

1 **Primer reporte de *Botrytis cinerea* causante del moho gris en hojas de uvilla en el norte del**
2 **Ecuador**
3 **First report of *Botrytis cinerea* as the causal agent of gray mold on goldenberry leaves in**
4 **northern Ecuador**

5
6 Renata Lozada¹, Alexis Quintana¹, Jeniffer Yáñez¹
7

8 ¹ Laboratorio de Fitopatología y Control Biológico. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
9 170102, Quito, Ecuador.

10
11 **Resumen.** - La uvilla (*Physalis peruviana* L.) es una especie vegetal nativa de los Andes y de
12 importancia económica para la región. Sus características organolépticas y propiedades bioactivas
13 han despertado interés en el mercado nacional e internacional. Existen varios organismos como virus,
14 bacterias, nematodos y hongos que provocan enfermedades graves en este cultivo. Estos últimos
15 afectan tanto al cultivo como la post cosecha de uvilla. El moho gris es una enfermedad causada por
16 *Botrytis cinerea*. Este hongo produce manchas foliares redondas de color marrón con cubrimiento de
17 micelio, responsable del aspecto de moho gris. Este hongo tiene la capacidad de provocar
18 debilitamiento general de la hoja hasta la muerte de la planta. Por ello, el objetivo de esta
19 investigación fue identificar a *B. cinerea* en cultivos de uvilla de la zona norte del Ecuador. Se
20 muestrearon varias parcelas ubicadas en la provincia de Imbabura. Los aislados fúngicos obtenidos
21 se identificaron a nivel fenotípico y molecular mediante análisis de la región ITS. Las secuencias se
22 compararon con dos bases de datos donde presentaron una similitud del 100 % para *B. cinerea*.
23 Finalmente, los postulados de Koch confirmaron que *B. cinerea* es el hongo causante del moho gris
24 en hojas de los cultivos de uvilla en Ecuador.

25
26 **Palabras clave:** *Botrytis cinerea*, moho gris, postulados de Koch, fitopatógeno, *Physalis peruviana*.

27
28 **Abstract.** - The goldenberry (*Physalis peruviana* L.) is a species plant native to the Andes and
29 economic important for the region. Due to its organoleptic characteristics and bioactive properties,
30 it has aroused interest in the national and international market. Several organisms such as viruses,
31 bacteria, nematodes and fungal cause serious diseases to the crop. The last affect both the crop
32 growing and post-harvest of goldenberry. Gray mold is the disease caused by *Botrytis cinerea*. Round
33 brown leaf spots covered with mycelium giving the appearance of gray mold characterize this disease.
34 This fungus causes general weakening of the leaf until its death. The objective of this research was
35 to identify *B. cinerea* in goldenberry crops in the northern area of Ecuador. Several plots located in
36 the province of Imbabura were sampled. The fungal isolates obtained were identified phenotypically
37 and by molecular techniques that analyzes the ITS region. Sequences were compared with two
38 databases and showed a 100 % similarity for *B. cinerea*. Finally, through Koch's postulates, it was
39 confirmed that *B. cinerea* was the phytopathogenic fungus that causes gray mold in leaves of
40 goldenberry crops in Ecuador.

41
42 **Key words:** *Botrytis cinerea*, gray mold, Koch postulates, phytopathogen, *Physalis peruviana*.

43
44 **Introducción**

45 La uvilla (*Physalis peruviana* L.) también conocida como uchuva o baya dorada es una especie
46 vegetal nativa de los Andes. Esta planta se desarrolla, comúnmente, en zonas altas comprendidas
47 entre 1500 y 3000 msnm. A lo largo de dos años de vida forma un arbusto perenne que alcanza 1.0 -
48 1.6 metros mediante un crecimiento simpodial. Las hojas son aterciopeladas con un tamaño
49 comprendido entre 5 y 15 cm de largo y de 4 hasta 10 cm de ancho con forma de corazón. El capuchón
50 o cáliz es ahuecado y está formado por cinco hojas lobuladas con puntas triangulares que protegen al
51 fruto de ambientes extremos, insectos y patógenos. Posee una raíz resistente que puede llegar a medir
52 más de 60 cm de largo y el tallo es verde de textura suave, pero con ligeras vellosidades (Fischer et

53 al. 2014). La uvilla se caracteriza por sus bayas de color amarillo-anaranjado, de piel lisa en forma
54 globular con sabor ligeramente ácido. Entre las propiedades nutricionales del fruto están: fuente de
55 vitamina A, vitamina C, vitaminas del complejo B, pectina y flavonoides (Corrales-Bernal et al.
56 2015). Además, se le atribuyen distintas propiedades antibacteriales y antiinflamatorias (Çakir et al.
57 2014). El cultivo y la comercialización de uvilla es una de las principales fuentes económicas en
58 Ecuador (Moreno-Miranda et al. 2018). La producción de uvilla se destaca en la provincia del Carchi
59 (40%), seguida de Imbabura (28%) y finalmente Pichincha (6%), sumando más del 70% de
60 producción de la fruta en el país (PROECUADOR 2020). En el 2019, las exportaciones crecieron
61 hacia varios destinos, tanto en Europa como América (PROECUADOR 2020). Datos del Ministerio
62 de Producción Comercio Exterior, Inversiones y Pesca y el Banco Central del Ecuador indican que
63 en el año 2019 se exportaron alrededor de 208 mil dólares de uvilla fresca y un total de 657 mil
64 dólares de uvilla deshidratada, datos que alientan al sector agrícola reflejando un crecimiento en el
65 promedio anual de 53.1 % en comparación de años anteriores (PROECUADOR 2020).

66
67 Los cultivos de uvilla presentan varios problemas fisiológicos relacionados con virus, bacterias y
68 nematodos que provocan enfermedades graves en la planta. Los fitopatógenos de origen fúngico
69 afectan durante el crecimiento de las plantas y la postcosecha, comprometiendo el desarrollo de la
70 planta y, por ende, el rendimiento final del cultivo. Las enfermedades fúngicas más comunes en uvilla
71 son la mancha gris producida por *Cercospora* spp. (Paredes, Yáñez y Marcial-Coba 2021), la muerte
72 descendente ocasionada por *Phoma* spp., la marchitez vascular por *Fusarium oxysporum* y el moho
73 gris causado por *Botrytis cinerea* (Díaz, Chaves-Acuña y Yáñez 2019). El moho gris es una
74 enfermedad que provoca necrosis localizada en su estado inicial y conforme avanza llega a causar la
75 pudrición de las hojas, flores y frutos, acompañado de un cubrimiento externo de micelio. El mismo
76 se esparce con rapidez por toda la planta logrando su pudrición total (Jakobija et al. 2020). El hongo
77 *B. cinerea* es considerado un fitopatógeno muy agresivo, se caracteriza por ser un microorganismo
78 necrotrófico que afecta los cultivos de mora, fresa, tomate y a más de 200 plantas cultivables entre
79 las que se encuentra la uvilla (Marín-Chacón et al. 2017). La diseminación es rápida y se da gracias
80 a la presencia de conidios que son estructuras fácilmente distribuidas mediante corrientes de aire,
81 herramientas o lluvia (Chen et al. 2021). Además, tiene la capacidad de permanecer latente en el
82 tejido de hojas jóvenes y cuando la hoja madura, se activa provocando lesiones redondas de color
83 marrón seguido del cubrimiento de micelio gris (Jakobija et al. 2020).

84
85 En Colombia, existen mayores estudios acerca de *B. cinerea* presente en *P. peruviana*, pero, su
86 importancia radica en el grave deterioro que provoca en el fruto, lo que impide su comercialización.
87 Por ejemplo, se comprobó la presencia de *B. cinerea* en frutos de uvilla listos para distribución, luego
88 de 30 días con secado del cáliz (Novoa et al. 2006; Catarina 2014). Hasta el momento, en el Ecuador,
89 los reportes son escasos en cuanto al manejo y desarrollo tanto en hojas como en fruto. Por ello, existe
90 un vacío dentro del sector agrícola lo que impide un correcto desarrollo de estrategias para el control
91 fitosanitario y crea una rápida pérdida de tiempo y recursos (Roca-Couso et al. 2021).

92
93 El presente estudio tiene como objetivo identificar a *B. cinerea* como causante de la enfermedad moho
94 gris en hojas de uvilla en plantaciones de los Andes de Ecuador. Esta información es requerida como
95 evidencia para la correcta y oportuna identificación de este hongo fitopatógeno. Además, de
96 contribuir con información base para en el control y la actualización del manejo fitosanitario del
97 cultivo de uvilla en el país.

98 99 **Materiales y Métodos**

100 **Área de investigación y muestreo.** - El estudio se realizó en parcelas productoras de uvilla (ecotipo
101 manzana) ubicadas en la provincia de Imbabura (0° 15' 25.279" N 78° 20' 22.372" W), mediante
102 muestreo aleatorio estratificado (Hernández y Carpio 2019). Se escogieron 25 plantas por parcela y
103 se seleccionaron las hojas de uvilla que presentaron síntomas propios del moho gris causado por *B.*
104 *cinerea* (Richards et al. 2021). Las muestras fueron recolectadas en fundas de plástico con cierre

105 hermético y etiquetadas con fecha, hora de recolección y georreferencia. Se trasladaron en cadena de
106 frío (4 °C) hasta el laboratorio de Fitopatología y Control Biológico de la Pontificia Universidad
107 Católica del Ecuador (PUCE), para su procesamiento en un lapso máximo de 24 horas (Agrios 2005).
108 **Aislamiento y purificación del hongo fitopatógeno.** - Las muestras fueron previamente lavadas con
109 agua potable para eliminar contaminantes superficiales. Se cortó con un bisturí estéril, pedazos de 5
110 mm² de las lesiones foliares. Los cortes fueron desinfectados durante un minuto en hipoclorito de
111 sodio al 1 %, seguido de etanol al 70 % por 30 segundos y, por último, dos enjuagues con agua
112 destilada estéril por un minuto (Agrios 2005). Los pedazos de hoja se sembraron en cajas Petri con
113 PDA (Papa Dextrosa Agar), suplementado con 80 mg/L de gentamicina para inhibir el crecimiento
114 bacteriano (Morales-Restrepo y Cardona-Castro 2018). Las cajas de Petri se incubaron a temperatura
115 ambiente (23 ± 2 °C) durante siete días hasta obtener colonias típicas de *B. cinerea* (Farrera et al.
116 2007; Javed et al. 2017), además, se realizó el cultivo monospórico en medios de cultivo PDA y MEA
117 (Malt Extract Agar; Swart et al. 2001).

118 **Identificación macroscópica y microscópica.** - Para la identificación macroscópica se realizó un
119 control cotidiano a los cultivos puros durante 14 días. Los aspectos considerados respecto a la colonia
120 fueron: color, textura, bordes y presencia de esclerocios, características que se compararon con
121 estudios previos (Mamode Ally et al. 2021). El ancho y el largo de 10 esclerocios formados en
122 cultivos con PDA fueron medidos (Plaza et al. 2018). Para la identificación microscópica se utilizaron
123 cajas Petri con PDA de siete días de crecimiento (Farrera et al. 2007). El microcultivo se llevó a cabo
124 en una caja mono Petri de vidrio esterilizada con papel absorbente de base, se añadió una varilla de
125 vidrio sobre el papel para dar elevación al portaobjeto, sobre el que se colocó una lámina de 15 mm²
126 de agar PDA. Con la ayuda de un asa en punta se inocularon conidios en los cuatro lados de la lámina,
127 sobre la que se añadió un cubreobjetos. Adicionalmente, se agregó 1 mL de agua estéril sobre el papel
128 absorbente, para mantener humedad, se selló la caja mono Petri con Parafilm® y se incubó a 23 ± 2
129 °C durante siete días (Medina et al. 1999). En otro portaobjetos se colocó una gota de agua destilada
130 en el centro y cubrió con el cubreobjeto. Los conidios y los conidióforos fueron las estructuras
131 fúngicas observadas mediante microscopio óptico con aumento total de 400 X. Por último, se midió
132 el tamaño de 50 conidios por cepa (Wang et al. 2011) con la herramienta digital DinoCapture 2.0.
133 Las medidas de los esclerocios (ancho por largo en milímetros) y los conidios (ancho por largo en
134 micras) fueron tomadas durante el crecimiento del hongo en PDA.

135 **Identificación molecular.** - El ADN fúngico se extrajo de los aislados que crecieron en PDA por
136 siete días, mediante el kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega 2019). La PCR (reacción
137 en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés), amplificó la región ITS (Espaciadores
138 Transcritos Internos, por sus siglas en inglés). Los cebadores utilizados fueron ITS-1 e ITS-4 (ITS1:
139 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'; ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White et al.
140 1990; Kwon et al. 2011; Fajarningsih 2016). El volumen final de cada reacción fue de 25 µL y los
141 parámetros de amplificación fueron: la desnaturalización inicial a 95 °C durante 1 minuto, seguido
142 por 30 ciclos de desnaturalización durante 1 minuto a 95 °C, el alineamiento de 30 segundos a 55 °C,
143 la elongación por 1 minuto a 72 °C, para concluir la elongación final por 5 minutos a 72 °C. A
144 continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % (95 voltios por 60 minutos)
145 (Núñez-Ríos et al. 2013). Los productos de la PCR se enviaron a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur)
146 donde fueron purificados y secuenciados por el método de Sanger. Las secuencias resultantes *forward*
147 y *reverse* fueron alineadas con la herramienta informática Clustal W del programa MEGA X (Notte
148 et al. 2021). Se identificó coincidencias de estas secuencias en las bases de datos GenBank del NCBI
149 mediante la herramienta BLAST y en MycoBank (Wang et al. 2011; Gümrückü et al. 2016).

150 **Postulados de Koch.** - Se sembraron 27 plántulas en macetas plásticas con sustrato estéril compuesto
151 de vermiculita (PRO-MIX®) y regadas a capacidad de campo diariamente. Las plantas se
152 mantuvieron en invernadero con una temperatura aproximada de 20 - 25 °C y 70 - 79 % de humedad
153 (Gao et al. 2018). El inóculo se preparó con cinco cepas de *B. cinerea* obtenidas de 14 cajas Petri con
154 agar PDA, dos cajas por cada aislado del hongo fitopatógeno con crecimiento de siete días a 25 °C
155 (Mirzaei et al. 2007). Se cortaron discos de agar de 5 mm de diámetro para inoculación directa (Wang
156 et al. 2011; ÖZer y Bayraktar 2014). La inoculación del patógeno se realizó cuando las plantas

157 presentaron cinco hojas verdaderas. En 12 plantas se colocaron discos de agar con micelio de acuerdo
158 con el tamaño de la hoja (entre 2 o 4), mientras tres plantas control fueron rociadas, únicamente, con
159 agua destilada estéril (Gümürkcü et al. 2016). Las plantas tratadas se cubrieron con fundas de
160 polietileno por 24 horas para mantener alta humedad y favorecer la infección. Al día siguiente, las
161 plantas regresaron al invernadero donde se mantuvo una temperatura de 23 ± 2 °C y humedad relativa
162 alrededor de 90% (Yu et al. 2014). El monitoreo del apareamiento de los síntomas de la enfermedad
163 fue diario. Al presentarse los síntomas típicos en las hojas de uvilla se reaisló el patógeno en cajas
164 con medio PDA y se realizó la identificación molecular amplificando la región ITS mediante la
165 metodología descrita anteriormente.

166

167 **Resultados**

168 **Identificación y caracterización morfológica de aislados fúngicos**

169 Se obtuvieron resultados positivos de la presencia de *B. cinerea* en las parcelas seleccionadas. Los
170 síntomas sospechosos de moho gris en hojas de uvilla se presentaron como pequeñas lesiones
171 redondas de color marrón con una capa de micelio de color crema y un halo amarillo (Figura 1). Del
172 aislamiento y purificación de las muestras foliares se obtuvieron cinco aislados que presentaron
173 características macroscópicas similares a *B. cinerea*. Las colonias mostraron un crecimiento óptimo
174 en los dos medios de cultivo probados. En PDA presentaron crecimiento micelial moderado, el
175 micelio aéreo con textura esponjosa de color crema en el anverso y coloración gris en el reverso, con
176 una médula blanquecina en el centro de la caja (Figura 1). Los aislados OT05-03, OT05-08, OT05-
177 10, OT05-21 y OT05-25 (códigos internos del laboratorio) desarrollaron conidios a los 14 días de
178 crecimiento y al menos 10 esclerocios de color marrón oscuro - negro, de tamaño irregular,
179 organizados al azar. El aislado OT05-03 no desarrolló esclerocios en ninguno de los medios de
180 cultivo. Mientras que, en MEA se observaron colonias con crecimiento abundante, micelio aéreo
181 esponjoso de color blanco en el anverso y también coloración blanca en el reverso. A los siete días se
182 observó la presencia de conidióforos en el micelio (Figura 1). La descripción microscópica mediante
183 microcultivo permitió observar al menos cinco conidióforos y más de 50 conidios por campo óptico
184 (Figura 1). En general, todos los conidióforos se presentaron rectos y ramificados de color marrón
185 oscuro, los cuales contenían los conidios (forma de racimo de uvas). Los conidios se presentaron
186 unicelulares, ovoides la mayoría hialinos y otros de color marrón oscuro. Los conidios midieron de
187 ancho a partir 6.34 a 9.18 y de largo 5.58 a 8 μ m, mientras las medidas de los esclerocios fueron
188 desde 2.75 a 8.7 de ancho, hasta 3.25 a 6.75 mm de largo.

189 **Identificación molecular**

190 Los amplicones obtenidos de la PCR presentaron un tamaño de 500 pb según la comparación con la
191 escalera de peso molecular y mediante electroforesis en agarosa al 1.5%. Al comparar las secuencias
192 consenso con las bases de datos del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI/
193 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y de Mycobank (<https://www.mycobank.org/>), se obtuvo un
194 porcentaje de cobertura e identidad del 100 % con el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* (Tabla 1).

195 **Postulados de Koch.** - Los cinco aislados inoculados en las plantas de uvilla provocaron marchitez
196 en las hojas. La infección por disco de agar permitió que todas las cepas presentaran alta
197 patogenicidad, provocando moho gris en el 100 % de las plantas infectadas. En los primeros siete
198 días se observó clorosis alrededor de las heridas de las hojas, eventualmente se desarrollaron manchas
199 redondas de color marrón oscuro. A los 14 días, el micelio cubrió las lesiones y, a los 18 días se
200 produjo la colonización total de la hoja con micelio, lo que resultó en marchitamiento, debilidad
201 extrema y muerte (Figura 1).

202

203 **Discusión**

204 El género *Botrytis* engloba 35 especies, pero la única especie capaz de infectar a una amplia gama de
205 cultivos y causante del moho gris es *B. cinerea* (Kozhar y Peever 2018). Del total de muestras
206 analizadas, se obtuvieron cinco aislados identificados, molecularmente, como *B. cinerea*. Las hojas
207 presentaron lesiones pequeñas, redondas, de color gris con un borde amarillento (clorosis localizada).
208 Dichos síntomas foliares del moho gris, causados por *B. cinerea* en el cultivo de uvilla, se diferencian

209 de los provocados por otro tipo de hongos fitopatógenos. Las cepas fúngicas que se desarrollaron en
210 medio PDA presentaron micelio aéreo de color crema con textura esponjosa a los siete días, y después
211 de 10 días se obtuvieron tonalidades en gris, con el desarrollo de esclerocios a las dos semanas de
212 crecimiento, similar a lo descrito por Leiva-Mora et al. (2019), en la investigación en fresas (*Fragaria*
213 *vesca*), donde indican que las colonias del hongo en PDA son de color crema y, posteriormente,
214 cambian a color gris, haciéndose visible la presencia de conidióforos en el micelio. El tamaño de los
215 esclerocios de los aislados obtenidos fue de 2 a 9 mm, resultado que coincidió con los reportados por
216 Erper et al. (2015) quienes obtuvieron medidas de entre 1 y 4 mm por estructura. Los esclerocios son
217 considerados como estructuras importantes de este hongo, debido a que intervienen en la
218 supervivencia de la especie permitiendo la resistencia del hongo a condiciones ambientales extremas
219 (Terrones-Salgado et. al. 2019). Por otra parte, el crecimiento del hongo en medio MEA presentó
220 esporulación abundante, el micelio fue de textura esponjosa de color blanco. Estas características son
221 muy similares a las obtenidas por Stewart y Long (1987), quienes describen que *B. cinerea* esporula
222 de manera abundante en MEA y señalan que la cantidad de luz que reciben los cultivos no influye en
223 su crecimiento. En consecuencia, al esporular en menor tiempo, la presencia de esclerocios también
224 se identificó antes de las dos semanas. Adicionalmente, este hongo fitopatógeno se caracteriza por
225 crecer de manera óptima en medios de cultivo que cuenten con un pH ácido (Terrones-Salgado et. al.
226 2019). En cuanto a los caracteres microscópicos, todos los aislados presentaron conidióforos rectos y
227 ramificados de color marrón oscuro. Mientras que los conidios se observaron unicelulares, ovoides,
228 la mayoría hialinos y otros de color marrón oscuro con un tamaño de entre 6,1 a 9,4 μm de ancho x
229 5,1 a 8,9 μm de largo. Estas características son similares a las presentadas por Pei et al. (2019) donde
230 los conidios se presentaron hialinos a marrón oscuro, ovoides con tamaños que van desde 3,9 a 6,1
231 μm de ancho x 6,7 a 13,5 μm de largo (promedio 8,5 x 5,7 μm). Así también, coinciden con las
232 características microscópicas reportadas por Apolonio-Rodríguez et al. (2017), donde observaron
233 conidios unicelulares, ovoides, hialinos con medidas de 8-15 μm de ancho x 6-9 μm de largo. Esto
234 permitió identificar que, los conidios de *B. cinerea* evaluados presentaron un rango de tamaño similar.
235 Tradicionalmente, las características morfológicas como patrón de crecimiento micelial, grado de
236 esporulación, forma de conidios y conidióforos, y especificidad del hospedero, hacen posible
237 distinguir entre las especies de *Botrytis* (Badotti et al. 2017). Sin embargo, no son suficientes para la
238 identificación de especie dentro de este género. En el estudio de Notte et al. (2021) sobre la
239 identificación y caracterización de *B. cinerea*, se sugiere el uso de tres genes codificadores de
240 proteínas nucleares (G3PDH, HSP60 y RPB2) para la identificación de las especies. Estos análisis se
241 deberían llevar a cabo en el caso de que la secuenciación de la región ITS no obtuviera resultados
242 aceptables, lo cual no se presentó en este estudio, por lo que, se identificó a los cinco aislados fúngicos
243 como *B. cinerea* luego de comparaciones en las bases de datos mencionadas anteriormente.
244 En cuanto a los postulados de Koch, se confirmó que, el hongo aislado es el agente causal de la
245 enfermedad en las hojas de plántulas sanas de uvilla. Estudios demuestran que las vías de penetración
246 del patógeno se logran por heridas (Catarina 2014). La infección por disco de agar logró que los cinco
247 aislados que se utilizaron para inocular las plántulas de uvilla produjeran síntomas. Se observaron
248 lesiones pequeñas circulares de color marrón cubiertas de micelio dando el aspecto de moho gris. Las
249 lesiones se extendieron rápidamente sobre las hojas de las plántulas inoculadas y, eventualmente, se
250 presentó el marchitamiento general. Síntomas similares a los reportados en el estudio realizado por
251 Chen et al. (2021) donde, los resultados de la prueba de patogenicidad con tampones de micelio en
252 hojas, obtuvieron manchas necróticas de color marrón, y en la etapa más avanzada de la enfermedad
253 reportaron propagación de las lesiones hasta inducir a la marchitez y defoliación de la planta. Wang
254 et al. (2011) describieron los mismos síntomas utilizando el mismo método de inoculación. Al inicio
255 de la infección, reportaron pequeñas manchas de color marrón, que luego se expandieron aumentando
256 su tamaño, siendo visible la presencia de micelio de color gris en las lesiones. Por último, se realizó
257 un re-aislamiento del tejido foliar con síntomas para su identificación y secuenciación, donde se
258 confirmó que el hongo causante del moho gris fue *B. cinerea* cumpliendo así con los postulados de
259 Koch. Dichos hallazgos, resultan comparables con lo obtenido por Terrones-Salgado et al. (2019).
260 Cabe destacar que, los muestreos se realizaron en seis parcelas geográficamente distintas, y se aisló

261 el fitopatógeno únicamente en la parcela ubicada en los andes septentrionales de Ecuador
262 (Guchingero, Otavalo). Entre los distintos sitios, se evidenció un cambio en el manejo de los cultivos
263 que podría estar ligado a la no presencia de *B. cinerea*. En las parcelas donde no se aisló el patógeno
264 en cuestión se identificó la aplicación de buenas prácticas de agricultura (BPA), entre ellas, un
265 correcto manejo de desechos. Esto impide la formación de estructuras de supervivencia del hongo y,
266 por ende, contaminación del cultivo (Villasanti y Godoy 2012). Por otro lado, se ha descrito que,
267 rangos de humedad situados entre 90 y 100 % favorecen al crecimiento del hongo (Kozha y Peveer
268 2018; Leiva-Mora et al. 2019). Este particular coincide con lo encontrado en la parcela de la que se
269 aisló *B. cinerea*. A diferencia de los demás sitios que no mostraron a simple vista sistemas de riego
270 implementados. Lo anteriormente descrito, abre la oportunidad de investigaciones que correlacionen
271 y demuestren si las BPA y los distintos porcentajes de humedad inciden o no en la aparición de la
272 enfermedad, severidad e incidencia dentro de un campo de uvas.
273 Este estudio reportó por primera vez la presencia de *B. cinerea* en tejido foliar de cultivos de uva
274 de la zona norte del Ecuador. Los aislados del fitopatógeno se identificaron mediante análisis
275 fenotípico y molecular. Se confirmó el agente causal de moho gris mediante postulados de Koch. La
276 información obtenida en este estudio servirá como una herramienta para próximas investigaciones
277 relacionadas control biológico o busquen comprender la epidemiología de la enfermedad confirmada
278 en el país.

279

280 **Agradecimientos**

281 La presente investigación fue financiada por la Pontificia Universidad Católica del Ecuador,
282 Convocatoria de proyectos de investigación, 2018. El reconocimiento especial a la empresa
283 TERRAFERTIL por facilitar la logística de los muestreos y las plántulas de uva para la
284 investigación.

285

286 **Contribuciones de los Autores**

287 Renata Lozada: redacción de la versión inicial del manuscrito, manejo del experimento y adquisición
288 de datos, Alexis Quintana: revisión y edición del manuscrito, Jeniffer Yáñez: concepción y diseño
289 del estudio, y revisión del manuscrito.

290

291 **Conflicto de Intereses**

292 Los autores declaran no tener conflictos de interés.

293

294

295

296

297

298

299

300

301

302

303

304

305

306

307

308

309

310

311

312

Referencias

Agrios GN. 2005. Plant Pathology (5th ed.).

Apolonio-Rodríguez I, Franco-Mora O, Salgado-Siclán ML, Aquino-Martínez JG. 2017. In vitro inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Revista mexicana de fitopatología*. 35(2).

Badotti F, De Oliveira FS, Garcia CF, Vaz ABM, Fonseca PLC, Nahum LA, Oliveira G, Góes-Neto A. 2017. Effectiveness of ITS and sub-regions as DNA barcode markers for the identification of Basidiomycota (Fungi). *BMC Microbiol*. 17(1). doi:10.1186/s12866-017-0958-x.

Çakir Ö, Pekmez M, Çepni E, Candar B, Fidan K. 2014. Evaluation of biological activities of *Physalis peruviana* ethanol extracts and expression of Bcl-2 genes in HeLa cells. *Food Science and Technology*. 34(2). doi:10.1590/fst.2014.0060.

Catarina P. 2014. Uchuva (*Physalis peruviana*) fruta andina para el mundo. Alicante (España): Cebas-CSIC.

Chen J, Zhu JZ, Li XG, He AG, Xia ST, Zhong J. 2021. *Botrytis cinerea* causing gray mold of *Polygonatum sibiricum* (Huang Jing) in China. *Crop Protection*. 140. doi:10.1016/j.cropro.2020.105424.

- 313 Chen PH, Chen RY, Chou JY. 2018. Screening and evaluation of yeast antagonists for biological
 314 control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *Mycobiology*. 46(1).
 315 doi:10.1080/12298093.2018.1454013.
- 316 Corrales-Bernal A, Vergara AI, Rojano B, Yahia E, Maldonado ME. 2015. Características
 317 nutricionales y antioxidantes de la uchuva colombiana (*Physalis peruviana* L.) en tres estadios de su
 318 maduración. *Arch Latinoam Nutr*. 65(4).
- 319 Díaz J, Chaves-Acuña W, Yáñez J. 2019. Diversity of fungal communities inhabiting symptomatic
 320 leaves of Cape gooseberry (*Physalis peruviana*) in the Ecuadorian Andes. *Revista Ecuatoriana de*
 321 *Medicina y Ciencias Biológicas*. 40(2). Doi.org/10.26807/remcb.v40i2.762
- 322 Erper I, Celik H, Turkkan M, Cebi Kilicoglu M. 2015. First report of *Botrytis cinerea* on golden berry.
 323 *Australas Plant Dis Notes*. 10(1). doi:10.1007/s13314-015-0175-0.
- 324 Fajarningsih ND. 2016. Internal Transcribed Spacer (ITS) as Dna Barcoding to Identify Fungal
 325 Species: a Review. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 11(2).
 326 doi:10.15578/squalen.v11i2.213.
- 327 Farrera REP, Zambrano V a. E, Ortiz MF a. 2007. Identificación de hongos asociados a enfermedades
 328 del fruto de la fresa en el municipio Jáuregui del estado Táchira. *Rev Fac Agron*. 24.
- 329 Fischer G, Almanza-Merchán PJ, Miranda D. 2014. Importancia y cultivo de la uchuva (*Physalis*
 330 *peruviana* L.). *Rev Bras Frutic*. 36(1). doi:10.1590/0100-2945-441/13
- 331 Gao P, Qin J, Li D, Zhou S. 2018. Inhibitory effect and possible mechanism of a *Pseudomonas* strain
 332 QBA5 against gray mold on tomato leaves and fruits caused by *Botrytis cinerea*. *PLoS One*. 13(1).
 333 doi:10.1371/journal.pone.0190932.
- 334 Gümrükcü E, Polat, Sülü G, Kitapçı A, Baysal. 2016. First report of grey mold caused by *Botryotinia*
 335 *fuckeliana* on golden berry. *Plant Dis*. 100(3). doi:10.1094/PDIS-08-15-0908-PDN.
- 336 Hernández CE, Carpio N. 2019. Introducción a los tipos de muestreo. *ALERTA Revista Científica*
 337 *del Instituto Nacional de Salud*. 2(1). doi:10.5377/alerta.v2i1.7535.
- 338 Jakobija I, Bankina B, Klūga A. 2020. Morphological variability of *botrytis cinerea* – causal agent of
 339 Japanese quince grey mould. *Agronomy Research*. 18(1). doi:10.15159/AR.20.045.
- 340 Javed S, Javaid A, Anwar W, Majeed RA, Akhtar R, Naqvi SF. 2017. First report of botrytis bunch
 341 rot of grapes caused by *Botrytis cinerea* in Pakistan. *Plant Dis*. 101(6). doi:10.1094/PDIS-05-16-
 342 0762-PDN.
- 343 Kozhar O, Peever TL. 2018. How does *Botrytis cinerea* infect red raspberry? *Phytopathology*.
 344 108(11). doi:10.1094/PHTO-01-18-0016-R.
- 345 Kwon JH, Cheon MG, Choi O, Kim J. 2011. First report of *Botrytis cinerea* as a Postharvest pathogen
 346 of blueberry in Korea. *Mycobiology*. 39(1). doi:10.4489/MYCO.2011.39.1.052.
- 347 Leiva-Mora M, Gabriel Panimboza-Yanzapanta J, Rivas-Figueroa F, Rivera-Casignia A, Carpio C.
 348 2019. Agresividad diferencial entre aislados de *Botrytis cinerea* Pers. en *Fragaria vesca* L. cv. Albion.
 349 *Rev Prot Veg*. 34(1).
- 350 Mamode Ally N, Neetoo H, Ranghoo-Sanmukhiya VM, Hardowar S, Vally V, Gungoosingh-
 351 Bunwaree A, Maudarbaccus F, Coutinho TA, Vojvodić M, Bulajić A. 2021. First report of botrytis
 352 cinerea causing gray mold on greenhouse-grown tomato plants in mauritius. *Plant Dis*. 105(9).
 353 doi:10.1094/PDIS-01-21-0219-PDN.
- 354 Marín Chacón MA, Rivera-Coto G, Villalobos-Moya K, Orozco-Rodríguez R, Orozco-Cayasso S.
 355 2017. Evaluación de hongos antagonistas de *botrytis cinerea* pers., en plantaciones de mora, Costa
 356 Rica. *Agronomía Costarricense*. 41(1). doi:10.15517/rac.v41i1.29737.
- 357 Medina L, Alihomar T, Herrera J, Perozo Y, Gonzales L. 1999. Estudio de hongos en bibliotecas de
 358 la Universidad de Carabobo-Valencia. *Salus*. 3(1): 1-17.
- 359 Mirzaei S, Goltapeh EM, Shams-Bakhsh M. 2007. Taxonomical studies on the genus *Botrytis* in Iran.
 360 *Journal of Agricultural Technology*. 3(1).
- 361 Morales-Restrepo N, Cardona-Castro N. 2018. Métodos de diagnóstico en micología. *Rev CES Med*.
 362 32(1): 41-52.
- 363 Moreno-Miranda C, Moreno R, Guamanquispe C, Molina J, Molina P. 2018. Understanding
 364 alternative agri-food networks in Ecuador: an exploration of the socio-productive structure of the cape

- 365 gooseberry value chain (*Physalis peruviana*) in the Inter-Andean region. *Agroindustrial Science*. 8(2).
366 doi:10.17268/agroind.sci.2018.02.07.
- 367 Notte AM, Plaza V, Marambio-Alvarado B, Olivares-Urbina L, Poblete-Morales M, Silva-Moreno
368 E, Castillo L. 2021. Molecular identification and characterization of *Botrytis cinerea* associated to the
369 endemic flora of semi-desert climate in Chile. *Curr Res Microb Sci*. 2.
370 doi:10.1016/j.crmicr.2021.100049.
- 371 Novoa R, Bojacá M, Galvis J, Fischer G. 2006. La madurez del fruto y el secado del cáliz influyen
372 en el comportamiento poscosecha de la uchuva, almacenada a 12 °C (*Physalis peruviana* L.). *Agron*
373 *Colomb*. 24(1).
- 374 Núñez-Ríos T, Leyva-Mir SG, Rodríguez-Pérez JE, Mariscal-Amaro LA. 2013. Etiología y control
375 de la necrosis de flores y pudrición de frutos de pepino en Morelos, México. *Rev Chapingo Ser Hortic*.
376 19(2). doi:10.5154/r.rchsh.2012.10.059.
- 377 Özer G, Bayraktar H. 2014. First report of *Botrytis cinerea* on Cornelian cherry. *Australas Plant Dis*
378 *Notes*. 9(1). doi:10.1007/s13314-014-0126-1.
- 379 Pei YG, Tao QJ, Zheng XJ, Li Y, Sun XF, Li ZF, Qi XB, Xu J, Zhang M, Chen HB, et al. 2019.
380 Phenotypic and genetic characterization of *Botrytis cinerea* population from kiwifruit in Sichuan
381 Province, China. *Plant Dis*. 103(4). doi:10.1094/PDIS-04-18-0707-RE.
- 382 Plaza V, Bustamante C, Silva-Moreno E, Castillo L. 2018. First report of *Botrytis cinerea* causing
383 gray mold disease on the endemic plant *Echinopsis coquimbana* in the Coquimbo Region, Chile. *Plant*
384 *Dis*. 102(7). doi:10.1094/PDIS-03-17-0445-PDN.
- 385 Promega. 2019. Techinal Manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit Wizard® Genomic DNA
386 Purification Kit. Technical Bulletin.
- 387 PROECUADOR. 2020. Oferta de uvilla ecuatoriana en mercados potenciales. Ministerio de
388 producción, comercio exterior, inversiones y pesca.
- 389 Richards JK, Xiao CL, Jurick WM. 2021. *Botrytis* spp.: A contemporary perspective and synthesis
390 of recent scientific developments of a widespread genus that threatens global food security.
391 *Phytopathology*. 111(3). doi:10.1094/PHYTO-10-20-0475-IA.
- 392 Roca-Couso R, Flores-Félix JD, Rivas R. 2021. Mechanisms of action of microbial biocontrol agents
393 against *botrytis cinerea*. *Journal of Fungi*. 7(12). doi:10.3390/jof7121045.
- 394 Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W, Bolchacova E,
395 Voigt K, Crous PW, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a
396 universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(16).
397 doi:10.1073/pnas.1117018109.
- 398 Stewart TM, Long PG. 1987. Sporulation of *Botrytis cinerea* in the dark. *New Zealand Journal of*
399 *Experimental Agriculture*. 15(3). doi:10.1080/03015521.1987.10425587.
- 400 Swart WJ, Tesfaendrias MT, Terblanche J. 2001. First Report of *Botrytis cinerea* on Kenaf in South
401 Africa. *Plant Dis*. 85(9). doi:10.1094/pdis.2001.85.9.1032b.
- 402 Terrones-Salgado J, Nieto-Angel D, Nava-Díaz C, Téliz-Ortiz D, García-Velasco R, Vallejo-Pérez
403 MR, Sánchez-García P. 2019. *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en
404 México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*. 37(3).
405 doi:10.18781/r.mex.fit.1906-1.
- 406 Villasanti C, Godoy N. 2012. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas para el productor hortofrutícola.
407 2nd. Santiago de Chile (Chile): FAO.
- 408 Wang H-C, Li W-H, Wang M-S, Chen Q-Y, Feng Y-G, Shi J-X. 2011. First Report of *Botrytis cinerea*
409 Causing Gray Mold of Tobacco in Guizhou Province of China. *Plant Dis*. 95(5). doi:10.1094/pdis-
410 01-11-0064.
- 411 White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal
412 RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Genetics and*
413 *Evolution*. 2(3).
- 414 Yu L, Zhao JR, Xu SG, Su Y, Gao D, Srzednicki G. 2014. First report of gray mold on
415 *Amorphophallus muelleri* caused by *Botrytis cinerea* in China. *Plant Dis*. 98(5). doi:10.1094/PDIS-
416 08-13-0855-PDN.

417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448

FIGURAS

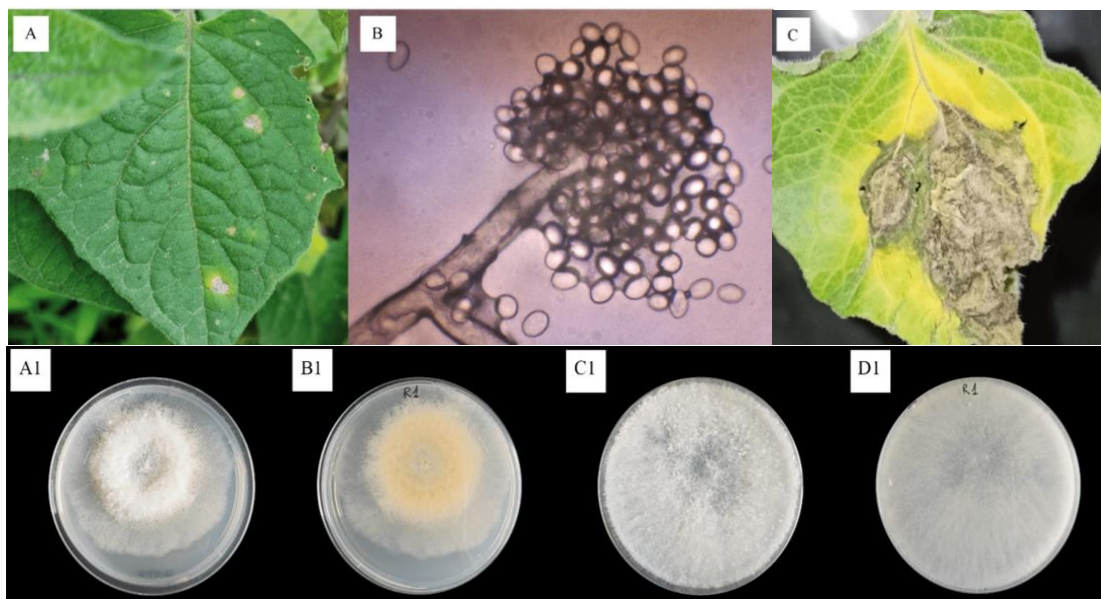


Figura 1. A) Hoja de uvilla con manchas de color gris, característica de *Botrytis cinerea* en campo. B) Conidióforo con aumento total de 400X. C) Marchitamiento general de la hoja a los 18 días después de la inoculación (postulados de Koch). Colonias de *Botrytis cinerea* después de siete días de incubación, en PDA, anverso (A1) y reverso (B1) y en MEA, anverso (C1) y reverso (D1).

TABLAS

Tabla 1. Identificación molecular de las cepas fúngicas aisladas mediante coincidencias de la secuencia de la región ITS en las bases de datos de GenBank (NCBI) y Mycobank.

Cepa	Número de acceso de referencia	Porcentaje de cobertura e identidad	Identidad
OT05-03	MK370589.1 (GenBank) KX229751.1 (Mycobank)	100	<i>Botrytis cinerea</i>
OT05-08	MN853356.1 (GenBank) MG204872.1 (Mycobank)	100	<i>Botrytis cinerea</i>
OT05-10	MT422213.1 (GenBank) KY984483.1 (Mycobank)	100	<i>Botrytis cinerea</i>
OT05-21	MT218334.1 (GenBank) MG560199.1 (Mycobank)	100	<i>Botrytis cinerea</i>
OT05-25	MN853683.1 (GenBank) MG204872.1 (Mycobank)	100	<i>Botrytis cinerea</i>