoración y verificación de originalidad de los trabajos de investigación y de tesis de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, designado mediante la RCF N° 005-2024-UNSCH-FCA-CF; hace constar que el trabajo de tesis titulado;

Caracterización morfológica y estandarización de protocolo para la identificación molecular de géneros de hongos fitopatógenos en palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho

Autor : Ciynthia Isabel Bautista Prado
Asesor : Germán F. De La Cruz Lapa

Ha sido sometido al control de originalidad mediante el software TURNITIN UNSCH, acorde al Reglamento de originalidad de trabajos de investigación, aprobado mediante RCU N° 039-2021-UNSCH-CU, y RCU N° 1530-2023-UNSCH-CU, emitiendo un resultado de **diecinueve (19 %)** de índice de similitud, realizado con **depósito de trabajos estándar**.

En consecuencia, se otorga la presente Constancia de Originalidad para los fines pertinentes.

Nota: Se adjunta el resultado con Identificador de la entrega: 2466287782

Ayacucho, 26 de setiembre de 2024

UNIVERSIDAD NACIONAL DE
SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
Facultad de Ciencias Agrarias

Dr. Yuri Gálvez Gastelú
Coordinador de Control de originalidad de
trabajo de investigación y tesis

Caracterización morfológica y estandarización de protocolo para la identificación molecular de géneros de hongos fitopatógenos en palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho

por Ciynthia Isabel Bautista Prado

Fecha de entrega: 26-sep-2024 10:47a.m. (UTC-0500)

Identificador de la entrega: 2466287782

Nombre del archivo: TESIS_CORREGIDA_I.docx (45.17M)

Total de palabras: 24462

Total de caracteres: 136364

Caracterización morfológica y estandarización de protocolo para la identificación molecular de géneros de hongos fitopatógenos en palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho

INFORME DE ORIGINALIDAD

19%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

3%

PUBLICACIONES

6%

TRABAJOS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	hdl.handle.net	2%
Fuente de Internet		

2	repositorio.unsch.edu.pe	2%
Fuente de Internet		

3	Submitted to Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga	2%
Trabajo del estudiante		

4	repositorio.lamolina.edu.pe	1%
Fuente de Internet		

5	repositorio.cucba.udg.mx:8080	1%
Fuente de Internet		

6	aprenderly.com	1%
Fuente de Internet		

7	eprints.uanl.mx	1%
Fuente de Internet		

8	cdn.www.gob.pe Fuente de Internet	1 %
9	dspace.esPOCH.edu.ec Fuente de Internet	1 %
10	www.icia.es Fuente de Internet	1 %
11	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	1 %
12	idoc.pub Fuente de Internet	<1 %
13	docplayer.es Fuente de Internet	<1 %
14	dia.chapingo.mx Fuente de Internet	<1 %
15	apsjournals.apsnet.org Fuente de Internet	<1 %
16	repositorio.unp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
17	core.ac.uk Fuente de Internet	<1 %
18	www.scielo.cl Fuente de Internet	<1 %
19	www.smf.org.mx Fuente de Internet	<1 %

20	ctepalto.cl Fuente de Internet	<1 %
21	orcid.org Fuente de Internet	<1 %
22	repositorio.chapingo.edu.mx Fuente de Internet	<1 %
23	repositorio.usm.cl Fuente de Internet	<1 %
24	dspace.ucuenca.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
25	Submitted to CONACYT Trabajo del estudiante	<1 %
26	hmong.es Fuente de Internet	<1 %
27	Submitted to CACACE Informática Trabajo del estudiante	<1 %
28	Submitted to Universidad de Guadalajara Trabajo del estudiante	<1 %
29	repositorio.unisucree.edu.co Fuente de Internet	<1 %
30	Submitted to Universidad de Burgos UBUCV Trabajo del estudiante	<1 %
31	repositorio.uc.cl Fuente de Internet	<1 %

32	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
33	www.mef.gob.pe Fuente de Internet	<1 %
34	repositorio.xoc.uam.mx Fuente de Internet	<1 %
35	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
36	repositorio.unheval.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
37	sedici.unlp.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
38	doczz.es Fuente de Internet	<1 %
39	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	<1 %
40	logistica360.pe Fuente de Internet	<1 %
41	Submitted to Universidad Anahuac México Sur Trabajo del estudiante	<1 %
42	dokumen.pub Fuente de Internet	<1 %

43

revistas.lamolina.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

44

www.gestiopolis.com

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 30 words

Excluir bibliografía

Activo

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTANDARIZACIÓN DE
PROTOCOLO PARA LA IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE
GÉNEROS DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN PALTO
(*Persea americana* Mill.), LA MAR-AYACUCHO**

Ciynthia Isabel, Bautista Prado; Angela Requis Quintanilla;
Eugenia Rocío Quispe Medina y Germán Fernando De la Cruz Lapa
Área de investigación: Biotecnología
Línea de investigación: Biotecnología Vegetal y Fitopatología Agrícola
ciynthia.bautista.01@unsch.edu.pe
german.delacruz@unsch.edu.pe

RESUMEN

En Perú, el cultivo de palto (*Persea americana* Mill.) variedad “Hass” es el que tiene mayor demanda en el mercado internacional; sin embargo, uno de los factores que afecta el potencial del crecimiento del cultivo es el ataque de fitopatógenos asociados a tallos y ramas que limitan la producción óptima del cultivo. El objetivo del presente trabajo fue identificar mediante características morfológicas y pre-moleculares de genes ITS (ADN ribosomal) para identificar el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.), La Mar-Ayacucho. Las características macroscópicas que se tuvieron en cuenta para la identificación son: ratio de crecimiento en medio de cultivo, tipo y color del micelio y las características microscópicas son: tamaño, forma y color de los conidias. Se realizó aislamientos a partir de muestras de tallos, de un total de 50 muestras de las localidades pertenecientes a los distritos de Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, Chilcas y Luis Carranza de la provincia de La Mar; región Ayacucho, Perú. Se obtuvieron 124 aislamientos puros de los cuales, mediante características morfológicas y moleculares, se identificaron cinco géneros: *Lasiodiplodia* spp. (43 %), *Dotiorella* spp. (15%), *Pestalotiopsis* spp. (15%), *Colletotrichum* spp. (15%) y *Fusarium* spp. (24%), estos géneros se consideran como agentes causales de enfermedades en tallos y ramas en el palto. La identificación molecular se realizó mediante extracción de ADN y la prueba de PCR (primer ITS1- 4). De acuerdo a la prueba de patogenicidad los cinco géneros identificados resultaron patogénicos.

Palabras clave: *Lasiodiplodia* spp., *Fusarium* spp., *Colletotrichum* spp., *Dothiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., marcadores moleculares.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION AND STANDARDIZATION OF PROTOCOL FOR THE MOLECULAR IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGAL GENERA IN AVOCADO

(*Persea americana* Mill.), LA MAR-AYACUCHO

ABSTRACT

In Peru, the avocado (*Persea americana* Mill.) “Hass” variety is the most demanded crop in the international market; however, one of the factors affecting the growth potential of the crop is the attack of phytopathogens associated with stems and branches that limit the optimum production of the crop. The objective of the present work was to identify by means of morphological and pre-molecular characteristics of ITS (ribosomal DNA) genes to identify the genus of fungi that cause damage to avocado (*Persea americana* Mill.) stems, La Mar-Ayacucho. The macroscopic characteristics taken into account for the identification are: growth rate in culture medium, type and colour of the mycelium and the microscopic characteristics are: size, shape and colour of the conidia. Isolations were made from stem samples, from a total of 50 samples from localities belonging to the districts of Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, Chilcas and Luis Carranza in the province of La Mar; Ayacucho region, Peru. Five genera were identified by morphological and molecular characteristics: *Lasiodiplodia* spp. (43 %), *Dothiorella* spp. (15 %), *Pestalotiopsis* spp. (15 %), *Colletotrichum* spp. (15 %) and *Fusarium* spp. (24 %), these genera are considered as causal agents of stem and branch diseases in avocado. Molecular identification was done by DNA extraction and PCR test (primer ITS1- 4). According to the pathogenicity test, the five identified genera were found to be pathogenic.

Key words: *Lasiodiplodia* spp, *Fusarium* spp, *Colletotrichum* spp, *Dothiorella* spp, *Pestalotiopsis* spp, molecular markers.

1. INTRODUCCIÓN

La producción del cultivo de palto (*Persea americana* Mill.) en Perú ha crecido significativamente, convirtiéndose en un producto clave para la exportación; sin embargo, los síntomas asociados a tallos, ramas y muerte regresiva, se han observado en plantaciones de palto en todo el país, lo que viene causando pérdidas económicas (Rodríguez-Gálvez et al., 2021).

La palta Hass peruana ha ganado relevancia en el mercado internacional, con un notable crecimiento en exportaciones y auge del cultivo, siendo la variedad Hass la más exportada (Flores-Izquierdo & Espinoza-Villanueva, 2023).

El Servicio de Sanidad Agraria del Perú (2024) afirma que la cadena agroexportadora de palta en el país está compuesta principalmente por productores de los valles interandinos de Ayacucho, Apurímac y Huancavelica.

Según Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego (2024) en el presente año 2024, Perú afianzó su posición como segundo mayor exportador mundial de palta, por detrás de México, al exportar, entre enero y febrero 36360 toneladas por 75,4 millones de dólares; dicho volumen representa un incremento del 79,2%.

Según el informe del INEI (2024) las exportaciones de palta alcanzaron 207 mil toneladas, siendo los principales destinos: Estados Unidos, Países Bajos, China, Reino Unido, Hong Kong y Canadá.

En la región Ayacucho, el Valle de Torobamba destaca como la principal zona de producción (1247.38 toneladas métricas) seguido por el valle Huanta-Luricocha y la zona de producción Vilcas Huamán-Chincheros (SENASA, 2019).

En la región Ayacucho, la provincia de La Mar es reconocida como uno de los principales centros de producción del cultivo de palto a nivel regional, sin embargo, se enfrenta desafíos fitosanitarios, que afectan la producción, cantidad y la calidad del fruto, siendo las enfermedades fungosas una de las razones que causan mayores problemas y son poco estudiadas.

La podredumbre del tallo de palto es causada por diferentes especies de hongos, y se presenta a nivel mundial. Actualmente esta enfermedad afecta a diversas regiones productoras de palto en Perú, causando la pudrición de la fruta y afectando desfavorablemente a la industria (Llanos Melo & Apaza-Tapia, 2021).

Estos hongos causan daños en los paltos como: muerte regresiva, necrosis descendente de las ramas e inflorescencias, cancro en tronco y ramas, y pudriciones en el fruto o pedúnculo del fruto que son cada vez más común en las plantaciones de La Mar. Se encuentran en la naturaleza como endófitos, y se comportan como patógenos latentes y oportunistas que manifiestan su patogenicidad cuando sus hospedadores se encuentran bajo algún tipo de estrés (García et al., 2017).

Iyanyi et al. (2021) afirman que las tecnologías moleculares son las herramientas más confiables para caracterizar microorganismos porque se ocupan de la composición genética de los organismos. Se puede obtener información detallada sobre el análisis de sistemas sujetos al cambio climático, alimentos, agricultura, entornos industriales y ciencias ambientales con la ayuda del uso de herramientas moleculares. Se han desarrollado cebadores de oligonucleótidos altamente conservados, como los que se utilizan para amplificar la región del espaciador transcrito interno (ITS) de los hongos, útiles para la identificación molecular de fitopatógenos. Por los argumentos explicados en el presente trabajo de investigación se tiene como objetivo general describir las

características morfológicas de hongos fitopagénos y pruebas pre-moleculares de genes ITS (ADN ribosomal) para identificar el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.), La Mar- Ayacucho. los objetivos específicos son: 1. Identificar mediante características morfológicas el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.) en la provincia La Mar, Ayacucho. 2. Establecer un protocolo estándar para la extracción de ADN de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.). 3. Estandarizar el pre-PCR con marcadores moleculares de genes ITS del ADN ribosomal, que identifican y confirman el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.). 4. Confirmar con prueba de patogenicidad los hongos identificados que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.).

2. METODOLOGÍA

2.1. Ubicación del experimento

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Fitopatología y Biotecnología Vegetal, ambos pertenecientes a la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Escuela Profesional de Agronomía, situados en las coordenadas 13°08'53" Latitud sur y 74°13'12" Longitud oeste, a 2792 msnm de altitud, en el distrito de Ayacucho, provincia de Huamanga y región de Ayacucho.

2.1.1 Material biológico

El material biológico procede de campos de palto comerciales situados en la provincia de La Mar, departamento Ayacucho. Los distritos y la cantidad de muestras colectadas de cada lugar se detallan en la tabla siguiente:

Tabla 2.1

Muestras de tallo obtenidas de las zonas de producción de palto de la provincia de La Mar

Departamento	Provincia	Distrito	N° Muestras
Ayacucho	La Mar	Tambo	6
Ayacucho	La Mar	San Miguel	6
Ayacucho	La Mar	Patibamba	10
Ayacucho	La Mar	Ninabamba	12
Ayacucho	La Mar	Chilcas	6
Ayacucho	La Mar	Luis Carranza	10
Total			50

2.2. Colección de muestras

Las muestras se colectaron de las diferentes zonas de producción de Tambo, San Miguel, Ninabamba, Patibamba, Chilcas y Luis Carranza. Se inspeccionaron varios árboles de las

plantaciones de palto Hass para detectar síntomas. En cada plantación los árboles fueron revisados y evaluados para identificar la presencia de tizones en el tallo, muerte regresiva, necrosis y canchales en los tallos laterales, marchitez, amarillamiento, corteza hundida y oscura. Se tomaron muestras de tallos y de ramas primarias, secundarias y terciarias de estos árboles, varios segmentos que miden entre 5 y 10 cm de largo de cada planta sintomática, independientemente de la edad de la planta. Las muestras se colocaron primero en bolsas de papel kraf y polietileno rotuladas con sus datos de pasaporte; todas las muestras fueron colocadas en cajas de tecnopor conteniendo gel pack refrigerante, lo que permitió mantener una temperatura baja constante en el transcurso del traslado al laboratorio. La recolección de muestras, aislamiento del patógeno, estandarización de protocolo para la extracción de ADN, caracterización, identificación morfológica y pre-molecular se realizó durante todo el año 2023 y los meses de enero a junio del 2024.

2.3. Aislamiento del patógeno

Los segmentos de tallos, ramas primarias, secundarias y terciarias recolectadas pasaron por una serie de lavados. La desinfección se realizó teniendo en cuenta lo recomendado por Rodríguez-Gálvez et al. (2021) & Vicuña (2023), las muestras se cortaron en porciones con un área de 5 mm aproximadamente de la zona de avance del síntoma (interfase entre tejido vegetal sano y enfermo), en el borde del tejido de la madera necrosada utilizando una tijera de podar y un bisturí estéril; luego se realizó una desinfección superficial para eliminar microorganismos y contaminantes externos sumergiendo las muestras cortadas en porciones pequeñas en alcohol de 70° por 2 minutos; enseguida se lavó dos veces con agua destilada estéril. Las porciones desinfectadas se colocaron en papel toalla y se dejaron secar dentro de la cámara de flujo laminar. Posteriormente los trozos de madera se sembraron en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) modificado con 0.5 gr/L de tetraciclina con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias. En cada placa se colocó cinco porciones del tejido (en forma de cruz). Las placas se incubaron a 27 °C por un período de 3 a 10 días, en condiciones de oscuridad para favorecer el crecimiento de los hongos. Una vez que se obtuvieron los crecimientos de las colonias, se llevaron a cabo repiques sucesivos en placas petri con medio PDA. Estos repiques consistieron en transferir fragmentos de los márgenes del micelio hasta obtener colonias puras (cultivo axénico).

2.4. Caracterización e identificación morfológica de aislamientos

La caracterización morfológica de los aislamientos puros se realizó con el propósito de identificar el género de los patógenos. Este proceso involucró varios pasos y observaciones detalladas; para ello, se evaluó el desarrollo de hongos en medio de cultivo PDA. Se analizaron las características macroscópicas como el color del micelio, morfología de las colonias a 27°C tras un periodo de incubación que varió según el tipo

de hongo; la presencia o ausencia de septos, la longitud y el ancho de 100 conidios, las mediciones se realizaron utilizando un microscopio compuesto (Accu-Scope), también se caracterizó la forma y color de los conidios. El ratio de crecimiento de los micelios se determinó teniendo en cuenta la siguiente formula: el promedio de crecimiento es igual a incremento total (cm) entre tiempo total, expresando el resultado en centímetros por día (cm/día). La medición continuó hasta que el micelio del hongo cubrió por completo el medio de cultivo en la placa de petri. Por último, se identificó el género taxonómico a partir de las características microscópicas de las estructuras vegetativas y reproductivas asexuales, basándose en publicaciones científicas y las guías de Barnett & Hunter (1972).

2.5. Identificación pre-molecular

a. Muestras

Las muestras de estructuras fúngicas se obtuvieron a partir de las colonias del patógeno aislados en placas de Petri, en estado de esporulación en medio de cultivo (PDA).

b. Extracción de ADN

Las muestras (micelios) fueron molidos utilizando 500 uL de CTAB 2X+LiCL, mediante el protocolo de Huanca-Mamani et al. (2014) modificado por Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, E.P. Agronomía, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

c. Cuantificación y calidad del ADN

Se cuantificó la cantidad de ADN extraído mediante espectrofotometría en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal de la E. P. Agronomía:

1. Inicialmente, el pellet de ADN extraído se disolvió en 50 µL de T₁₀E1, para asegurar una disolución completa.
2. Para el blanqueo, se usaron 1.5 µL de T₁₀E1, y se tomó la misma cantidad de ADN disuelto para realizar la lectura en el espectrofotómetro. Antes de cada lectura las muestras se homogeneizaron mediante un suave movimiento. Es importante destacar que el blanco se preparó con la misma solución utilizada para disolver el pellet de ADN.
3. Finalmente, se procedió a realizar la medición de la concentración de ADN en ng/µL. Esta concentración será ajustada para el ADN molde, que se utilizará en la amplificación por PCR.

d. Integridad del ADN

El siguiente protocolo fue utilizado para evaluar la integridad y calidad del ADN:

1. Se preparó gel de agarosa al 2.0 % utilizando 90mL de buffer TBE 1X y añadiendo 2 µL de Bromuro de Etidio.
2. El gel preparado se vertió en la cubeta con peine y se dejó solidificar.

3. Seguidamente se transfirió gel endurecido en la cámara de electroforesis; para cubrir completamente el gel se llenó con buffer de corrida TBE 1X, luego se removió el peine para permitir el acceso a los pocillos.
4. El Cocktail-Mix para la corrida se preparó con 2 μL de agua libre de nucleasas (NFW), 1 μL de loading 6X y 3 μL de ADN de la muestra, para obtener un volumen final de 6 μL .
5. Se sirvió el mix en el orden adecuado en los pocillos de gel según el orden adecuado, después se corrió en electroforesis a 90 voltios por 1 hora y 45 minutos, posteriormente se visualizó en el transluminador UV la integridad del ADN y por último se capturó la imagen del gel para su verificación.

2.6 Ensayo de Pre PCR

a. Homogenización de la concentración de ADN

El proceso comenzó homogenizando las concentraciones de ADN extraído a una concentración de trabajo (ADN molde) de 15 ng/uL; utilizando agua libre de nucleasas (NFW).

b. Preparación de la mezcla Master Mix

La preparación de la mezcla maestra (master mix) se llevó a cabo para el marcador molecular ITS 1-4. La tabla 2.8 muestra la composición de esta mezcla para cuatro reacciones. El proceso comenzó con el cálculo de las cantidades para una única reacción (1Rxx), que luego se multiplicaron por el número total de reacciones requeridas. Este total comprendía las tres muestras más una reacción extra para cubrir las pérdidas ocasionadas por el contacto con las puntas de las micropipetas, sumando un total de cuatro reacciones.

Tabla 2.2

Mezcla de Master mix para amplificación en PCR, para 4 reacciones.

Reactivos	[°]	[f]	Volumen 1Rx (uL)	Volumen 4 Rx(uL)
NFW			14.3	57.2
buffer 5X	5X	1X	5.0	20.0
MgCl ₂	25mM	2mM	2.0	8.0
dNTPs	10mM	0.2mM	0.5	2.0
rward (ITS 1)	10uM	1pM/uL	0.5	2.0
Reverse (ITS 4)	10uM	1pM/uL	0.5	2.0
Taq DNA polimerasa	5U/uL	0.025U/uL	0.2	0.8
DNA molde	x	15ng/ul	2.0	(*)
volumen total			25.0 uL	92.0 uL

Nota. (*) Se agrega 4.0 uL de ADN molde, independientemente para cada muestra al momento de servir para la amplificación de PCR. 1Rxx: una reacción, 4 Rxx: 4 reacciones.

c. PCR (Reacción en cadena de polimerasa)

Para el marcador molecular ITS1-4, se realizó la técnica de PCR, tomando en consideración las longitudes de los cebadores expresadas en pares de bases (tabla 2.9). El

El perfil térmico empleado se estructuró de la siguiente manera: desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos que incluían desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, hibridación a 58.1 °C por 1 minuto, y extensión a 73.1 °C por 1 minuto, finalizando con una extensión a 74 °C durante 7 minutos. El termociclador empleado fue un Eppendorf pro S.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ejecutó con primers diseñados para amplificar la región ITS (Espacio Transcrito Interno)

Tabla 2.3

Secuencias del cebador ITS en dirección 5'-3'

Región	Nombre del primer	Secuencia (5' a 3')	Fuente
ITS	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Toju, 2012
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	Toju, 2012

2.7 Prueba de patogenicidad

Para realizar la prueba de patogenicidad se tomó en cuenta lo mencionado por Vicuña (2023).

a. Preparación del inóculo

Las cepas puras mantenidas en conservación fueron reactivadas utilizando medio PDA en placas de Petri, incubándose a una temperatura de 27°C por 10 días. Antes de realizar las inoculaciones los plantones fueron sometidos a estrés hídrico.

b. Inoculación

Se inocularon 18 plantones de palto de un año de edad los cuales estaban injertados con la variedad Hass. Cada tratamiento se realizó con tres repeticiones tanto para *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp, y dos cepas de *Fusarium* spp; 12 días después de la inoculación se regó a los plantones para activar las defensas de éstas. Para llevar a cabo la inoculación, se realizó una herida utilizando un sacabocado esterilizado. Se envolvió con algodón estéril el área inoculada y este se humedeció con agua estéril, el procedimiento finalizó sellando todo con una capa de Parafilm.

c. Evaluaciones

Durante 30 días, los plantones se mantuvieron en el laboratorio bajo condiciones ambientales no controladas. En este período, se evaluó la aparición de síntomas, que progresaron desde pequeñas manchas superficiales en las proximidades de la herida de inoculación hasta el desarrollo de canchales hundidos. Tras la inoculación, las plantas se mantuvieron sin riego durante tres días, restableciendo posteriormente un régimen de riego interdiario adaptado al consumo hídrico individual. Para analizar la progresión interna de la pudrición, se practicó un corte transversal en el tallo utilizando un bisturí, lo que permitió observar el avance del área necrótica.

2.8 Porcentaje de incidencia

Es la proporción de plantas en una población que están infectadas por un patógeno. Este porcentaje se calculó dividiendo el número de plantas infectadas, por el número total de plantas evaluadas y multiplicando el resultado por 100 (Agrios, 2005).

$$\text{Incidencia} = \left(\frac{\text{Número de plantas infectadas}}{\text{Número total de plantas evaluadas}} \right) \times 100$$

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

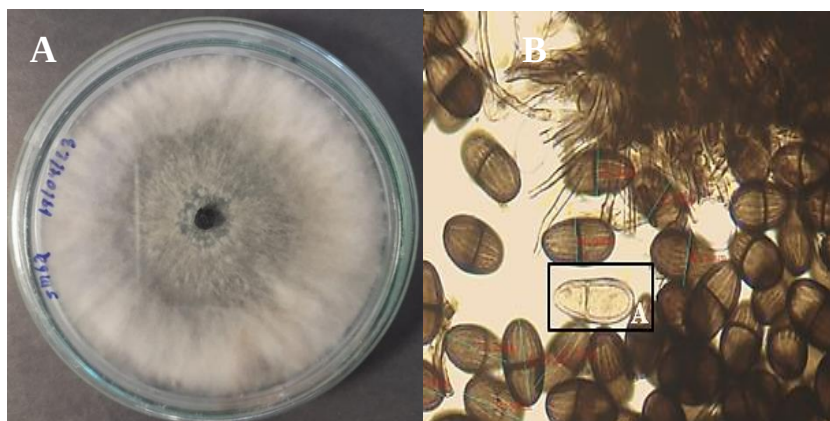
3.1. Identificación de las características morfológicas

3.1.1. *Lasiodiplodia* spp.

Al observar las características macroscópicas de los aislamientos de *Lasiodiplodia* spp., reveló la formación de micelio denso que al principio fue de color blanco (figura 3.1a) gradualmente fue adquiriendo tonalidades que se iban tornando de gris olivo a gris oscuro, las colonias llenaron la placa en 4 días, con un ratio de crecimiento promedio de 2.98 cm/día a una temperatura de 27°C. Las características microscópicas, mostro la formación de masas estromáticas grises, las cuales que al ser examinadas bajo microscopio revelaron que albergaban diversas picnidias de pared color marrón oscuro a negro con tamaños promedios de 200.66 × 156.36 µm. Las conidias presentan una formación acrógena, con una forma que varían de subovoide a elipsoidal, un ápice redondeado y una base ligeramente truncada, al principio es hialina y aseptada, pero luego se torna marrón oscuro, debido al depósito de melanina. Tienen un septo al centro, al madurar, muestran estrías de forma longitudinal (figura 3.1b) en la superficie tal como lo mencionan Vicuña (2023) , Phillips et al. (2013), Picos-Muñoz et al. (2015) y Valle-De la Paz et al. (2019). El tamaño de las conidias promedio es de 27.05 x 16.02 µm que coincide con lo mencionado por Vicuña (2023) cuyo promedio reportado de las mediciones fue de 12 - 16 x 23 - 31µm, asimismo Ko et al. (2004) expresan que el promedio de fue de (20 - 32 × 12 - 16) µm.

Figura 3.1

Características macroscópicas y microscópicas de Lasiodiplodia spp.



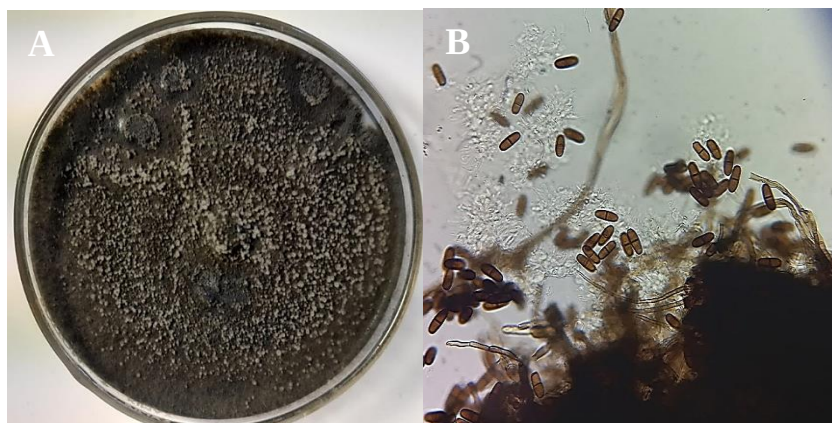
Nota. (*) Identificación del hongo A. Crecimiento de *Lasiodiplodia* spp. en placa 4 DD.. B. Conidios de *Lasiodiplodia* spp

3.1.2 *Dotiorella* spp.

El análisis macroscópico de las colonias de *Dotiorella* spp. cultivadas reveló la presencia de un micelio denso, que en sus etapas iniciales exhibió una coloración olivácea en el centro de la colonia y blancas en los bordes, que luego se tornó olivácea, las colonias llenaron la placa en 8 días, con ritmo promedio de crecimiento de 2.29 cm/día, a una temperatura de 27°C; tornándose de color gris oliváceo pálido a negro oliváceo (figura 3.2a) después de unos días; la presencia de paráfisis y ostiolas no se observaron. La observación de las características microscópicas de *Dotiorella* spp. permitió identificar las colonias la formación de picnidios oscuros, globosos que miden en promedio 172.02 x 131.15 µm, éstos están agrupados en un estroma bien desarrollado, el estroma es subcortical; los conidióforos son simples y cortos de acuerdo a Barnett & Hunter (1972) y también mencionado por Lawrence et al. (2017). Inicialmente, los conidios de *Dotiorella* spp. son hialinos de paredes finas, con formas que van de oblongas a elípticas. Luego, sus paredes se engrosan, se vuelven marrones y desarrollan un tabique central grueso (figura 3.2b); como lo indican Wenjing et al. (2014). El tamaño de las conidias promedio fue de 22.49 x 8.46 µm, coincide con lo mencionado por Váczy et al. (2018) cuyo promedio reportado fue de 20-26 x 8-10 µm; asimismo, Lawrence et al. (2017) expresan que el promedio de las mediciones fue de 19.4-24.3 x 8.7-11.6 µm.

Figura 3.2

Características macroscópicas y microscópicas de Dotiorella spp.



Notas. (*) Identificación del hongo A. Placa de *Dotiorella* spp. con formación de masas estromáticas 20 DDS. B. Conidios septados de *Dotiorella* spp.

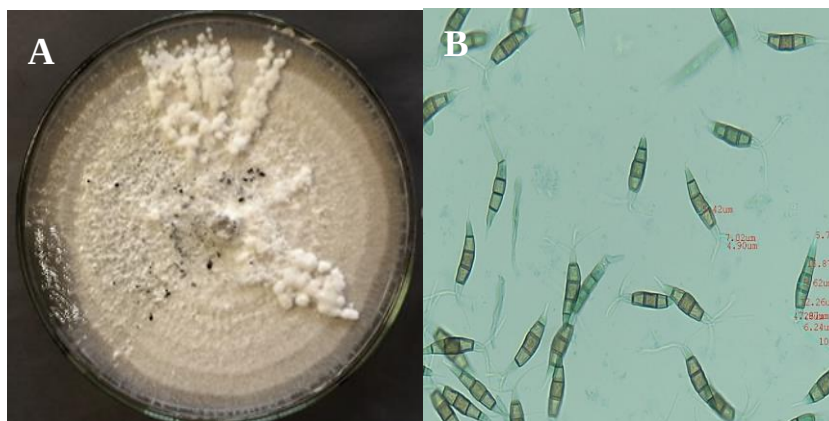
3.1.3. *Pestalotiopsis* spp.

según las características macroscópicas, las colonias obtenidas de *Pestalotiopsis* spp. se distinguían por la formación de un micelio de aspecto algodonoso. La colonia fue de color blanco (figura 3.2a), la presencia de acérvulos negro brillante fue abundante en los aislados. Las colonias llenaron la placa en 11 días, con un ratio promedio de crecimiento del micelio de 3.01 cm/día a una temperatura de 27°C. *Pestalotiopsis* spp. presenta especies con conidios de 5 células, se caracteriza por presentar conidios con tres células

medias pigmentadas, mientras las células de los extremos son hialinas, los conidios poseen ornamentaciones apicales y basales; la forma de los conidios oscila entre curvado y recto, presentan 5 células, 2 hialinas en los extremos y 3 versicolas en el centro (figura 3.2b) coincide con los resultados mostrados en la investigación de Maharachchikumbura et al. (2011). El tamaño de las conidias promedio fue de $27.54 \times 5.89 \mu\text{m}$; coincide con lo reportado por Espinoza et al. (2008), quien señala que el promedio de las mediciones de las conidias es de 22.7 ± 2.3 a $27.0 \pm 2.5 \mu\text{m}$ y $7,4 \pm 0.3$ a $9.3 \pm 0.7 \mu\text{m}$ de ancho; Lin et al. (2018) mencionan que el promedio de las mediciones de 100 conidias fue de $5.4 - 9.6 \times 18.2 - 25.6 \mu\text{m}$, asimismo Valencia et al. (2011), indica que el promedio reportado fue de $22.2 - 30.4 \times 6.3 - 9.8 \mu\text{m}$; además resalta que las células apicales y basales eran incoloras, mientras que las tres células medianas eran de color marrón oscuro. Los conidios tenían un apéndice basal y de dos a cuatro apéndices apicales largos, el cual está en concordancia con lo señalado en esta investigación, donde se muestra que el número de ornamentaciones apicales es de 3 a 4, el número de ornamentaciones basales es de 1; la longitud de las ornamentaciones apicales mide en promedio 15.75, 15.36 y 14.71 μm .

Figura 3.3

Características macroscópicas y microscópicas de *Pestalotiopsis* spp.



Nota. (*) Identificación del hongo A. Crecimiento de *Pestalotiopsis* spp. en placa 15 DDS. B. Conidias observadas al microscopio.

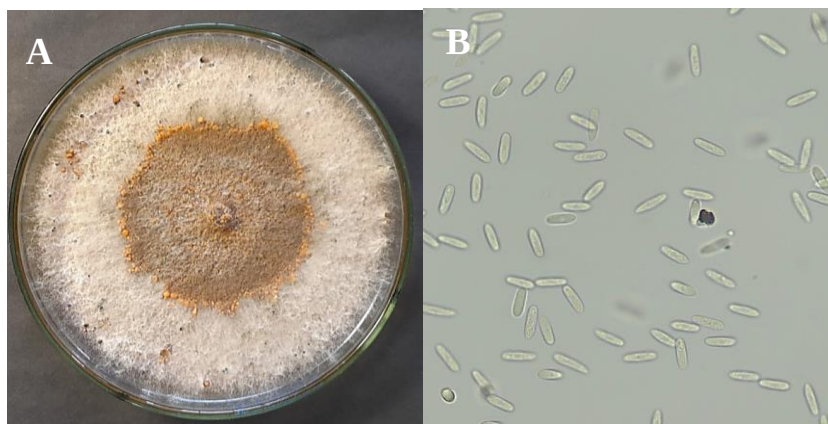
Las colonias de *Colletotrichum* spp. exhibieron, mediante observación macroscópica, la formación de micelio harinoso (abundante y superficial) que fueron inicialmente de color blanco que se iba tornando crema con centro color naranja, (figura 3.4 a) coincide con lo mencionado por Valdés et al. (2017) y Trinidad-Ángel et al. (2017); las masas conidiales fueron abundante, salmón y negras con una distribución aleatoria, se aprecian cirros cremosos de color naranja. Las colonias llenaron la placa en 11 días, con un ratio promedio de crecimiento de 2.63 cm/día a una temperatura de 27°C.

Mediante la observación microscópica, se pudo evidenciar la presencia de cuerpos irregulares con setas escasas rectas coincide con lo expresado por Barnett & Hunter (1972) quienes mencionan que *colletotrichum* spp. presenta estructuras en forma de disco

llamadas arcérvulos, que son cubiertas de una sustancia cerosa, subepidérmicos, a menudo tienen espinas oscuras; las conidias eran de forma cilíndrico hialino con extremos redondeados (figura 3.4 b) concuerda con lo mencionado por (Sandoval et al., 2008), las mediciones de las conidias en promedio fue de $15.16 \times 5.90 \mu\text{m}$ coincide con lo expresado por Silva-Rojas & Ávila-Quezada (2011), quienes sustentan el promedio oscila entre $13.5\text{--}23.8 \mu\text{m}$ de largo y $4.3\text{--}6.8 \mu\text{m}$ de ancho; asimismo Qiao et al. (2021) expresan que el promedio es de $12.2\text{--}17.1 \mu\text{m} \times 4.2\text{--}6.4 \mu\text{m}$.

Figura 3.4

Características macroscópicas y microscópicas de Colletotrichum spp.



Nota. (*) Conidias hialinas de *Colletotrichum* spp. de forma cilíndrico con extremos redondeados.

3.1.4. *Fusarium* spp.

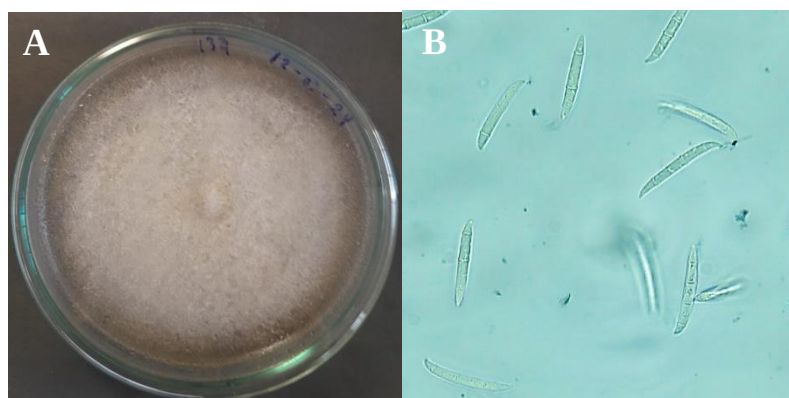
Cepa 1. *Fusarium* spp.

La observación de las características macroscópicas, evidenció que las colonias de *Fusarium* spp. obtenidas formaron un micelio denso que inicialmente fue de color blanco y luego se iba tornando crema, un patrón de crecimiento radial, (figura 3.5a) corresponde con lo expresado por Leslie & Summerell. (2006) y Hernández et al. (2019). Las colonias llenaron la placa en 10 días, con ritmo de crecimiento promedio de 2.53 cm/día a una temperatura de 27°C .

Basado en las características microscópicas, se pudo observar en las colonias la formación de macroconidios, ausencia de microconidias y clamidosporas, que al ser posteriormente observadas al microscopio se evidenció que las macroconidios oscilan entre relativamente anchos, rectas a ligeramente curvadas, con paredes delgadas (figura 3.5b), el tamaño de las conidias promedio fue de $41.10 \times 5.07 \mu\text{m}$ con 3 a 4 septos, célula apical redondeada y célula basal en forma de pie, abundante en esporodocios, coincide con lo expresado por Leyva-Mir et al. (2017) quienes reportan que el promedio que obtuvieron fue de $22\text{--}48 \times 2.5\text{--}4.2 \mu\text{m}$, con paredes delgadas ; asimismo Sarkhosh et al. (2018) mencionan que el promedio obtenido fue de $24.5\text{--}35.3 \times 4.1\text{--}5.4 \mu\text{m}$. Todas las características observadas en microscopía de luz fueron consistentes con las reportadas por Leslie & Summerell (2006) para *Fusarium Solani* quienes añaden que los conidios pueden tener de 3-7 septos.

Figura 3.5

Características macroscópicas y microscópicas de Fusarium spp



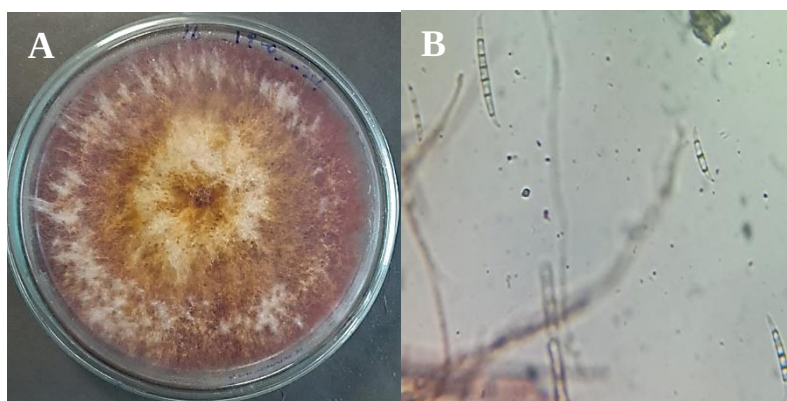
Nota. (*) Identificación del hongo A-B. crecimiento de *Fusarium* spp. en placa 10 DDS. B. Observaciones microscópicas de las conidias de *Fusarium* spp.

Cepa 2. *Fusarium* spp.

Las características macroscópicas de las colonias de *Fusarium* spp. obtenidas mostraron formación de un micelio algodonoso que fueron inicialmente de color púrpura que fue tornándose violeta, (Figura 3.6a) con una apariencia de amarillo a naranja cuando se cultiva en PDA coincide con lo expuesto por (Leslie & Summerell., 2006) y Hernández et al. (2019) para *Fusarium oxysporum*. Las colonias llenaron la placa en 6 días, con un ratio de crecimiento promedio de 2.77 cm/día a una temperatura de 27°C. Mediante las características microscópicas, se pudo observar en las colonias la formación de macroconidios, ausencia de microconidias y clamidosporas, que al ser posteriormente observadas al microscopio se evidenció que las macroconidios son ligeramente rectos, curvados, relativamente esbeltas y de paredes delgadas (Figura 3.6b). El tamaño de las conidias promedio fue de $41.30 \times 4.16 \mu\text{m}$, con 4-5 septos, células apicales: cónicas y curvadas, a veces con un ligero gancho y células basales de forma puntiaguda a pie, coincide con lo expresado por Leyva-Mir et al. (2017) quienes reportan que el promedio que obtuvieron fue de $22 - 48 \times 2.5 - 4.2 \mu\text{m}$, con paredes delgadas, con 5 o 6 septos.

Figura 3.6

Características macroscópicas y microscópicas de Fusarium spp.



Nota. (*) Identificación del hongo A-B. Muestra el crecimiento de *Fusarium* spp. en placa 6 DDS, micelio inicialmente de color púrpura que se iba tornando violeta. B. Conidios observados al microscopio.

Tabla 3.1

Resumen de principales características macroscópicas y microscópicas de aislamientos patogénicos que causan daños en tallos de palto (*Persea Americana* Mill).

Aislamiento	N° de mediciones	Largo (µm)	Ancho (µm)	N° septos	Forma de la conidia	Ratio de crecimiento (cm/día)	Tipo de micelio	Color de micelio
<i>Lasiodiplodia</i> spp.	$\bar{X}$ = 100	27.05	16.02	1	Subovoide-Elipsoidal	2.98	Denso	Gris olivo- Negro
<i>Dotiorella</i> spp.	$\bar{X}$ = 100	22.49	8.46	1	Oblonga- Elíptica	2.29	Denso	Gris oliváceo - Negro oliváceo
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	$\bar{X}$ = 100	27.54	5.89	4	Ligeramente Curvado-Recto	3.01	Algodonoso	Blanco
<i>Colletotrichum</i> spp.	$\bar{X}$ = 100	15.16	5.90	0	Cilíndrica	2.63	Harinoso (abundante y superficial)	Blanco-crema
<i>Fusarium</i> spp.	$\bar{X}$ = 100	41.1	5.07	4	Rectas o ligeramente curvadas: Célula apical redondeada y célula basal en forma de pie	2.53	Denso	Blanco-crema
<i>Fusarium</i> spp.	$\bar{X}$ = 100	41.3	4.16	5	Rectas o ligeramente curvadas: Células apicales cónicas con ligera forma de gancho y células basales en forma puntiaguda	2.77	Aéreo Algodonoso	Púrpura-Violeta

3.1.5. Distribución de los géneros en las zonas muestreadas

El porcentaje de participación de cada género identificado con respecto a las 50 muestras totales (figura 3.13) obtenidas de los distritos de Tambo, San Miguel, Patibamba, Ninabamba, chilcas y Luis Carranza, provincia la Mar, departamento de Ayacucho.

Figura 3.7

Porcentaje de participación de los géneros patogénicos



Notas. (*) Porcentaje de participación de los géneros *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., a *Colletotrichum* spp. y *Fusarium* spp. con respecto al total de muestras patogénicas obtenidas.

3.2. Resultados de la cuantificación de ADN mediante Espectofometría

En la figura 3.19 se presenta los resultados de la calidad de ADN extraído en 18 aislamientos de hongos que causan daños en tallos de palto, teniendo presente a los géneros: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Pestalotiopsis* spp., *Colletotrichum* spp. y *Fusarium* spp.; luego de ser analizados mediante espectrofotometría y electroforesis horizontal en gel de agarosa. Se reporta una concentración de ADN en promedio de 183.27 ng/uL y la calidad en base a la absorbancia (absorbancia A260/A280) en un promedio de 2.0.

Tabla 3.2

Cuantificación de ADN mediante Espectrofotetría

Género	Carril	Muestra	Absorbancia A260/A280	Cantidad (ng/ul)
<i>Lasiodiplodia</i> spp.	1	N1A	2.02	132
	2	N1B	2.14	270.2
	3	N1C	1.91	147
<i>Dotiorella</i> spp.	4	N2A	1.55	79.8
	5	N2B	1.88	311
	6	N2C	1.69	85.3
<i>Pestalotiopsis</i> spp.	7	N3A	2.23	52.5
	8	N3B	2.28	254.8
	9	N3C	1.49	25.7
<i>Colletotrichum</i> spp.	10	N4A	2.11	404.3
	11	N4B	2.02	233.3
	12	N4C	2.24	505.5
<i>Fusarium</i> spp.	13	N5A	2.30	110.23
	14	N5B	2.17	77.3
	15	N5C	2.21	60.06
<i>Fusarium</i> spp.	16	T1A	1.59	24.1
	17	T1B	1.69	37.9
	18	T1C	2.05	139.6
	19	blanco		

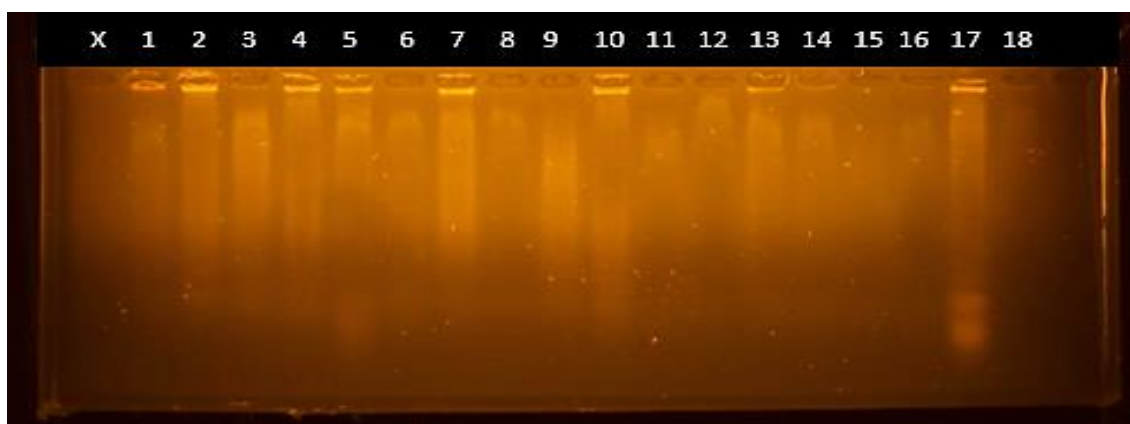
Nota. (*). Las muestras de ADN extraídas del 1 al 18 corresponde a hongos que causan daños en tallos de palto. N1A-N1B-N1C-T1C: Muestras de *Lasiodiplodia* spp. con 4 repeticiones. N2A-N2B-N2C: Muestras de *Dotiorella* spp. con 3 repeticiones. N3A-N3B-N3C: Muestras de *Pestalotiopsis* spp. con 3 repeticiones. N4A-N4B-N4C: Muestras de *Colletotrichum* spp. con 3 repeticiones. N5A-N5B-N5C: Muestras de cepa 1 de *Fusarium* spp. con 3 repeticiones. T1A-T1B: Muestras de cepa 2 de *Fusarium* spp. con 2 repeticiones. La foto documentación de ADN pertenecen a 5 géneros con 3 repeticiones, x: control (blanco).

3.3. Resultados del ensayo pre PCR de ADN de hongos

En las figuras 3.8 se presenta la fotodocumentación de ADN extraído de hongos que causan daños en tallos de palto según el protocolo de Huanca -Mamani, este protocolo demostró ser más eficaz, debido a la mejor calidad y cantidad de ADN obtenido.

Figura 3.8

Fotodocumentación de ADN extraído con el protocolo de Huanca-Mamani.



Nota. (*) Las muestras de ADN extraídas del 1 al 18 corresponde a hongos que causan daños en tallos de palto. La Fotodocumentación de ADN pertenecen a 5 géneros con 3 repeticiones, x: control (blanco).

3.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

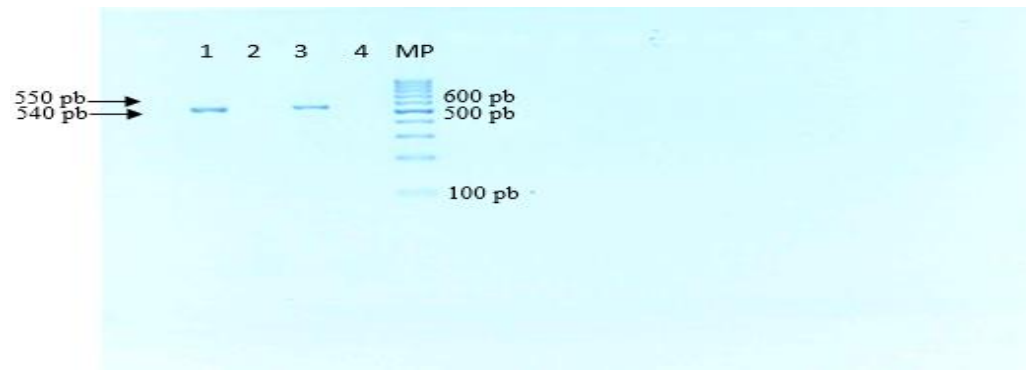
Para validar la efectividad del perfil térmico y la composición de la mezcla de PCR, se amplificó la región ITS empleando los cebadores:

- ITS1 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3'
- ITS4 5' TCCTC CGCTTATTGATA TGC 3'

En la figura 3.9 muestra los productos de PCR empleando los cebadores ITS1/ ITS4 en la amplificación correspondiente, ofrecieron como resultado la amplificación de fragmentos de ADN de 540 pb y 550 pb, obtenido a partir de ADN extraído de los micelios fúngicos de las muestras.

Figura 3.9

Productos de PCR amplificados para la región ITS.



Nota. (*). Las figuras muestran las bandas amplificadas (540pb-550pb) que corresponde al gen ITS del ADN ribosomal, para diferentes géneros que causan daños en tallos de palto, 4: Blanco. MP: marcador de peso molecular de 100pb - 1000pb. La corrida se realizó en gel de agarosa (1.8 %) en 90ml de TE por 2h con 30 minutos.

La banda obtenida es universal, los hongos analizados con los primers ITS1 y ITS4 muestran una señal dentro de ese rango de pares de bases. Esto confirma la funcionalidad del protocolo de PCR, pero no proporciona detalles sobre el género, ya que representa un amplicón generado a partir de muestras in vitro de hongos de madera del palto con secuencias específicas para esos géneros.

Flores et al. (2021) reportan que, de las cepas aisladas en su trabajo de investigación, se obtuvieron 17 secuencias consenso de 542 pares de bases de la región ITS; las diecisiete secuencias de la región ITS mostraron homología de 100% con la especie *Lasiodiplodia theobromae*. Estas secuencias no mostraron diferencias genéticas entre sí; por lo anterior, fueron agrupadas en una sola secuencia consenso.

3.5. Resultados de la Prueba de patogenicidad

15 días después de la inoculación se observó que las repeticiones uno y tres del tratamiento de *Lasiodiplodia* spp. empezaron a emitir exudados, *Dotiorella* spp. inicio a marchitarse, secarse y se observó una ligera clorosis en las hojas de las tres repeticiones, *Pestalotiopsis* spp. se observó clorosis en las hojas en las tres repeticiones, *Colletotrichum* spp. empezó a salir manchas necróticas y emitir exudados en la zona de inoculación en las tres repeticiones, en la cepa 1 de *Fusarium* spp. se observó marchitez en las hojas de la repetición y en las repeticiones dos y tres empezó a liberar exudaciones, en la cepa 2 de *Fusarium* spp. se observó que empezó a emitir exudaciones. A los 30 días se observó que las tres repeticiones del tratamiento de *Lasiodiplodia* spp. presentaron exudaciones, *Dotiorella* spp. presenta ligeras exudaciones y manchas marrones en la zona de inoculación en las tres repeticiones, *Pestalotiopsis* spp. presenta exudaciones en las 3

repeticiones; de la misma manera *Colletotrichum* spp., y las 2 cepas de *Fusarium* spp., se observa una marchitez en las hojas. Alrededor de 30 días, se observó la decoloración de la epidermis y aparición de exudaciones; los daños externos se mostraron irregulares (sin un patrón de avance) a diferencia de los daños internos que se encontraron bajo la epidermis; ya que estos plántones inoculados mostraron daños en forma elíptica que avanzaron internamente en sentido vertical ascendente y descendente; también, en sentido horizontal, tendiendo a circundar el tronco. Dentro de los cinco géneros género *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp. *Pestalotiopsis* spp y *Colletotrichum* spp, tuvieron mayor dimensión en daño tanto ascendente, descendente y en diámetro; las dos cepas de *Fusarium* spp. en menor dimensión. Los plántones de palto inoculados después de 30 días muestran similares síntomas y signos a los observados en las plantas inicialmente colectadas de donde se aislaron las muestras.

Figura 3.10
Prueba de patogenicidad en plántones de palto Hass



Nota. (*). Prueba de patogenicidad en plántones de palto Hass mostrando lesiones internas para los aislamientos: A- *Lasiodiplodia* spp., B-*Dotiorella* spp., C-*Pestalotiopsis* spp., D-*Colletotrichum* spp., E-*Fusarium* spp., F-*Fusarium* spp., a los 30 días después de la inoculación.

Tabla 3.3

Porcentaje de incidencia de los resultados obtenidos de la prueba patogenicidad

Tratamientos	Aislamientos	Repeticiones			% Incidencia
		R1	R2	R3	
T1	<i>Lasiodiplodia</i> spp.	1	1	1	100
T2	<i>Dotiorella</i> spp.	1	1	1	100
T3	<i>Pestaloopsis</i> spp.	1	1	1	100
T4	<i>Colletotrichum</i> spp.	1	1	1	100
T5	Cepa 1: <i>Fusarium</i> spp.	0	1	1	66.67
T6	Cepa 2: <i>Fusarium</i> spp.	1	1	0	66.67

4. CONCLUSIONES

1. Se identificó mediante características morfológicas cinco géneros de hongos: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestaloptiosis* spp. y *Fusarium* spp. que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.) en la provincia de La Mar, Ayacucho.
2. Se estandarizó en base al protocolo de Huanca-Mamani et al. (2014) para la extracción de ADN de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.).
3. Se estandarizó en base a un protocolo para el pre-PCR con marcadores moleculares de genes ITS del ADN ribosomal, que identifican y confirman el género de hongos que causan daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.)
4. La prueba de patogenicidad confirmó que los hongos identificados son agentes causales de los daños en tallos de palto (*Persea americana* Mill.) ocasionados por: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestaloptiosis* spp. y *Fusarium* spp.

5. RECOMENDACIONES

1. Realizar la secuenciación del amplicón resultante de la PCR, para llevar a cabo el análisis Bioinformático de la secuencia resultante con el propósito de determinar tanto el género como la especie de los hongos reportados.
2. Llevar a cabo evaluaciones que abarquen controles químicos, biológicos, genéticos y culturales; además, implementar estrategias tanto in vitro como en plantaciones en producción para establecer planes de control fitosanitario.
3. Se sugiere realizar estudios de investigación más exhaustivos, partiendo de los trabajos previos realizados en este estudio con respecto a la caracterización morfológica e identificación molecular para determinar posibles diferencias entre los géneros y especies de: *Lasiodiplodia* spp., *Dotiorella* spp., *Colletotrichum* spp., *Pestaloptiosis* spp. y *Fusarium* spp.
4. Realizar investigaciones afines en los diferentes cultivos tanto anuales y perennes de valor comercial en distintas zonas de la región Ayacucho, con el fin de determinar los agentes causales de las enfermedades.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. (2005). *Fitopatología* (Editorial Limusa S.A. De C.V., Ed.; 2º Edición).
<https://infoagronomo.net/fitopatologia-gn-agrios-pdf/>
- Barnett, H., & Hunter, B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (third edition).
- Espinoza, J. G., Briceño, E. X., Keith, L. M. & Latorre, B. A. (2008). Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis* spp. and a *Truncatella* sp. in Chile. *Plant Disease*, 92(10), 1407–1414. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-10-1407>
- Flores-Izquierdo, M. A. & Espinoza-Villanueva, L. E. (2023). Situación actual y perspectivas de la producción de palta (*Persea americana*) peruana en el contexto del comercio internacional. *Ingeniería Industrial*, 45, 157–173. <https://doi.org/https://doi.org/10.26439/ing.ind2023.n45.6316>
- García Pérez, O., Perera González, S., Rodríguez Pérez, A. & Siverio de la Rosa, F. (2021). *Estudio de parcelas de aguacate afectadas por hongos de la familia Botryosphaeriaceae en la isla de Tenerife*. www.researchgate.net/publication/351450662
- Hernández, A., Pineda, A., Noriega-Córdova, H. & Noriega-Córdova, I. (2019). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenidos de zonas productoras de “ají paprika” *Capsicum annum* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *ARNALDOA*. <https://doi.org/doi.org/10.22497/arnaldoa.262.26211>
- Huanca-Mamani, W., Salvatierra, R. & Sepúlveda-Chavera, G. (2014). *A fast and efficient method for total DNA extraction from soil filamentous fungi* (Vol. 32). <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010>
- Iyanyi, N. G., Ataga, A. E., Rotimi, I. S. & Blessing, I. (2021). Molecular identification of fungi associated with avocado (*Persea americana* Mill.) fruits. *Agro-Science*, 20(1), 80–86. <https://doi.org/10.4314/as.v20i1.13>
- Ko, W. H., Wang, I. T. & Ann, P. J. (2004). *Lasiodiplodia theobromae* as a Causal Agent of Kumquat Dieback in Taiwan. *Plant Disease*, 88(12), 1383–1383. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.12.1383A>
- Lawrence, D. P., Peduto Hand, F., Gubler, W. D. & Trouillas, F. P. (2017). Botryosphaeriaceae species associated with dieback and canker disease of bay laurel in northern California with the description of *Dothiorella californica* sp. nov. *Fungal Biology*, 121(4), 347–360. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.09.005>
- Leslie, J. & Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual* (First edition). <https://doi.org/10.1002/9780470278376>
- Leyva-Mir, S., Vega-Portillo, H., Villaseñor-Mir, H., Tlapal-Bolaños, B., Vargas-Hernández, M., Camacho-Tapia, M. & Tovar-Pedraza, J. (2017). Characterization of

- fusarium* species causing root rot of wheat in the bajo, Mexico. *Anim. Sci., Ex Agro-Ciencia*, 33(2), 142–142.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Groenewald, J. Z., Xu, J. & Crous, P. W. (2014). Pestalotiopsis revisited. *Studies in Mycology*, 79(1), 121–186. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.005>
- Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego. (2024, April 4). *Exportación de palta superó las 36 mil toneladas en primer bimestre de 2024*. Sierra y Selva Exportadora. <https://www.gob.pe/institucion/sse/noticias/930071-midagri-exportacion-de-palta-supero-las-36-mil-toneladas-en-primer-bimestre-de-2024>
- Phillips, A. J. L., Alves, A., Abdollahzadeh, J., Slippers, B., Wingfield, M. J., Groenewald, J. Z. & Crous, P. W. (2013). The Botryosphaeriaceae: genera and species known from culture. *Studies in Mycology*, 76, 51–167. <https://doi.org/10.3114/sim0021>
- Picos-Muñoz, A., García-Estrada, S., León-Felix, A., Sañudo- Barajas, A. & Allende Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. *SciELO*, 33, 54–74.
- Rodríguez-Gálvez, E., Hilário, S., Batista, E., Lopes, A., & Alves, A. (2021). *Lasiodiplodia* species associated with dieback of avocado in the coastal area of Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 161(1), 219–232. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02317-5>
- Sandoval, E. (2022). *Monitoreo de conidias de Lasiodiplodia sp. en palto 'Hass' (Persea americana Mill.) En distintas zonas de la costa del Perú*. Universidad Nacional Agraria la Molina.
- Servicio de Sanidad Agraria del Perú. (2024,). *Productores y SENASA oficializan inicio de campaña de exportación de palta*. <https://www.gob.pe/institucion/senasa/noticias/903792-productores-y-senasa-oficializan-inicio-de-campana-de-exportacion-de-palta>
- Toju, H., Tanabe, A. S., Yamamoto, S. & Sato, H. (2012). High-Coverage ITS Primers for the DNA-Based Identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in Environmental Samples. *PLoS ONE*, 7(7), e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Váczy, K. Z., Németh, M. Z., Csikós, A., Kovács, G. M. & Kiss, L. (2018). *Dothiorella omnivora* isolated from grapevine with trunk disease symptoms in Hungary. *European Journal of Plant Pathology*, 150(3), 817–824. <https://doi.org/10.1007/s10658-017-1323->
- Valdés, L. A., Calero Consuegra, D. L., Gómez, A., Carballo, M. E., Capote, M., González, I., Alvarez, J. M. & Rohde, W. (2017). Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *Colletotrichum* sp. produciendo antracnosis en

mango (*Mangifera indica* L.). *La Granja*, 26(2), 38.
<https://doi.org/10.17163/lgr.n26.2017.04>

Valle-De la Paz, M., Guillén-Sánchez, D., Perales-Rosas, D., López-Martínez, V., Juárez-López, P., Martínez-Fernández, E., Hernández-Arenas, M., Ariza-Flores, R. & Vicuña, A. (2023). *Caracterización de especies de Lasiodiplodia que afectan el cultivo de palto (Persea americana) en la costa peruana*. [Universidad Agraria La Molina].
<http://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/3158/MALMPR00T.pdf>