



**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA**

FACULTAD DE AGRONOMIA

DEPARTAMENTO DE FITOPATOLOGIA

# Identificación de hongos de madera de las principales zonas productoras de palto Hass del Perú

A. Vicuña <sup>1</sup>, W. Apaza <sup>1</sup>, V. Escobedo <sup>2</sup>, J. D. Carrillo<sup>3</sup>, A. Eskalen <sup>3</sup>

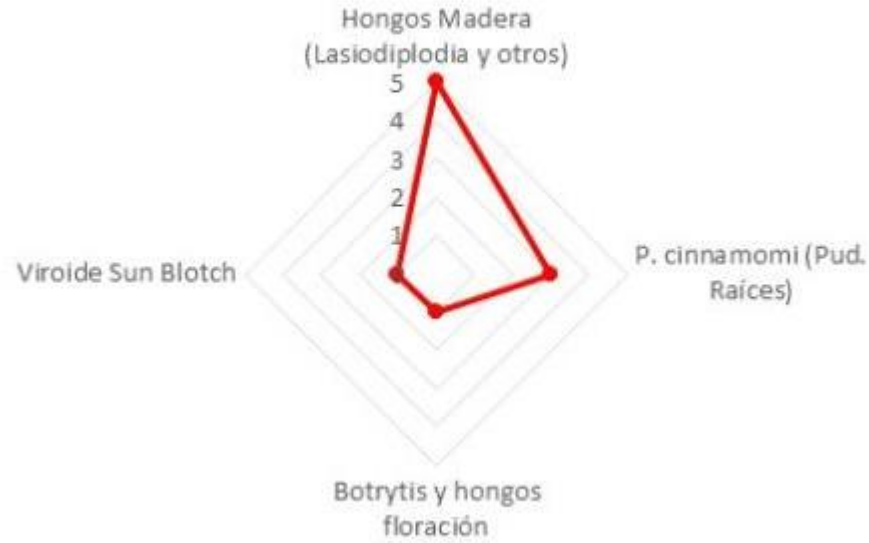
<sup>1</sup>. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima – Perú.

<sup>2</sup>. Asociación de Productores y Exportadores de Palta ‘Hass’ del Perú – PROHASS, Perú.

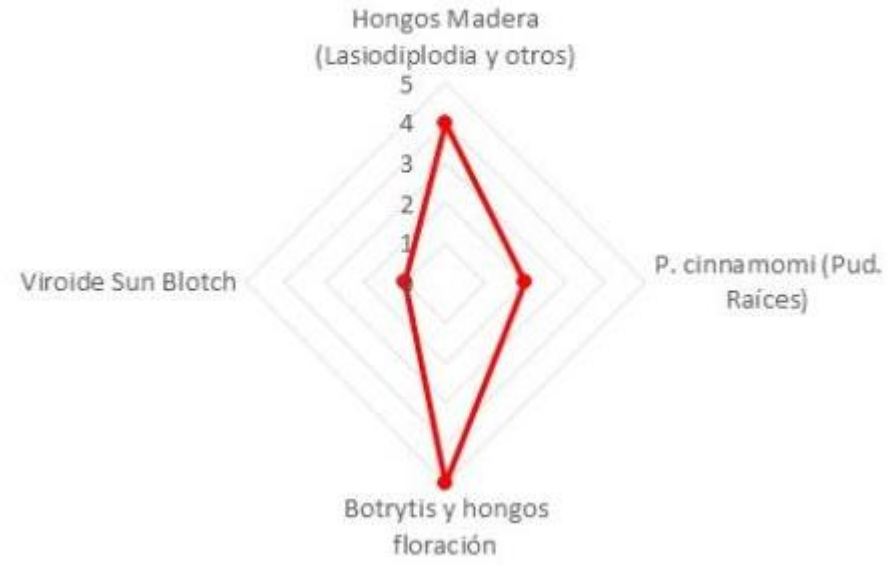
<sup>3</sup>. Department of Plant Pathology and microbiology. University of California, Riverside, USA



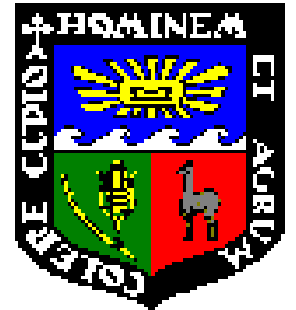
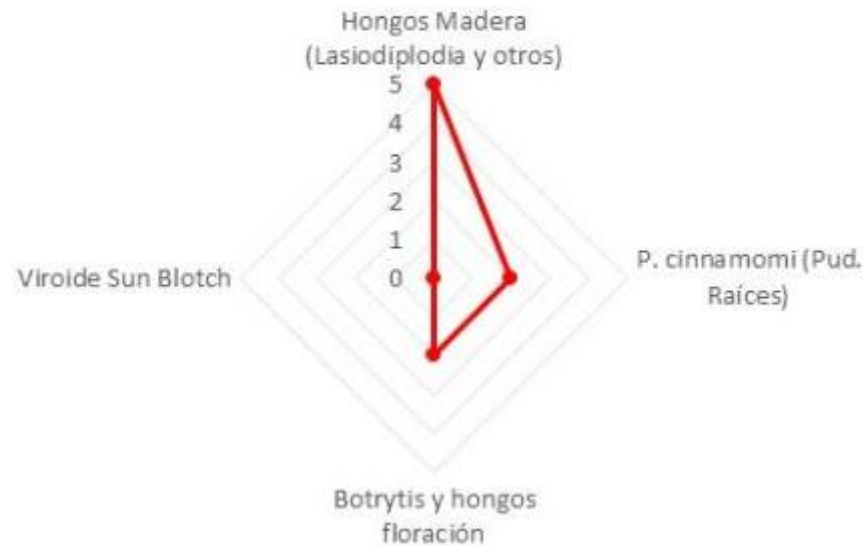
## Chavimochic



## Cañete - Chincha



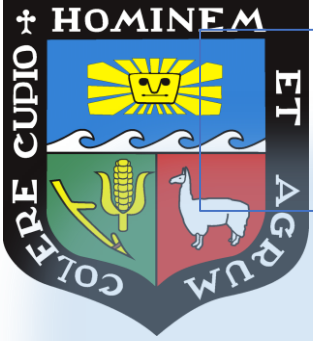
## Ica - Nasca - Arequipa



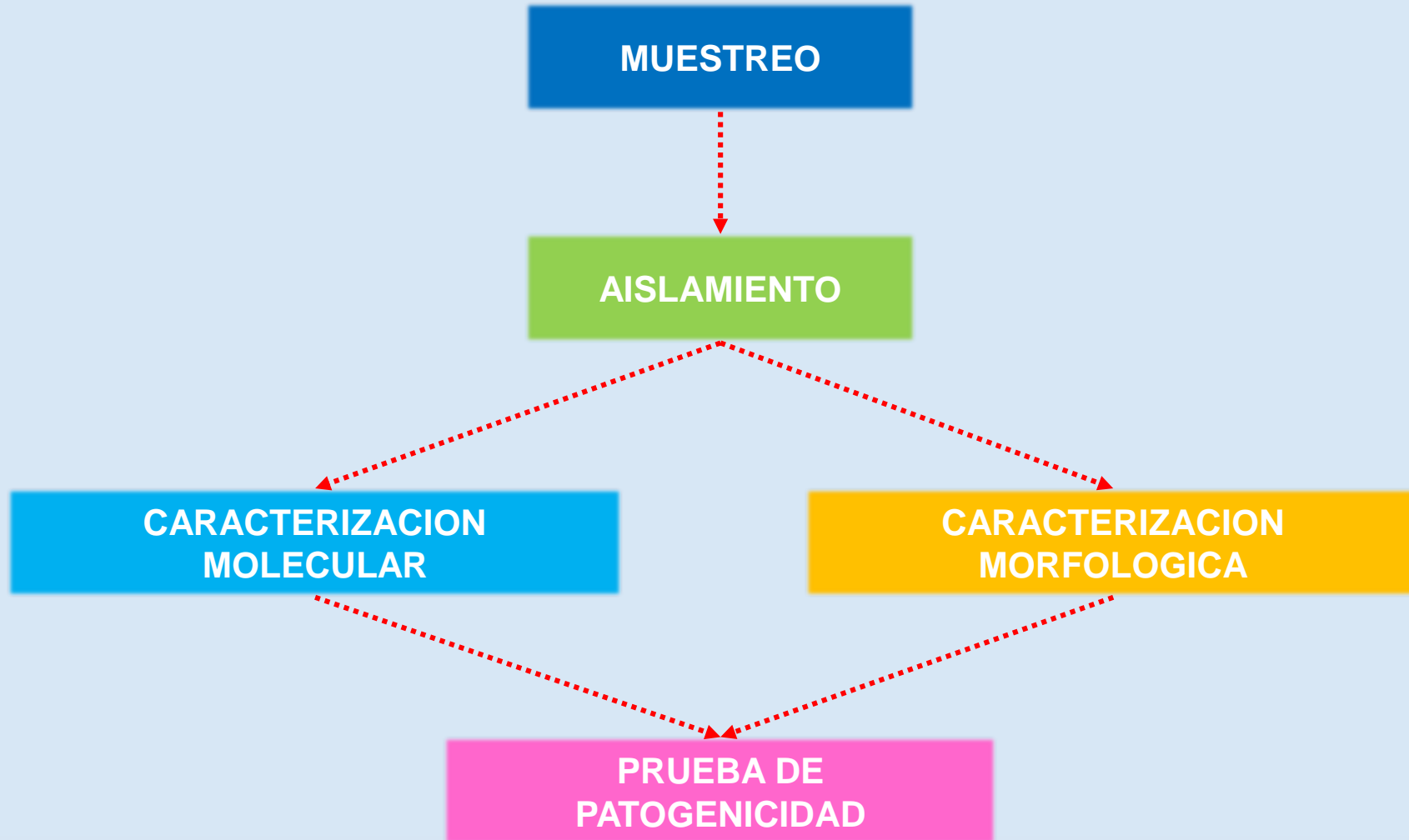


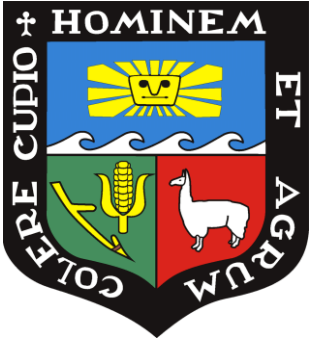
# OBJETIVOS

- Identificar los hongos de madera en las principales zonas productoras de palto Hass en la costa del Perú
- Caracterizar morfológica y molecularmente los principales hongos de madera de palto Hass.
- Evaluar la distribución de las diferentes especies hongos de madera que afectan a cultivo de palto en la costa peruana.



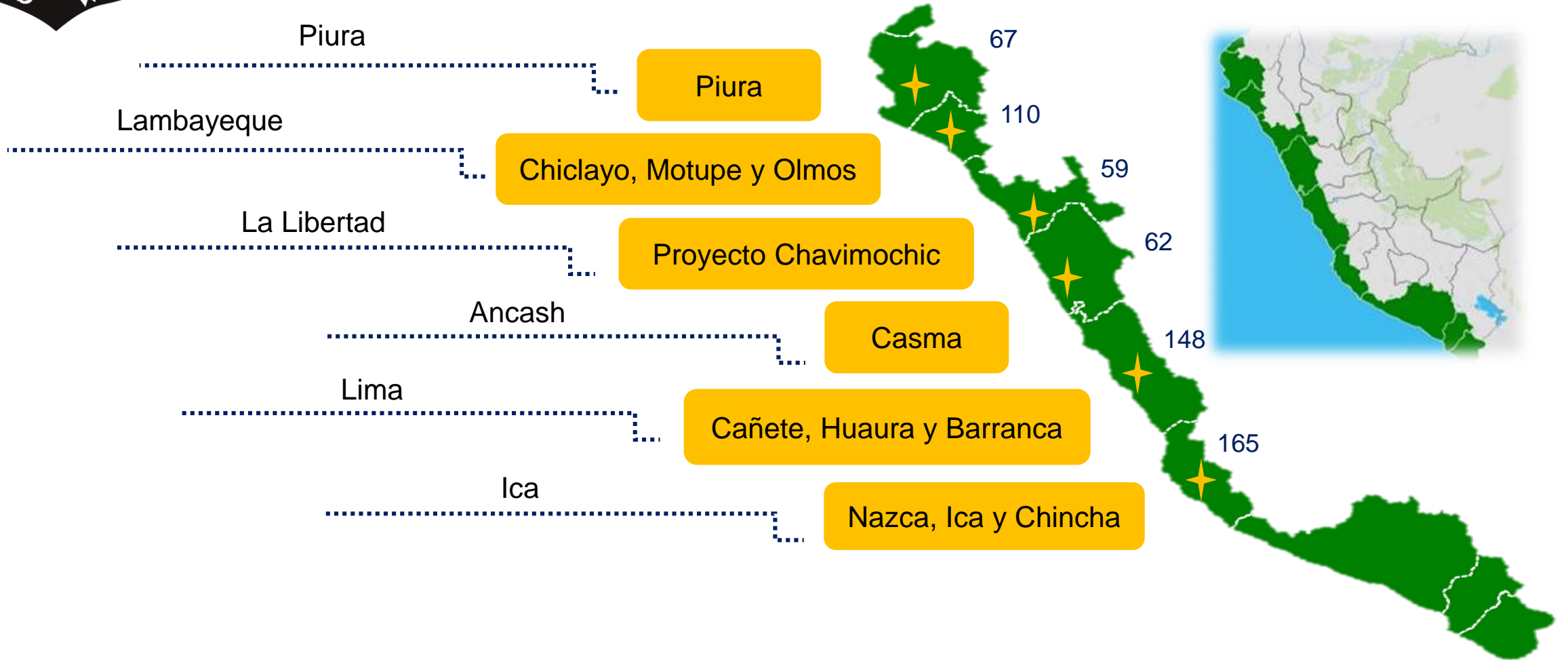
# METODOLOGIA



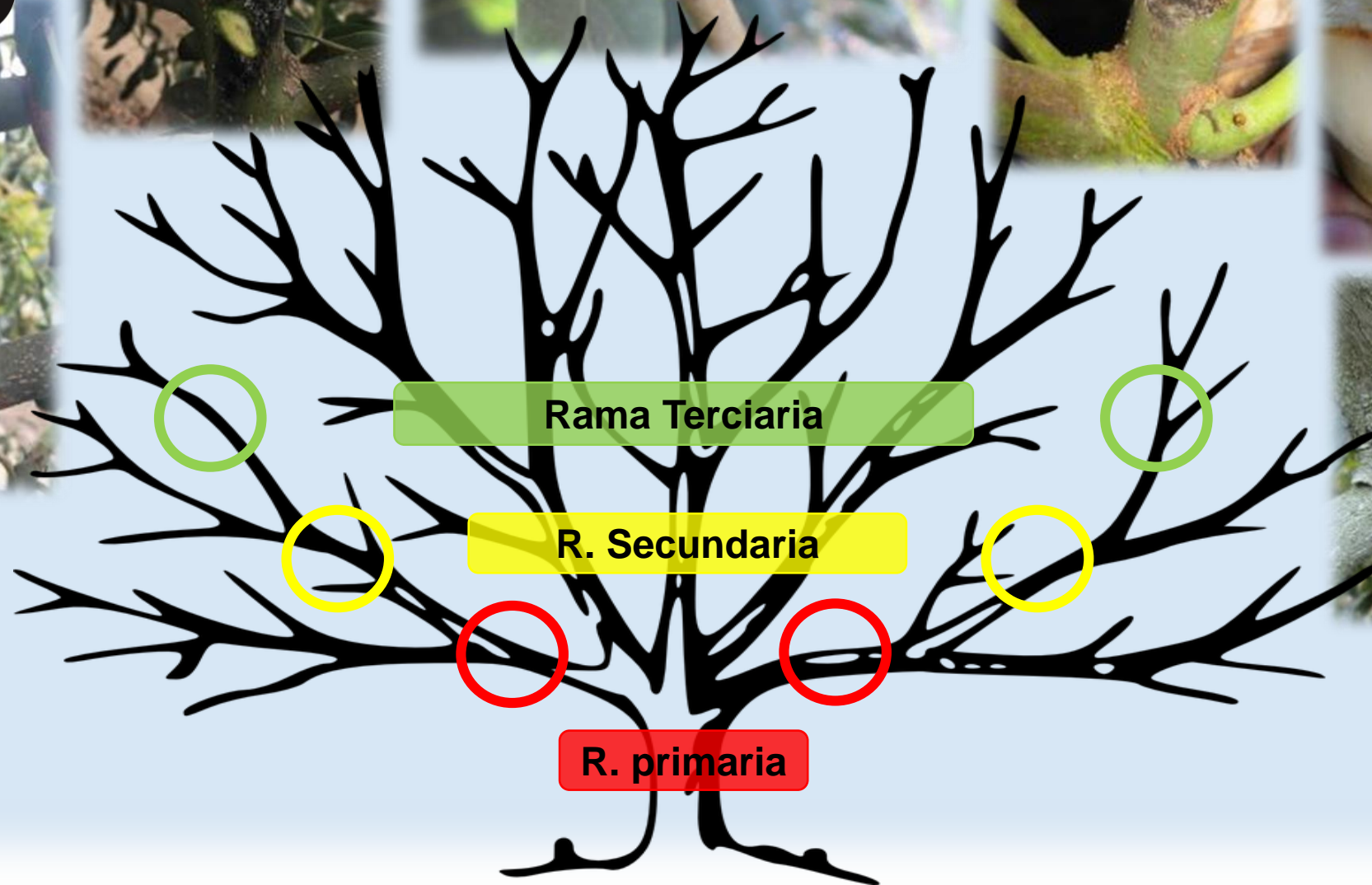


# Muestreo

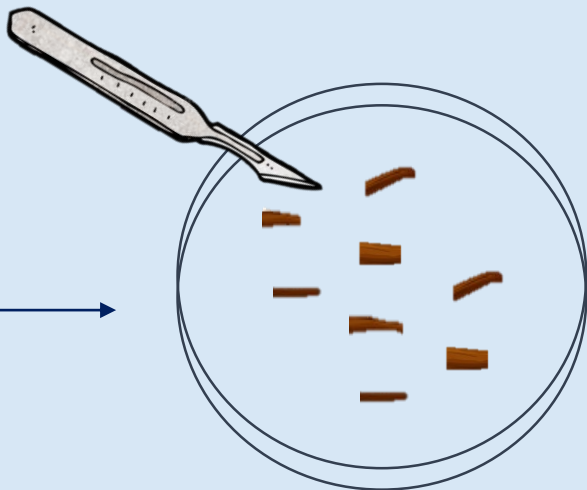
**611** N° de muestras



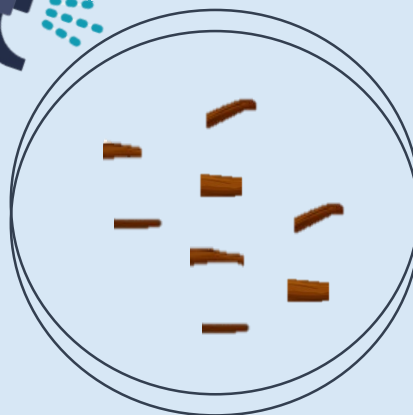
611 Muestras Totales<sup>5</sup>



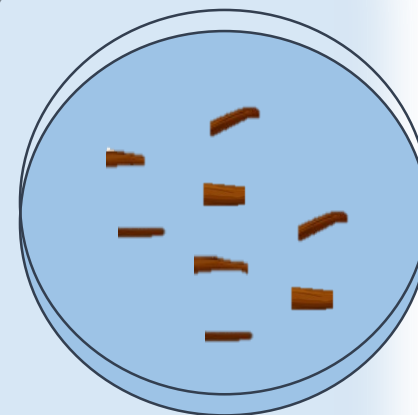
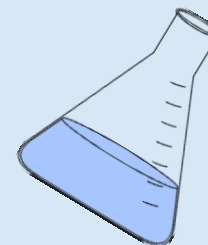
# Aislamiento



Alcohol 70%  
NaOCL 1%



Agua Destilada estéril



Medio Papa Dextrosa Agar Oxytetraciclina





# Caracterización morfológica

en el estudio de:

Morfología de la colonia.

Características conidiales.

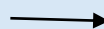
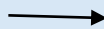
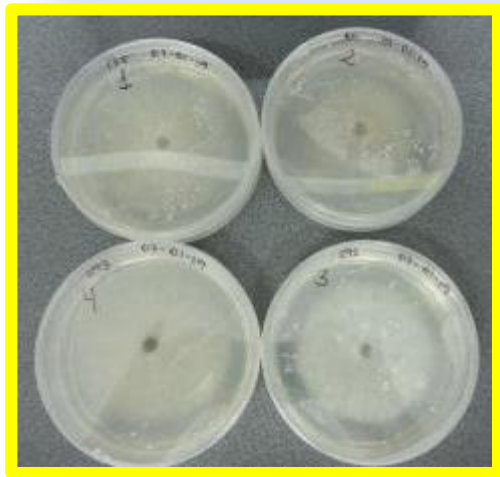
Tasa de crecimiento a diferentes temperaturas.



# Caracterización molecular



## ➤ Extracción y purificación de ADN



Colonias de los aislados fungicos con un día de crecimiento.

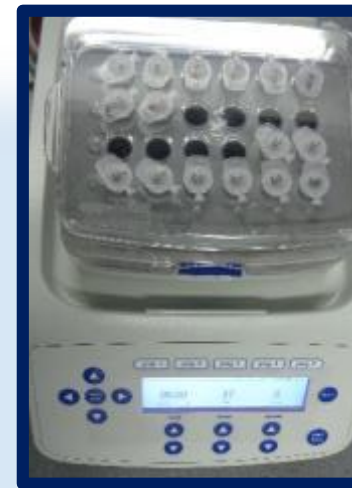
Lisis mecánica con micropistilo estéril entre micelio y buffer de extracción.

Se agregó 300µl de Cloroformo: Alcohol Isoamílico (24:1)

Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. a 20°C.



Se agregó 300 $\mu$ l de 2 propanol (1:1)



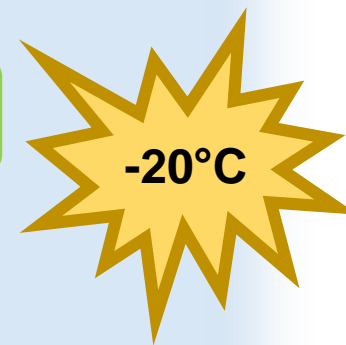
Baño maría a 37°C por 30 min.



Se colocaron en nuevos tubos.



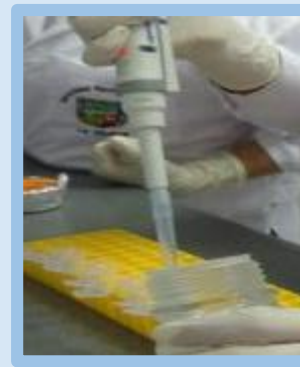
Se extrajo 300 $\mu$ l. de fase acuosa.



Se realizaron movimientos suaves con la mano.



Se centrifugó a 12000 rpm por 5 min. a 4°C.



Se agregó 1ml de etanol 70%



Se centrifugó a 12000 rpm por 10 min. a 4°C.



Se desechó fase acuosa.



Se dejó secar por una noche.



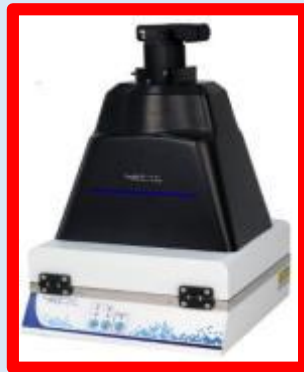
Se resuspendió en 50µl de EDTA.



Se realizó la lectura en Nanodrop.



PCR en termociclador



Fotodocumentador



Transiluminador



Electroforesis

## ➤ PCR

La reacción en cadena polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador usando dos marcadores diferentes: cebadores oligonucleótidos (espaciador transcrito interno) ITS1 y ITS4 (White et al 1990); y EF1-728F y EF1-986R para el factor de elongación de la traducción (TEF 1) (Carbone & Kohn 1999).

## ➤ Secuenciamiento

Las muestras se secuenciaron en el laboratorio de la Universidad de California en Riverside (UCR) a cargo del Dr. Akif Eskalen.

## ➤ Árbol filogenético



# Prueba de patogenicidad

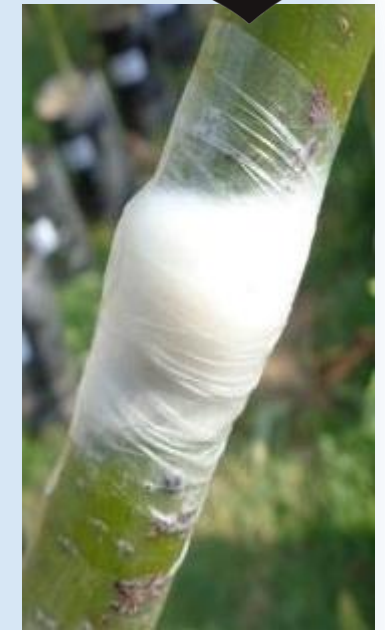
## ➤ Inoculación



Se realizó la herida con un sacabocado.



Se colocó disco con micelio.



Se colocó algodón húmedo y se forró con PARAFILM.



## ➤ Reaislamiento



Se realizaron cortes cerca al punto de inoculación abarcando el cancro y tejido sano.



Cortes de aprox. 0.5cm de ancho y largo.



Los trozos se desinfectaron con alcohol 70%, se enjuagaron con agua destilada estéril, se secaron y sembraron en PDAO.

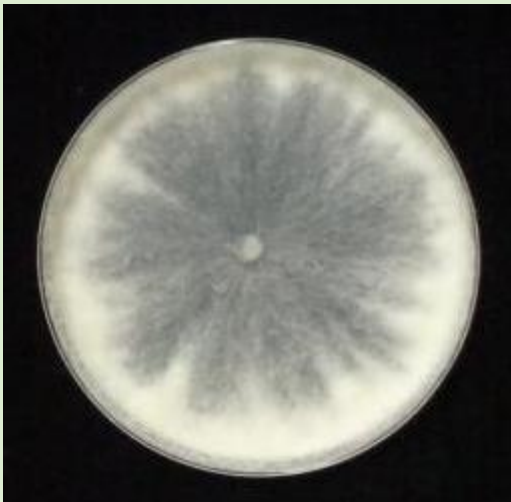


# RESULTADOS



## Caracterización morfológica

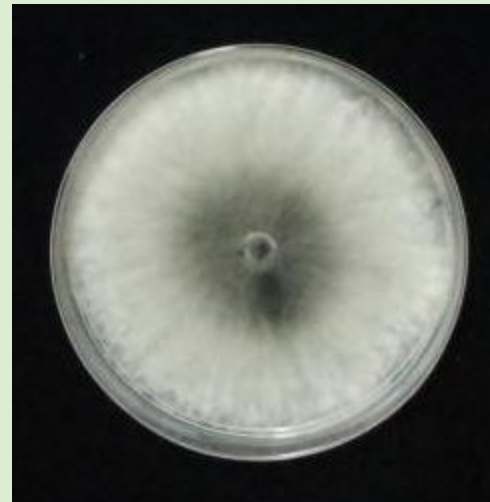
### ➤ Morfología de la colonia



*L. pseudotheobromae*



*L. theobromae*

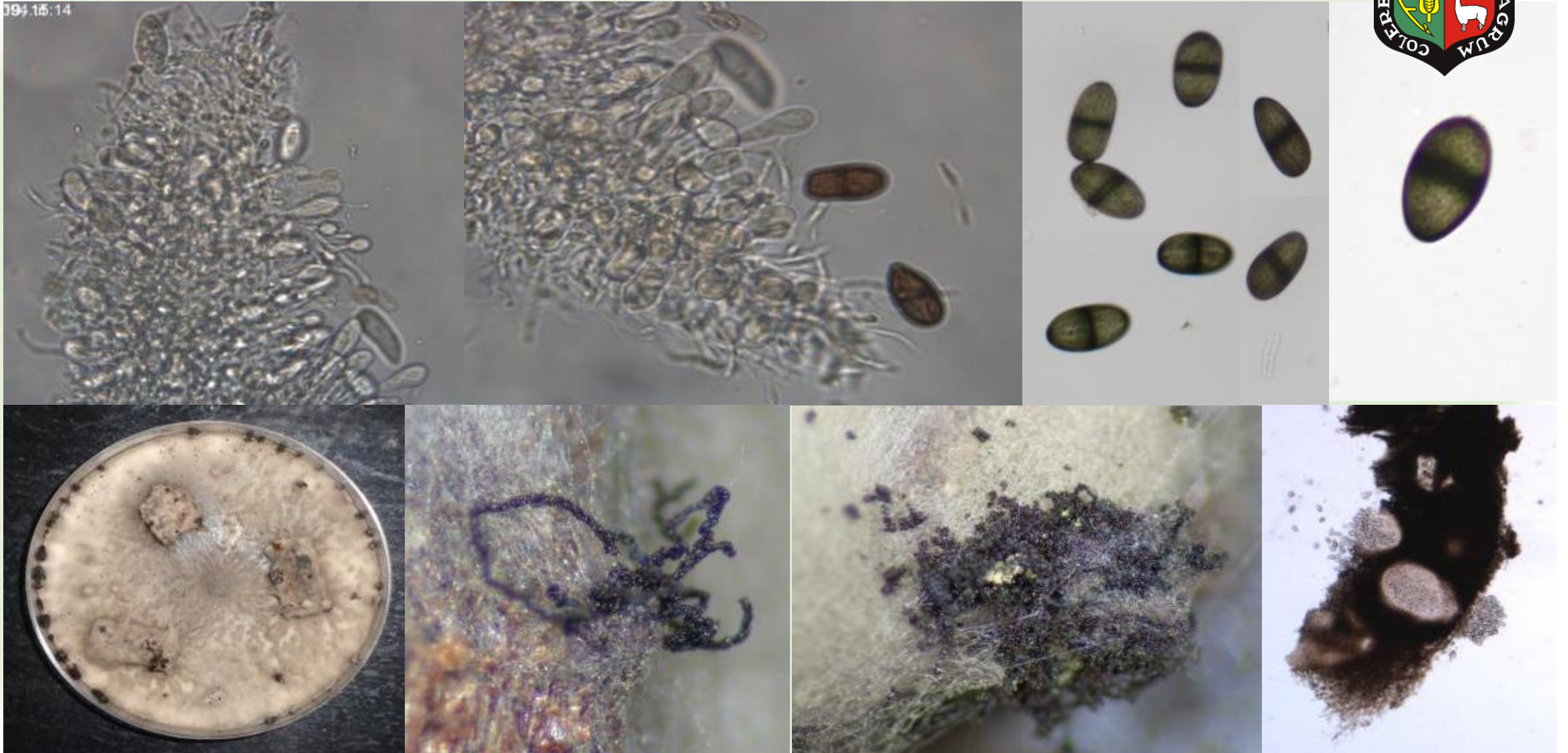


*L. egyptiaca*



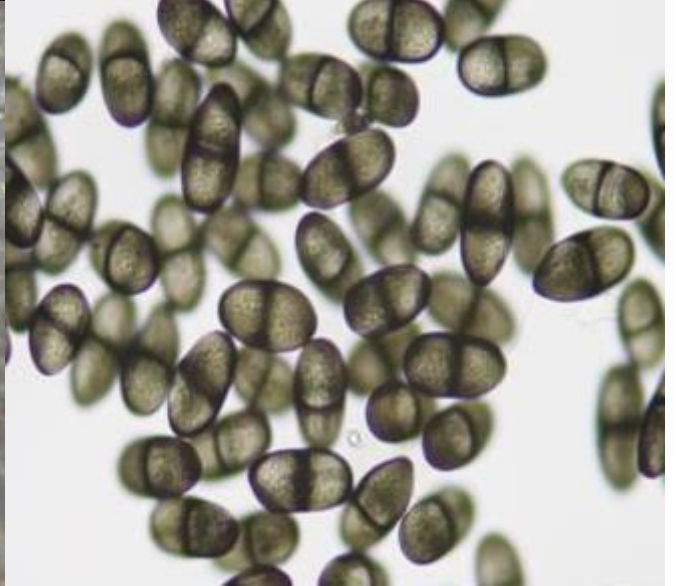
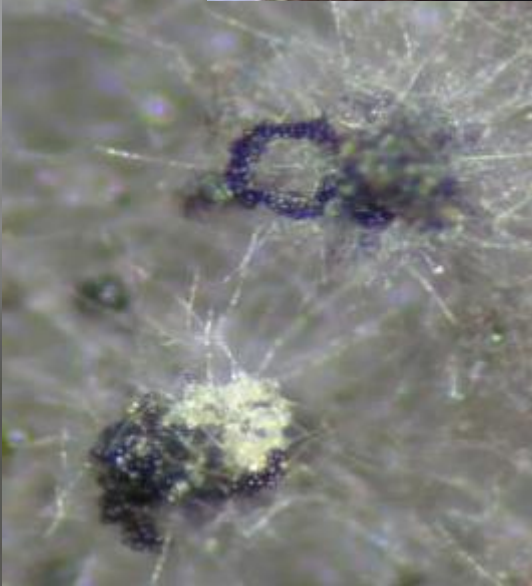
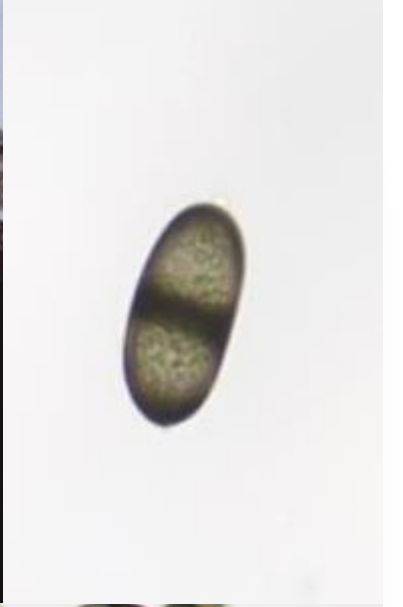
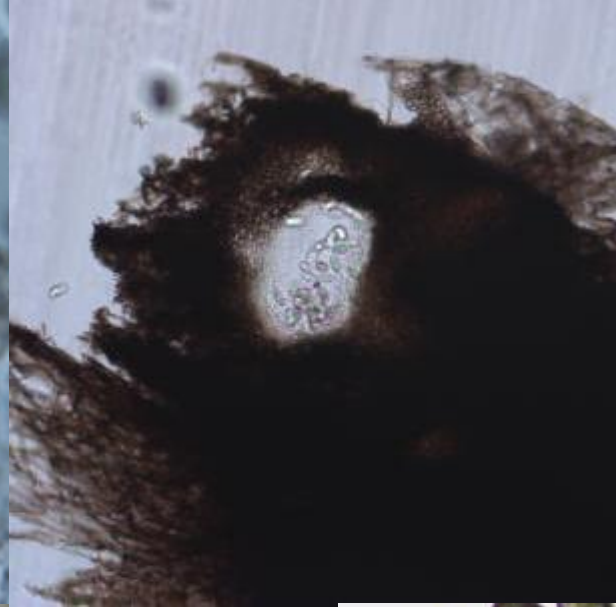
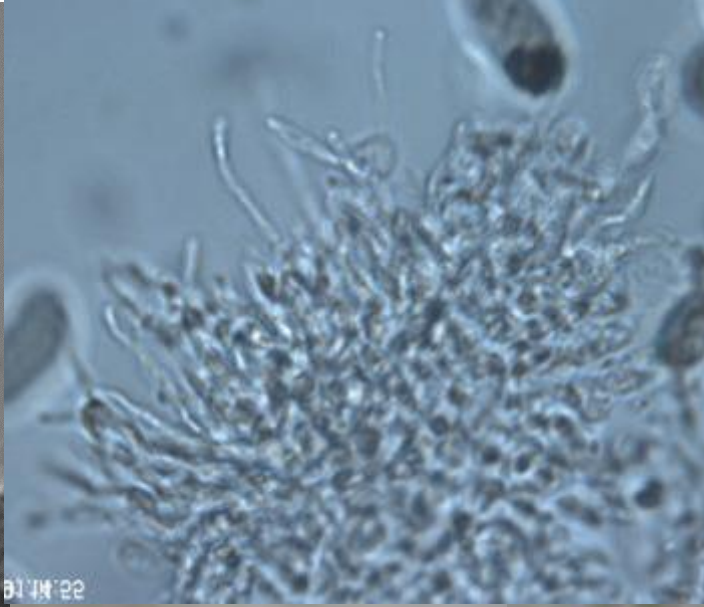
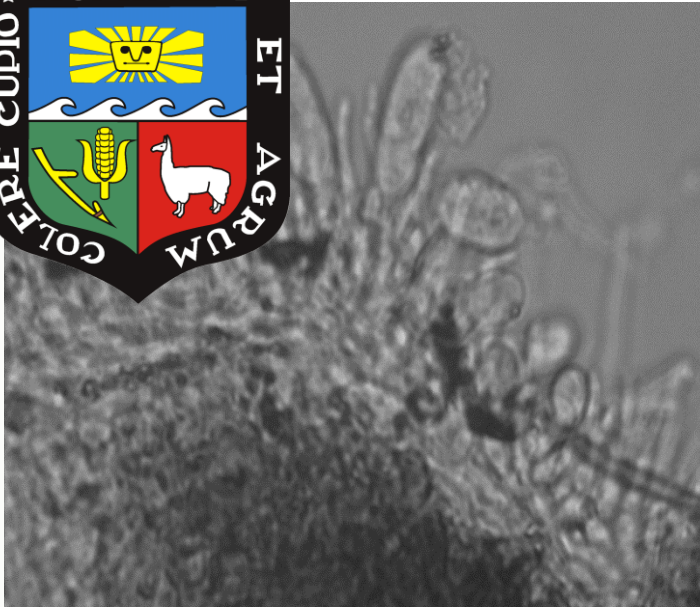
*L. parva*

## ➤ Estructuras microscópicas

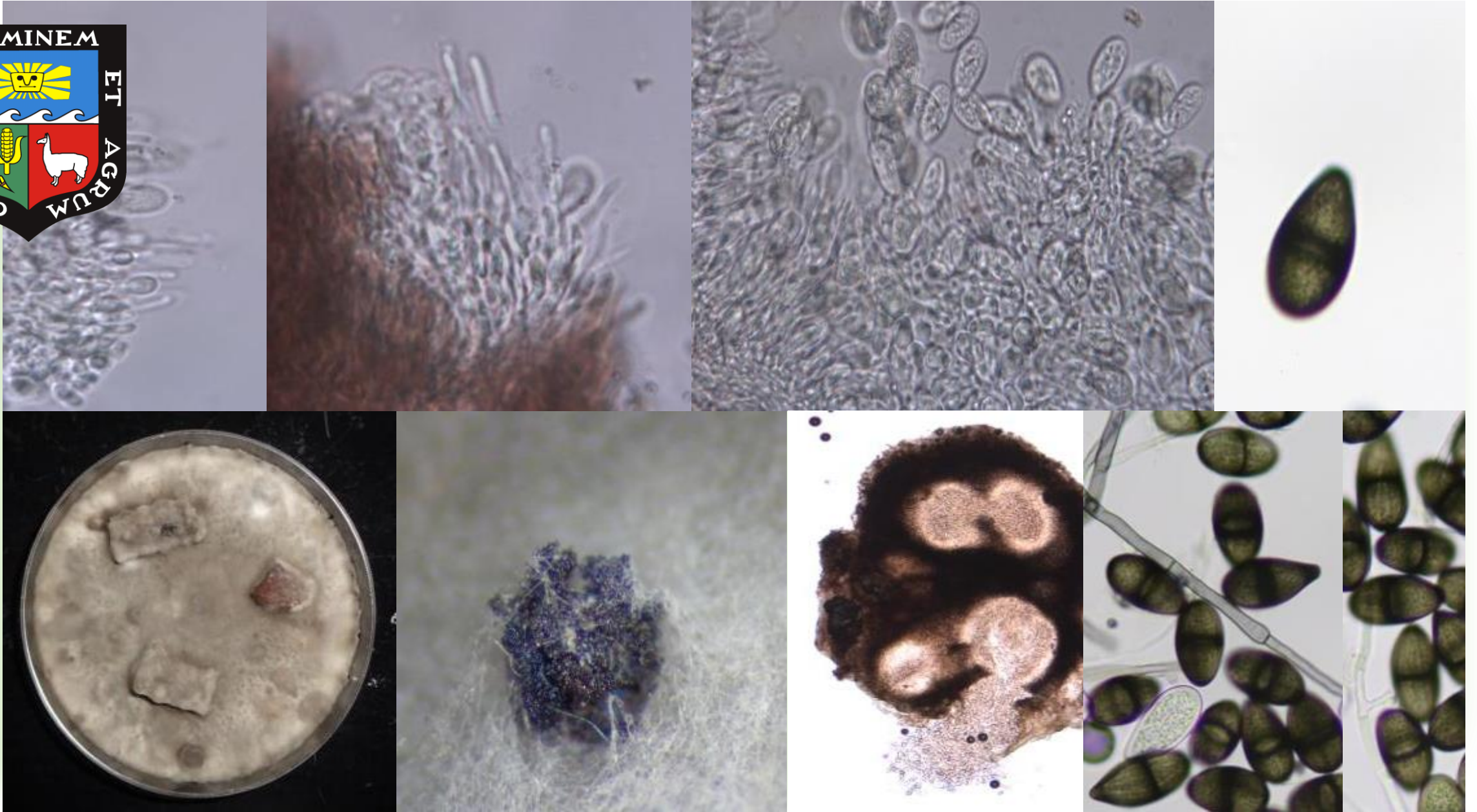


*L. theobromae*

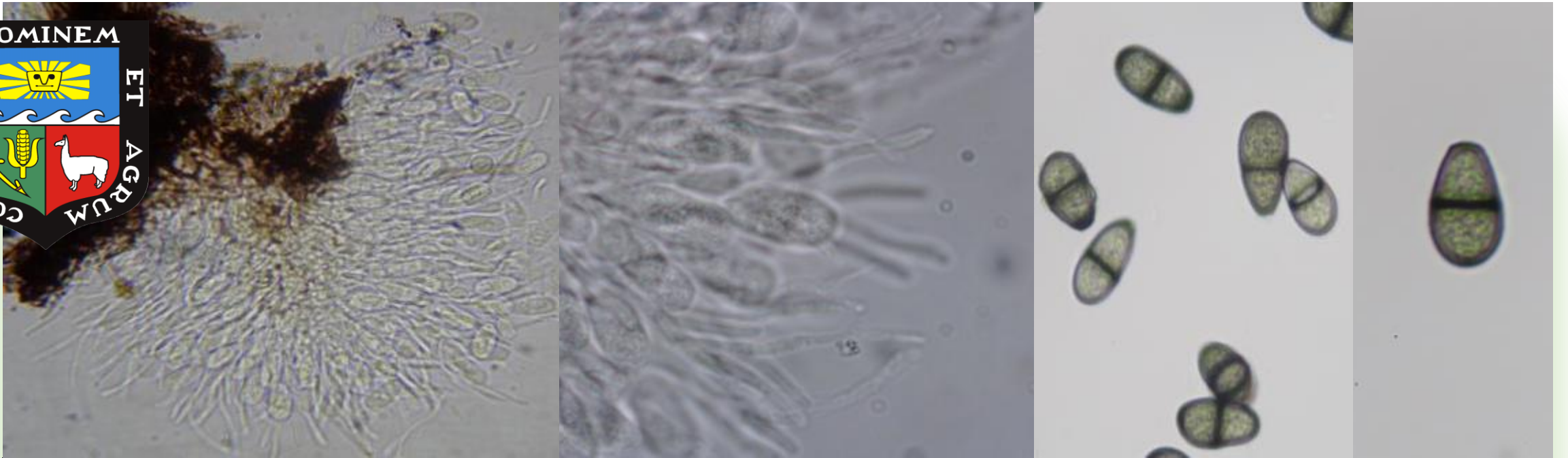




*L. pseudotheobromae*



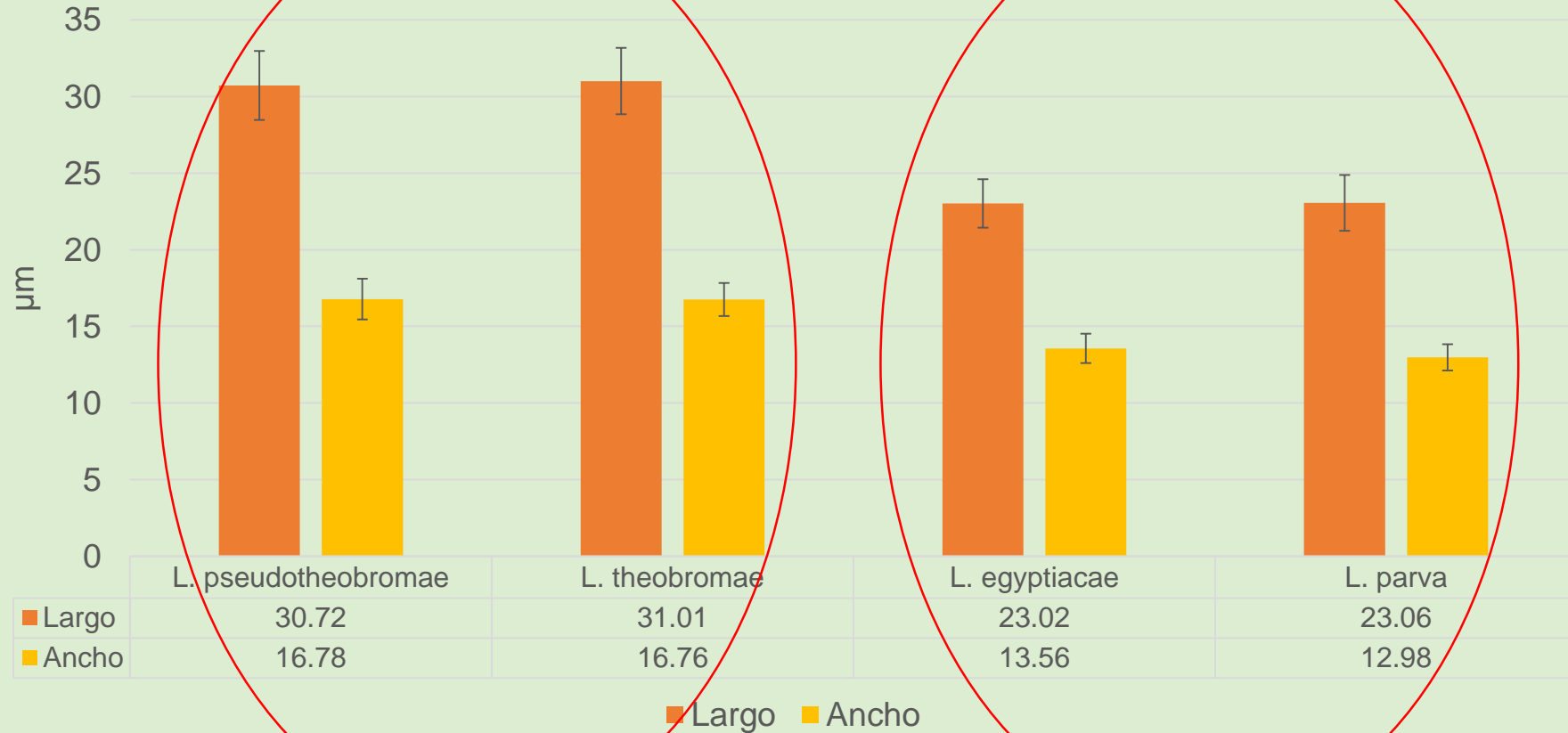
*L. egyptiaca*



*L. parva*



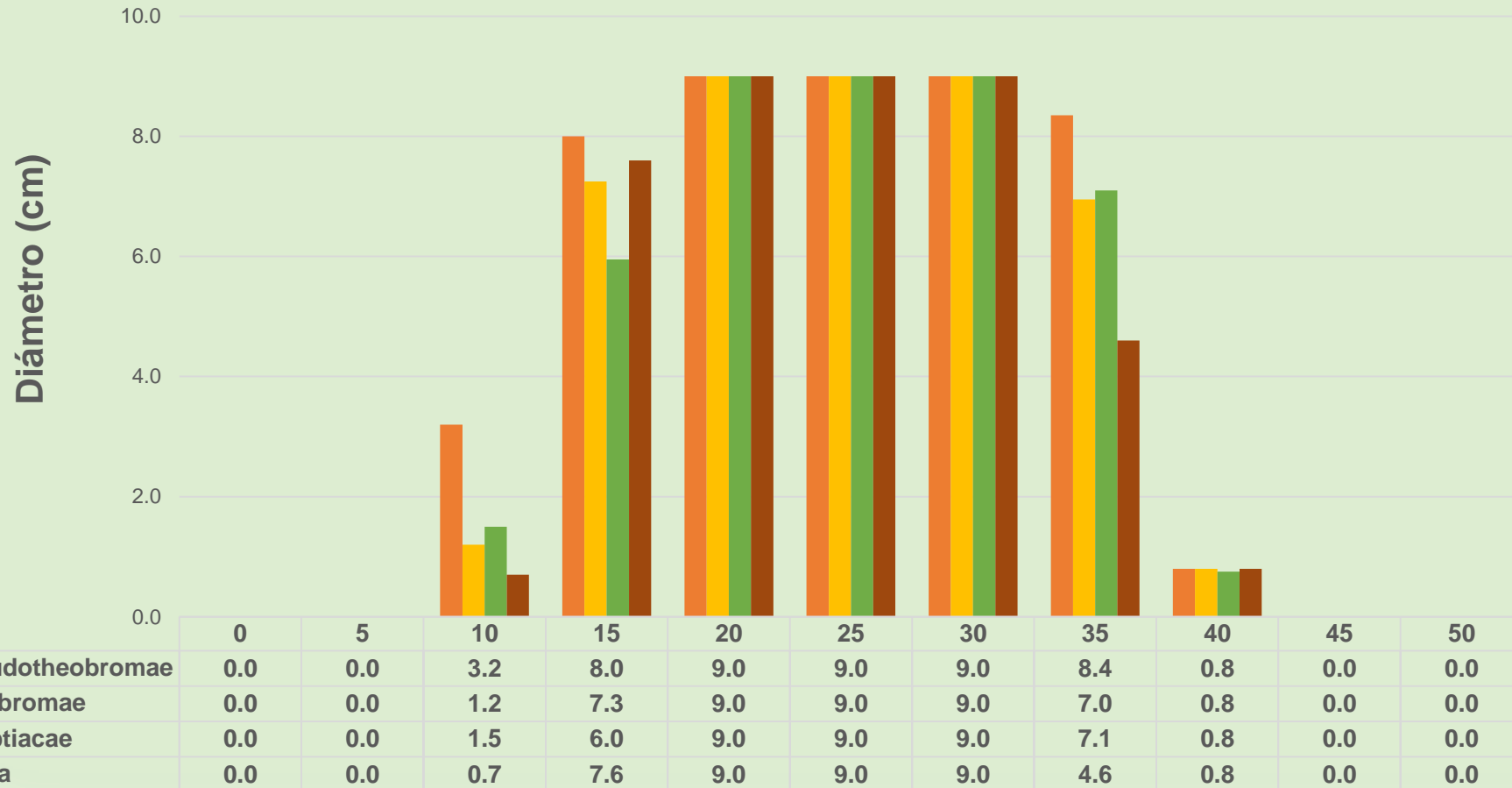
## Dimensión de conidios





## ➤ Tasas de crecimiento

Temperaturas (°C)



°C	DE	MCDP
0	15	No
5	15	Si
10	15	Si
15	4	Si
20	3	Si
25	2	Si
30	2	Si
35	3	Si
40	15	Si
45	15	No
50	15	No

DE: Días de Evaluación

MCDP: Muestran Crecimiento Después de Prueba

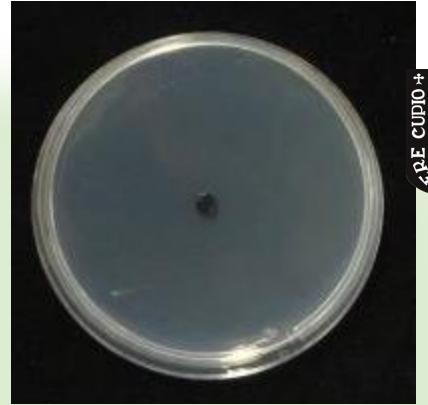
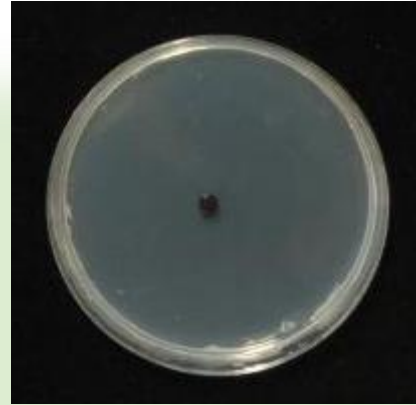
*L. pseudotheobromae*

*L. theobromae*

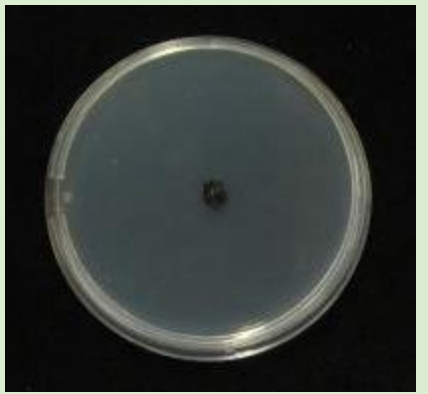
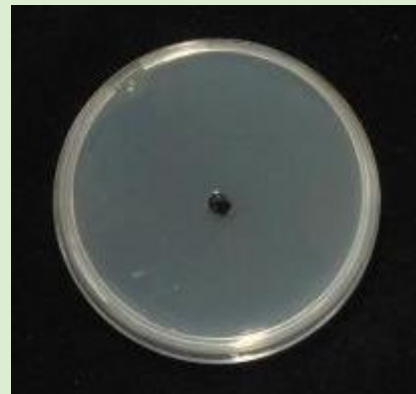
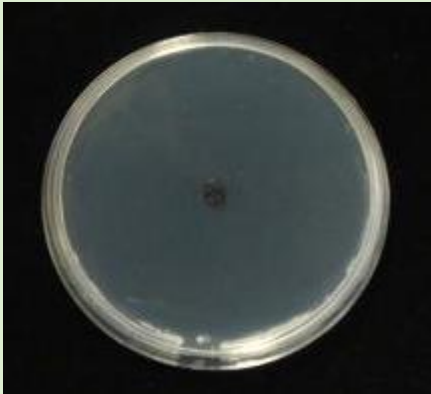
*L. egyptiacae*

*L. parva*

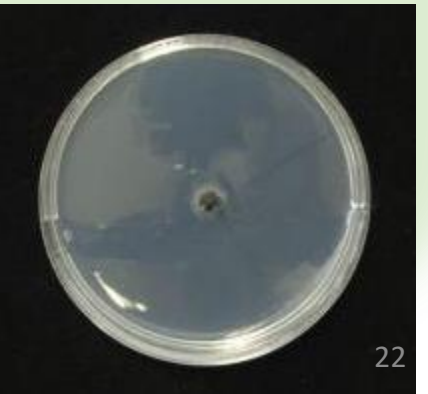
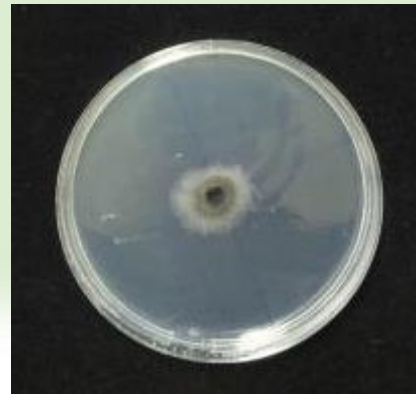
0°C



5°C



10°C



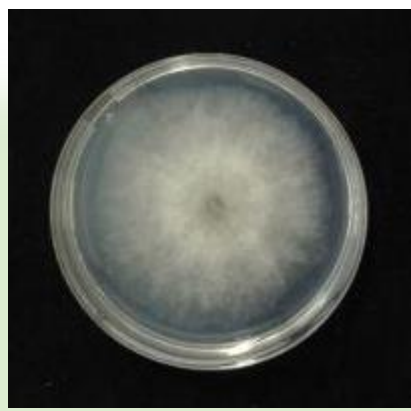
*L. pseudotheobromae*

*L. theobromae*

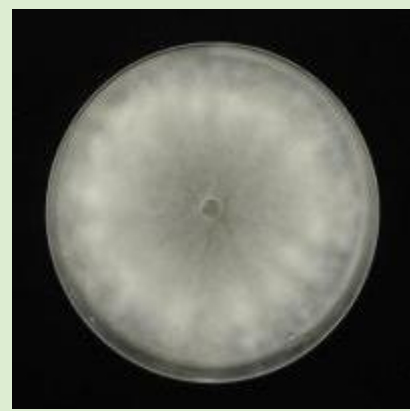
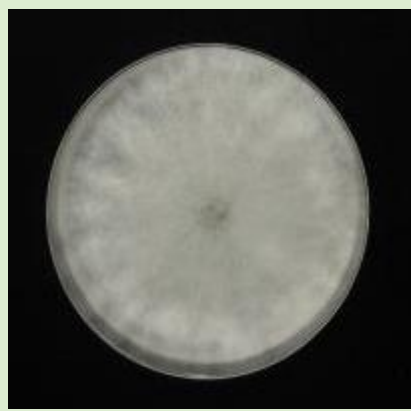
*L. egyptiaca*

*L. parva*

15°C



20°C



25°C



*L. pseudotheobromae*

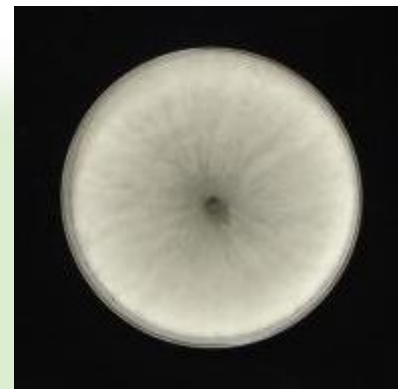
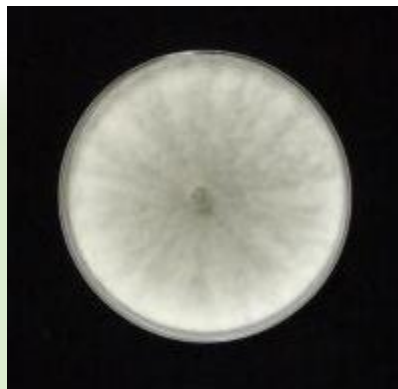
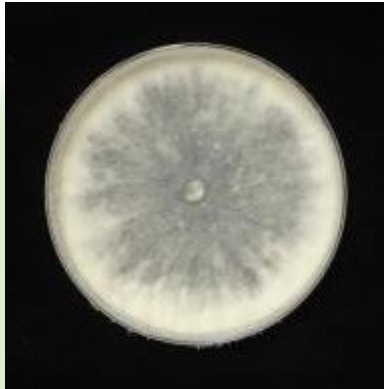
*L. theobromae*

*L. egyptiaca*

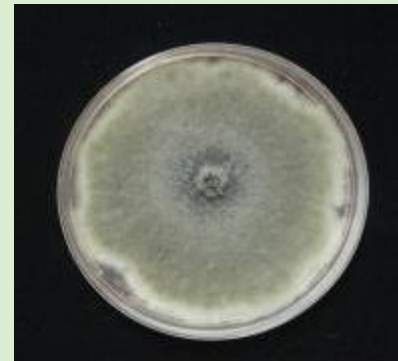
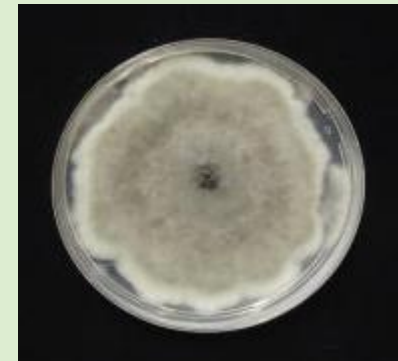
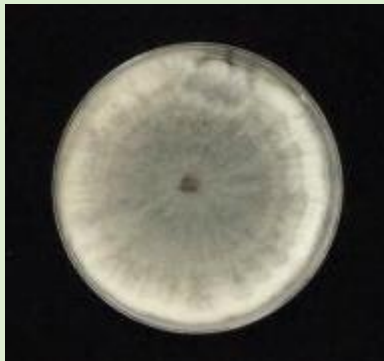
*L. parva*



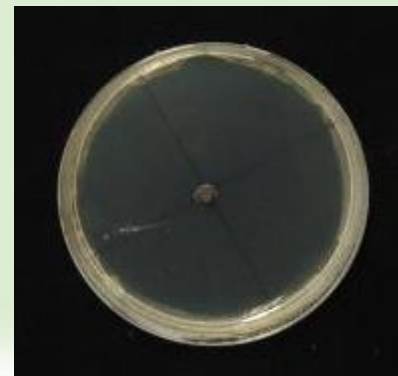
30°C



35°C



40°C





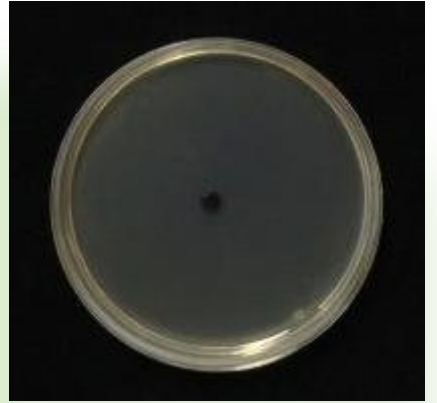
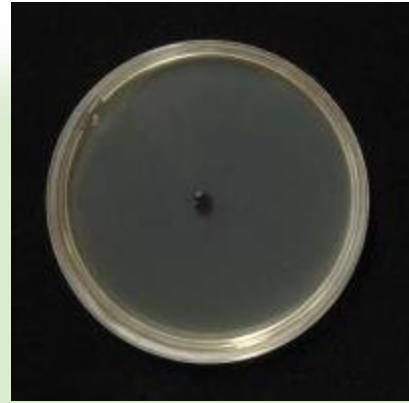
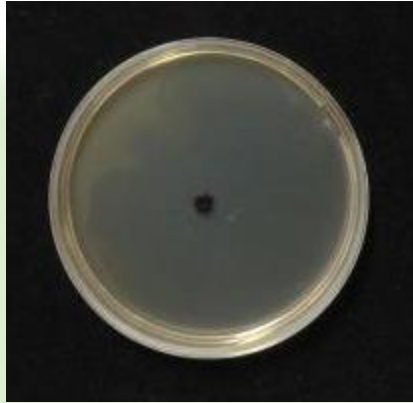
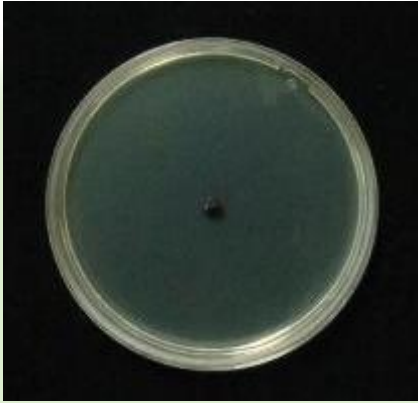
*L. pseudotheobromae*

*L. theobromae*

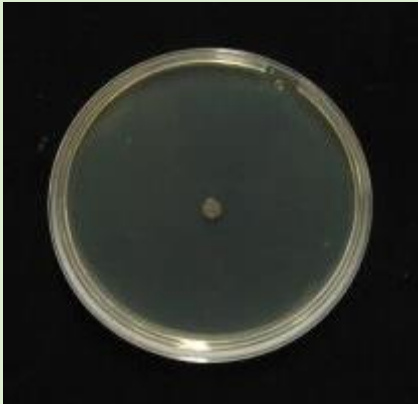
*L. egyptiaca*

*L. parva*

45°C



50°C



# Caracterización molecular



Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

<i>L. pseudotheobromae</i>	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia pseudotheobromae strain GXJG4.5 translation elongation factor 1-alpha (tef1a) gene, partial cds</a>	1109	1109	100%	0.0	100.00%	<a href="#">MH487655.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia pseudotheobromae isolate MAN53 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds</a>	1109	1109	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KY024613.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia pseudotheobromae isolate CHA03 translation elongation factor 1-alpha (tef1) gene, partial cds</a>	1109	1109	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KY024595.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia pseudotheobromae strain CDA1352 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds</a>	1109	1109	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KX528575.1</a>

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

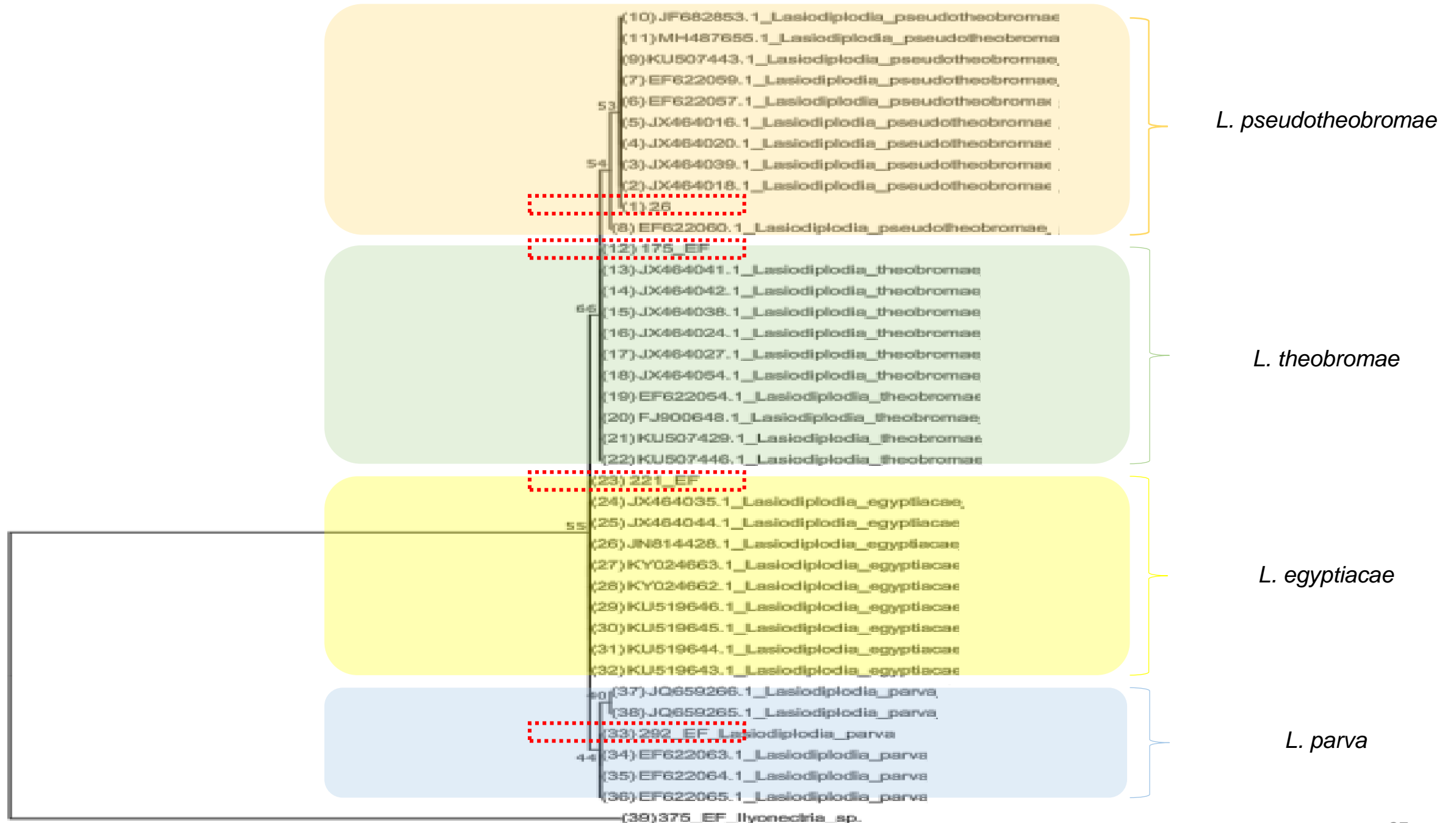
<i>L. theobromae</i>	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CDA1169 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds</a>	1098	1098	100%	0.0	99.83%	<a href="#">KX528559.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CMM3612 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds</a>	1098	1098	100%	0.0	99.83%	<a href="#">KF226692.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CMW32245 translation elongation factor 1-alpha (tef1a) gene, partial cds</a>	1092	1092	100%	0.0	99.67%	<a href="#">KY473016.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CMW4695 elongation factor 1 alpha gene, partial cds</a>	1090	1090	100%	0.0	99.66%	<a href="#">KF886730.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CCMF-CNPA0554 elongation factor 1 alpha gene, partial cds</a>	1086	1086	100%	0.0	99.50%	<a href="#">MH491477.1</a>

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

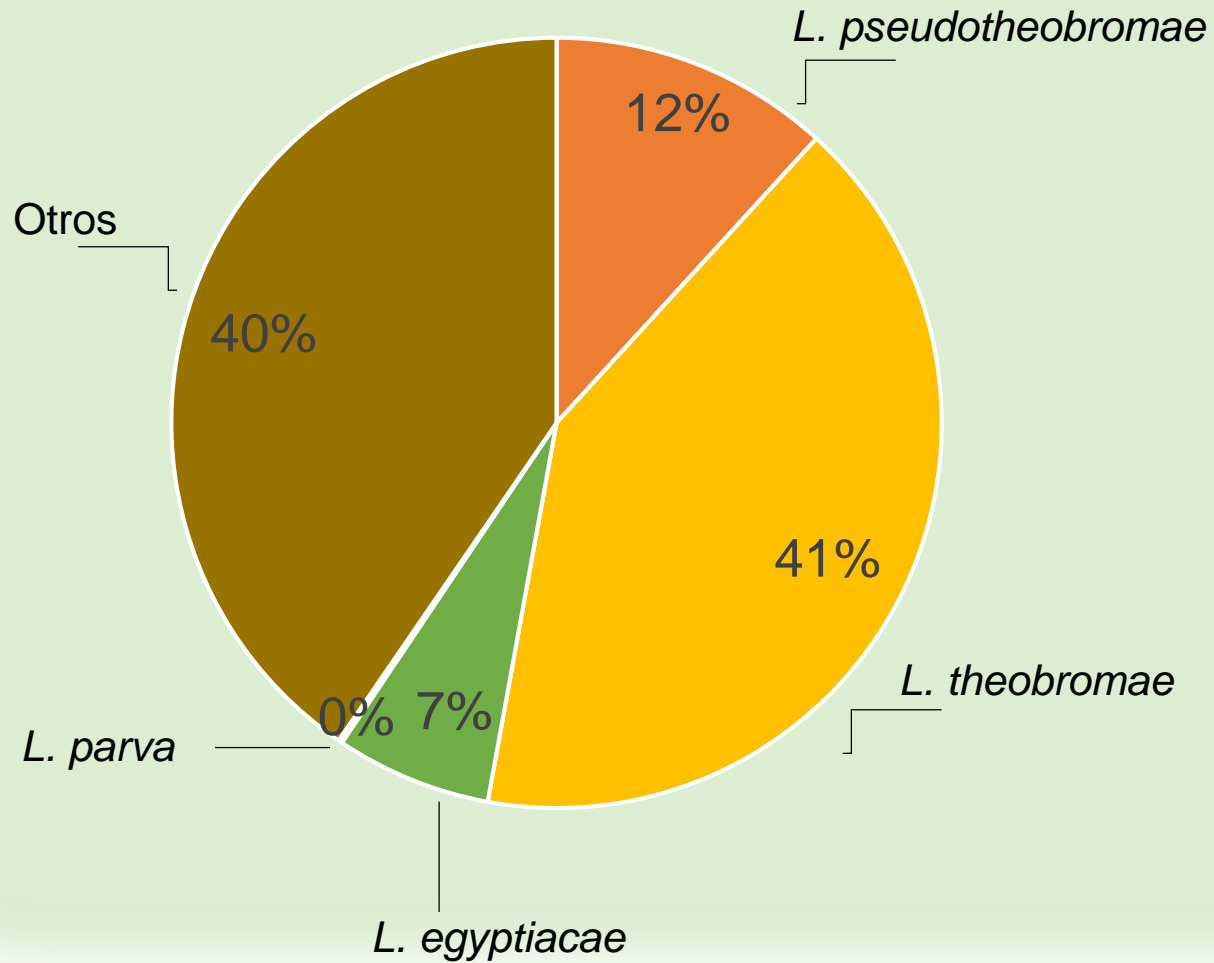
<i>L. egyptiaca</i>	Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia egyptiaca strain CMM3611 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds</a>	905	905	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KF226691.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CDA1169 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds</a>	893	893	100%	0.0	99.59%	<a href="#">KX528559.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CMW32245 translation elongation factor 1-alpha (tef1a) gene, partial cds</a>	893	893	100%	0.0	99.59%	<a href="#">KY473016.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia theobromae strain CMM3612 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds</a>	893	893	100%	0.0	99.59%	<a href="#">KF226692.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia hormozganensis strain CDA1363 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds</a>	889	889	100%	0.0	99.39%	<a href="#">KX528571.1</a>

Alineaciones Descargar GenBank Graphics Árbol de distancia de resultados

<i>L. parva</i>	Descripción	Maximo puntaje	Puntaje total	Cubierta de consulta	Valor e	Por. Ident	Adhesión
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia parva cepa CPATU02 factor de alargamiento de la traducción 1 gen alfa, cds parciales; mitocondrial</a>	647	647	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KX171635.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia sp. Factor de alargamiento de la traducción LACAM1 1-alfa, cds parciales</a>	647	647	100%	0.0	100.00%	<a href="#">KU507436.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Lasiodiplodia sp. CGMCC3.17974 gen de elongación-factor alfa (tef1-alfa) de la traducción, cds parciales</a>	641	641	100%	4e-180	99.76%	<a href="#">KX499919.1</a>



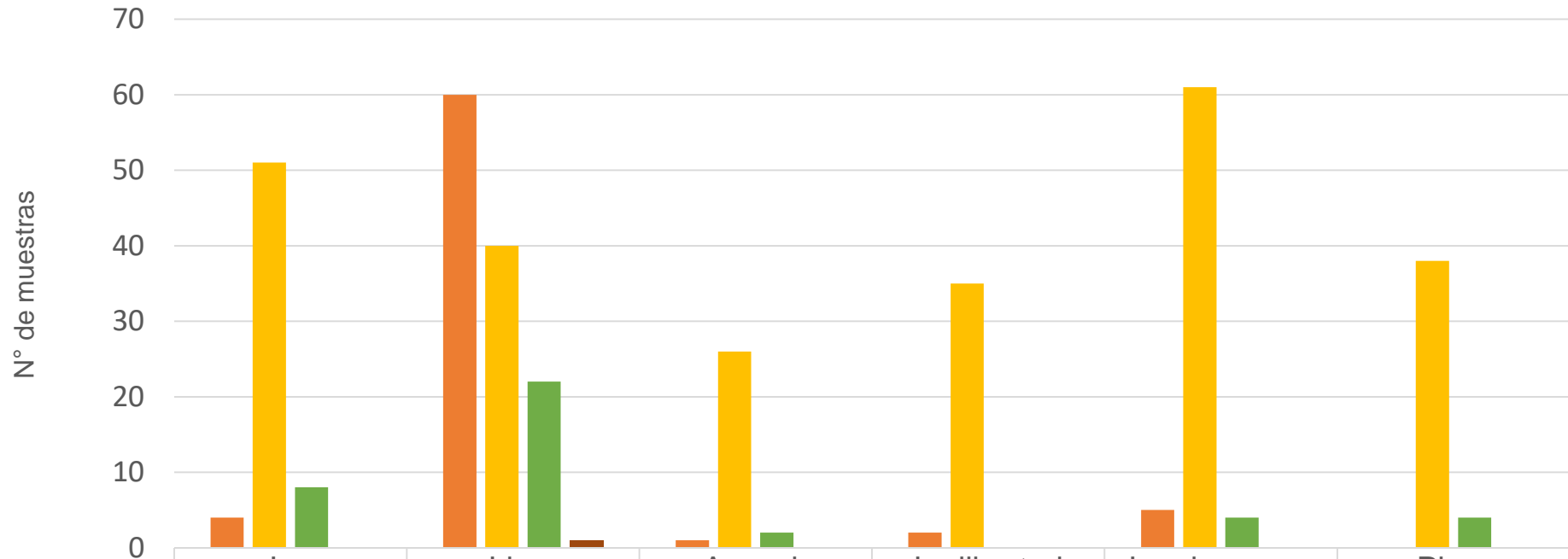
## Participación de las Especies con Respecto al Total de Muestras



<b>ESPECIES</b>	<b>N°</b>	<b>%</b>
<i>L. pseudotheobromae</i>	72	12
<i>L. theobromae</i>	251	41
<i>L. egyptiaca</i>	40	7
<i>L. parva</i>	1	0
Otros	247	40
<b>Total de muestras</b>	<b>611</b>	<b>100%</b>



## Distribución

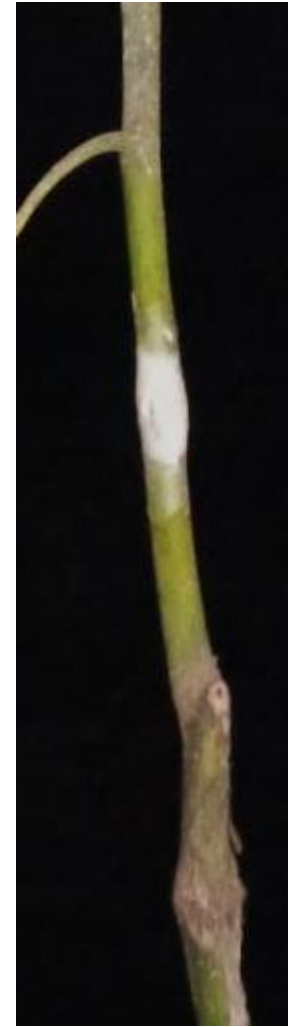


	Ica	Lima	Ancash	La libertad	Lambayeque	Piura
L. pseudotheobromae	4	60	1	2	5	0
L. theobromae	51	40	26	35	61	38
L. egyptiaca	8	22	2	0	4	4
L. parva	0	1	0	0	0	0

■ L. pseudotheobromae 
 ■ L. theobromae 
 ■ L. egyptiaca 
 ■ L. parva



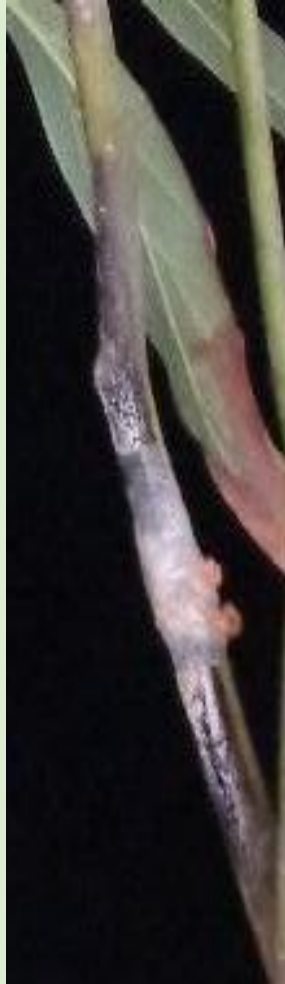
# Prueba de patogenicidad



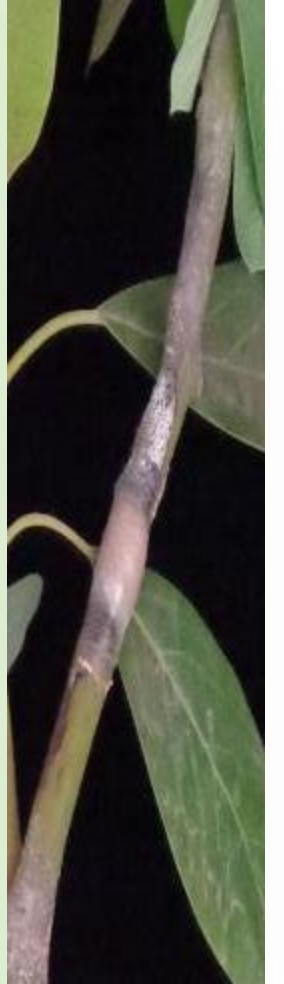
PDA



*L. pseudotheobromae*

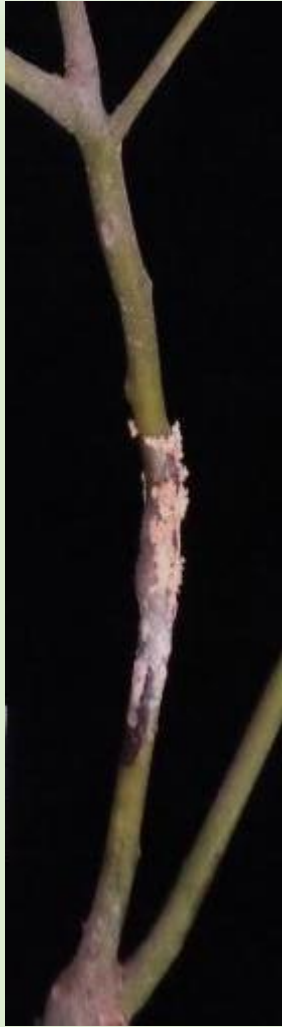


*L. theobromae*





*L. egyptiaca*

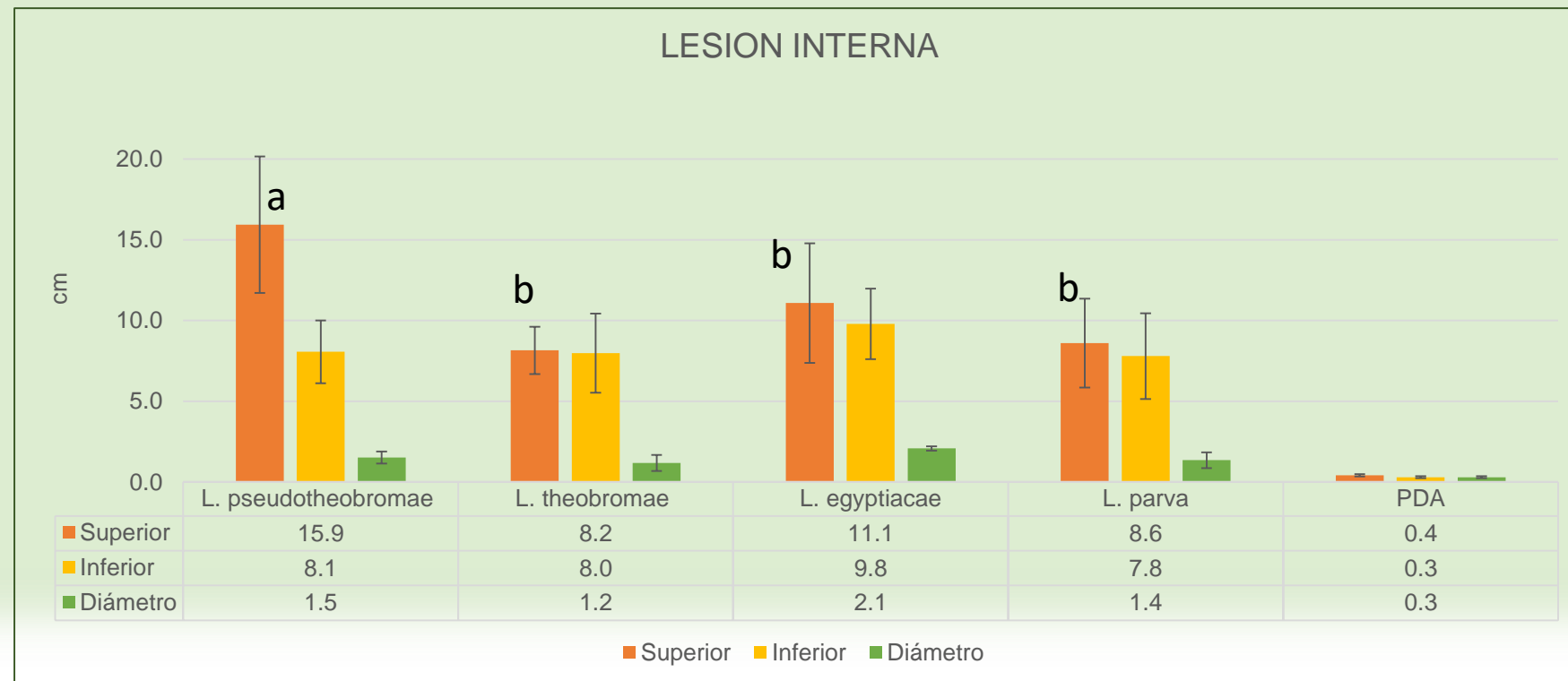
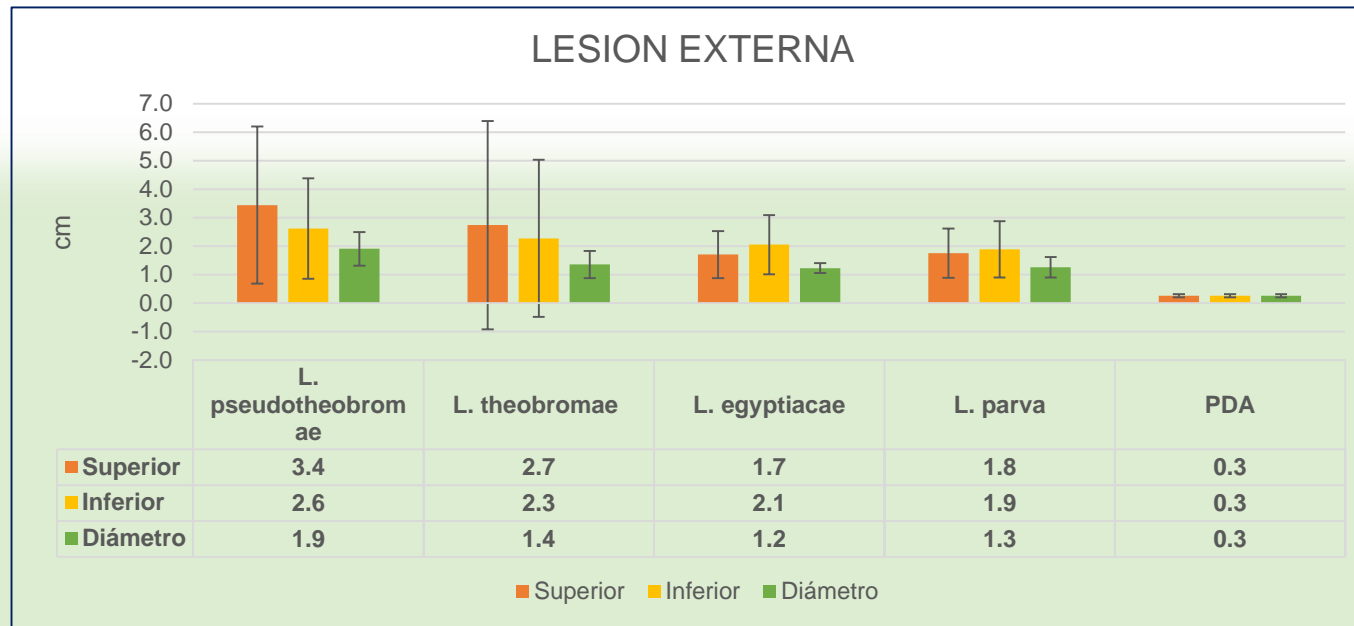


*L. parva*



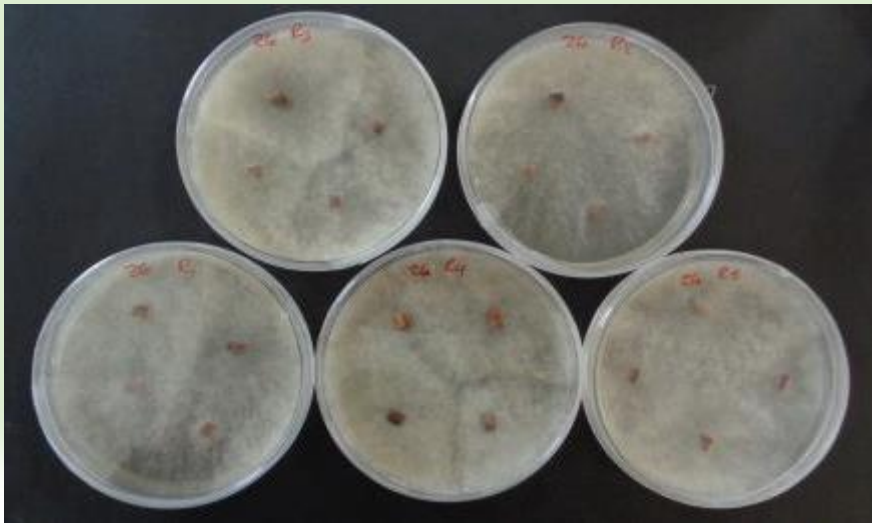


## ➤ Análisis cuantitativo





## *Lasiodiplodia pseudotheobromae*



*L. egyptiacae*



*L. theobromae*

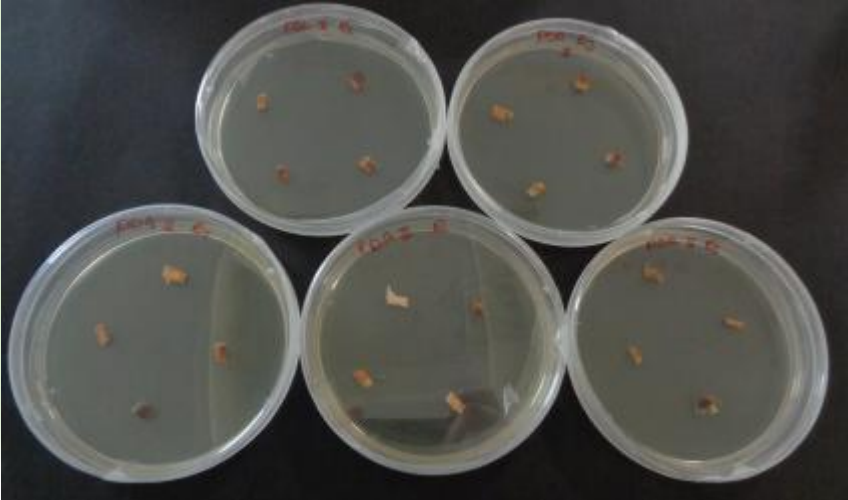


*L. parva*





PDA





## CONCLUSIONES

- Las especies de hongos de madera que afectan al palto Hass en la costa peruana son *Lasiodiplodia theobromae*, *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, *L. egyptiaca* y *L. parva*.
- La especie predominante en toda la costa es *Lasiodiplodia theobromae* (41.08%). *Lasiodiplodia pseudotheobromae* (11.78%) predominó en costa central. *Lasiodiplodia egyptiaca* (6.54%) y solo un aislamiento de *Lasiodiplodia parva* (0.16%).
- Se registró que las temperaturas óptimas para las cuatro especies se encuentran dentro de los 25°C a 30°C manteniendo una tasa de crecimiento igual; así mismo, se registró que a temperaturas muy bajas como 0°C y 5°C, y muy altas como 45°C y 50°C no hay crecimiento micelial de ninguna especie. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* sin embargo, presentó una tasa de crecimiento mucho mayor a las demás especies a 10°C considerándose como la temperatura mínima de crecimiento de *Lasiodiplodia*



# CONCLUSIONES

- Se caracterizó molecularmente cuatro especies de *Lasiodiplodia*: *Lasiodiplodia theobromae* L. *pseudotheobromae* L. *egyptiaca* y *L. parva* mediante el uso de primers ITS y TEF- $\alpha$ , siendo el más discriminatorio para especiar a *Lasiodiplodia* el uso del primer TEF- $\alpha$  con porcentajes de identidad del 100%, 99%, 100% y 100% respectivamente, comparados con el GenBank.
- La especie *Lasiodiplodia pseudotheobromae* fue la que infectó la mayor área de tejido de palto mostrando diferencias estadísticas con el resto de especies.

# AGRADECIMIENTOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA  
FACULTAD AGRONOMIA  
DEPARTAMENTO FITOPATOLOGÍA.



Clinica de  
Diagnosis de  
Fitopatología y  
Nematología

