



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**“ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD DE
HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A MANCHAS
CIRCULARES NECRÓTICAS EN CLADODIOS DE TUNA
(*Opuntia ficus indica*).”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA:

EVELYN CRISTINA CHAFLA CHARIGUAMAN

Riobamba- Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**“ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD DE
HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A MANCHAS
CIRCULARES NECRÓTICAS EN CLADODIOS DE TUNA
(*Opuntia ficus indica*).”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA AGRÓNOMA

AUTORA: EVELYN CRISTINA CHAFLA CHARIGUAMAN

DIRECTOR: Ing. FERNANDO JOSÉ RIVAS FIGUEROA Ph.D.

Riobamba- Ecuador

2022

© 2022, Evelyn Cristina Chafra Chariguaman

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

Yo, EVELYN CRISTINA CHAFLA CHARIGUAMAN, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados de este son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 26 de mayo de 2022

Evelyn Cristina Chafra Chariguaman

060416627-2

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El trabajo de Trabajo de Integración Curricular; Tipo: Proyecto de Investigación, **ESTUDIO DE LA PATOGENICIDAD Y AGRESIVIDAD DE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS A MANCHAS CIRCULARES NECRÓTICAS EN CLADODIOS DE TUNA** (*Opuntia ficus indica*), realizado por la Señorita: **EVELYN CRISTINA CHAFLA CHARIGUAMAN**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos y legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova Ph.D. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: VICTOR ALBERTO LINDAO CORDOVA	2022-05-26
Ing. Fernando José Rivas Figueroa Ph.D. DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR	 Firmado electrónicamente por: FERNANDO JOSE RIVAS FIGUEROA	2022-05-26
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero Ph.D. MIEMBRO DE TRIBUNAL	 Firmado electrónicamente por: PABLO ISRAEL ALVAREZ ROMERO	2022-05-26

DEDICATORIA

Al único ser que hace mi vida valiosa al creador de todo lo que existe, *DIOS* quién es mi fortaleza y motivación de vida. A mi amada madre, Rosario Elena quien me ha apoyado y me ha animado en tiempos difíciles. A mi familia por su ayuda constante. A mis amados tíos Carlos Alfonso, María Edelina y Marco Antonio por el refugio de una familia, por su cariño y su apoyo constante. A mi querida abuelita Hilda Genoveva. A mi prima Katherine Dayana por ser como mi hermana. A mi padre Fabian por darme la vida y su ayuda. A mis queridos hermanos David, Lenin, Miriam, Marlon y Elizabeth por acompañarme y ayudarme; por todos los momentos bellos compartidos.

Evelyn

AGRADECIMIENTO

A Dios, por ser mi fortaleza espiritual, por bendecirme el día a día y brindarme sabiduría, quién me ha acompañado y acompañará en todos los pasos y logros de mi vida por su sustento en todo este tiempo, quién es el pilar fundamental de quién soy y seré. A mi madre por enseñarme el camino del bien, por su continuo cuidado, por su entrega y amor a sus hijos. A mis hermanos por la compañía que me brindan. A los profesionales que conforman la Dirección Distrital de Chimborazo-MAG, especialmente a la Ing. Ligia Samaniego, por su cariño y amistad, al Ing. Edison Calderón por su incondicional amistad, con quienes compartir es hermoso. A los docentes y funcionarios de la Facultad de Recursos Naturales, de la carrera de Ingeniería Agronómica por esta gran oportunidad de crecer y desarrollarme como profesional. A Ruthcita por apoyo durante mi formación estudiantil.

Al **Ingeniero Fernando Rivas Ph.D.** por todo el apoyo y orientación brindada a lo largo de la investigación en su calidad de Tutor.

Al **Ingeniero Pablo Álvarez Ph.D.** por su invaluable dirección y asesoría en el desarrollo de este trabajo de investigación, por compartir sus conocimientos en su calidad de Asesor.

A los **Ingenieros Álvaro Rivera, Hamilton Intriago, Juan Guerra** por su desprendido apoyo brindado en esta investigación.

A mis queridos amigos por compartir tiempo de calidad en momentos difíciles, por ser un motivo de felicidad en mis mejores instantes de vida, por cada palabra de aliento, por cada abrazo, por escucharme y por su amor hacia mí.

Evelyn

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMEN.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1

CAPÍTULO I

1. MARCO TEORÍCO REFERENCIAL	4
1.1. Origen de <i>Opuntia</i> sp.....	4
1.1.1. <i>Historia de Opuntia</i> sp.....	4
1.2. Tuna (<i>Opuntia ficus indica</i>).....	4
1.2.1. Aspectos Generales	4
1.2.2. Clasificación Taxonómica	5
1.2.3. Descripción Botánica	5
1.3. Principales enfermedades de la tuna a nivel mundial.....	6
1.3.1. Roya (<i>Aecidium</i> spp.)	6
1.3.2. Pudrición de la raíz (<i>Armillaria mellea</i>, <i>Sclerotinia</i> spp., <i>Phytophthora</i> spp.).....	6
1.3.3. Enfermedad dorada o mácula de oro (<i>Alternaria</i> spp.).....	7
1.3.4. Descomposición acuosa (<i>Phytophthora cactorum</i>).....	7
1.3.5. Mácula gris (<i>Phytophthora</i> spp. y <i>Mycosphaerella</i> spp.).....	7
1.3.6. Bacteriosis o Descomposición pastosa (<i>Erwinia</i> spp.).....	7
1.3.7. Virosis	7
1.4. Principales enfermedades reportadas en Ecuador.....	8
1.4.1. Enfermedades de los cladodios de tuna en Ecuador.....	9
1.5. Patogenicidad.....	10
1.5.1. Patógenos potenciales, facultativos	10
1.5.2. Patógenos estrictos o patógenos obligados.....	10
1.5.3. Patógenos oportunistas.....	10
1.6. Agresividad	11

1.7.	Postulados de Koch	11
------	--------------------------	----

CAPITULO II

2	MARCO METODOLÓGICO	12
2.1.	Características del sitio	12
2.1.1.	<i>Localización</i>	12
2.1.2.	<i>Ubicación geográfica</i>	12
2.2.	Materiales y Equipos.....	12
2.2.1.	<i>Material biológico</i>	12
2.2.2.	<i>Materiales</i>	13
2.2.3.	<i>Reactivos</i>	13
2.2.4.	<i>Equipos</i>	13
2.3.	Metodología	14
2.3.1.	<i>Reactivación de las cepas fúngicas en estudio</i>	14
2.3.2.	<i>Preparación de suspensiones conidiales de los aislados fúngicos</i>	14
2.3.3.	<i>Preparación de los cladodios de tuna</i>	16
2.3.4.	<i>Inoculación de los cladodios</i>	16
2.3.5.	<i>Reaislamiento de agentes fúngicos</i>	18
2.3.6.	<i>Germinación, esporulación y tasa de crecimiento micelial</i>	20
2.3.7.	<i>Diseño experimental</i>	21
2.4.	Identificación molecular.....	23

CAPÍTULO III

3	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	24
3.1.	Patogenicidad y agresividad de microorganismos fúngicos en cladodios de tuna ..	24
3.1.1.	<i>Aislados fúngicos que cumplieron con el 4^o postulado de Koch</i>	24
3.1.2.	<i>Agresividad</i>	28
3.2.	Caracterización de la sintomatología presentada en cladodios de tuna	29
3.2.1	<i>Sintomatología por <i>Dipodascus australiensis</i> (T²)</i>	30
3.2.2..	<i>Sintomatología por <i>Alternaria alternata</i> (T³)</i>	31
3.2.3.	<i>Sintomatología por <i>Fusarium oxysporum</i> (T⁴)</i>	32
3.2.4.	<i>Sintomatología por <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (T⁵)</i>	33
3.2.5.	<i>Sintomatología por <i>Alternaria alternata</i> (T⁶)</i>	34
3.2.6.	<i>Sintomatología por <i>Epicoccum</i> sp. (T⁷)</i>	35

3.2.7.	<i>Sintomatología por Fusarium oxysporum (T⁸)</i>	36
3.2.8.	<i>Sintomatología por Fusarium oxysporum (T⁹)</i>	37
3.3.	Experimentos <i>in vitro</i>	38
3.4.	Evaluación de la agresividad de microorganismos patogénicos en cladodios de tuna.	41
3.5.	Identificación molecular de los aislados fúngicos obtenidos.....	44
CONCLUSIONES.....		50
RECOMENDACIONES.....		51
GLOSARIO		
BIBLIOGRAFÍA		
ANEXOS		

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Clasificación taxonómica de la especie <i>Opuntia ficus indica</i>	5
Tabla 2-1:	Enfermedades reportadas a nivel mundial del nopal o tuna.	8
Tabla 3-1:	Enfermedades cladodios de nopal o tuna en Ecuador.....	9
Tabla 4-2:	Tratamientos establecidos para experimento in vivo (campo).....	22
Tabla 5-3:	Tratamientos establecidos para la evaluación de la tasa de crecimiento micelial.	38
Tabla 6-3:	Tratamientos establecidos para la evaluación de la esporulación de los aislados	39
Tabla 7-3:	Tratamientos establecidos para la evaluación de la germinación de los	40
Tabla 9-3:	Análisis de varianza del nivel de daño causado por los aislados fúngicos.	42
Tabla 10-3:	Test de Tukey al 0,05 de los diámetros de las lesiones en mm.....	43
Tabla 11-3:	Identificación inicial de las secuencias de la región TEF1- α de los hongos	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2:	Reactivación de aislados fúngicos	14
Figura 2-2:	Ensayo caldo V8 y su composición.	15
Figura 3-2:	Conteo de esporas en la cámara de Neubauer.....	15
Figura 4-2:	Método de punción.....	16
Figura 5-2:	Método de abrasión	17
Figura 6-2:	Fase 1_ Reaislamiento de agentes patógenos de tejidos sintomáticos	18
Figura 7-2:	Fase 2_ Reaislamiento de hongos in vitro.	19
Figura 8-2:	Fase 3_ Reaislamiento fase purificación	19
Figura 9-2:	Fase 4_ Cultivo monospórico	20
Figura 11-3:	Características culturales y morfológicas de <i>Dipodascus australiensis</i> (T ²).....	24
Figura 12-3:	Características culturales y morfológicas de <i>Alternaria alternata</i> (T3).	25
Figura 13-3:	Características culturales y morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> (T ⁴).....	25
Figura 14-3:	Características culturales y morfológicas de <i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (T ⁵).	26
Figura 15-3:	Características culturales y morfológicas de.....	26
Figura 16-3:	Características culturales y morfológicas del <i>Epicoccum</i>	27
Figura 17-3:	Características culturales y morfológicas de <i>Fusarium</i>	27
Figura 18-3:	Características culturales y morfológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> (T ⁹).....	28
Figura 19-3:	Lesión por punción del hongo <i>Fusarium oxysporum</i> (T4) (a, b)	29
Figura 20-3:	<i>Dipodascus australiensis</i> (T ²) Lesiones cloróticas por punción y abrasión.	30
Figura 21-3:	<i>Alternaria alternata</i> (T ³) lesiones por abrasión y punción.....	31
Figura 22-3:	<i>Fusarium oxysporum</i> (T ⁴) Mancha y depresión necrótica por punción(a) Abertura	32
Figura 23-3:	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> (T ⁵) Hinchamiento por punción y tumor interno	33
Figura 24-3:	Lesiones de <i>Alternaria alternata</i> (T ⁶)	34
Figura 25-3:	<i>Epicoccum</i> sp. (T ⁷) lesión por abrasión	35
Figura 26-3:	Lesiones de <i>Fusarium oxysporum</i> (T ⁸).....	36
Figura 27-3:	Lesiones de <i>Fusarium oxysporum</i> (T ⁹).....	37

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Diámetro de la lesión en relación con los tratamientos inoculados.....	41
--	----

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A: CEPAS INOCULADAS

ANEXO B: CLADODIOS DE TUNA

ANEXO C: HONGO NO PATOGENICO (*Cladosporium* sp.)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PDA	Potato Dextrose Agar
SNA	Spezieller Nährstoffarmer Agar
ddi	Días después de la inoculación

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue estudiar la patogenicidad y agresividad de hongos filamentosos asociados a manchas circulares necróticas en cladodios de tuna (*Opuntia ficus indica*). Se inició con la reactivación de las cepas fúngicas de *Cladosporium* sp.; *Dipodascus australiensis*; *Alternaria alternata* cepas 3 y 6; *Fusarium incarnatum-equiseti*; *Fusarium oxysporum* cepas 4,8 y 9; *Epicoccum* spp. estas fueron cultivadas en medio PDA durante 15 días. Dentro de la cámara de flujo laminar, se cortó discos del micelio con segmentos de sorbetes estériles, se añadió 5 discos de micelio por cada Erlenmeyer de 250 mL con medio V8, se trasladó al Agitador-Incubadora Orbital, durante 3 días. Finalmente se ejecutó el conteo de esporas de los aislados fúngicos, permitiendo el ajuste en la concentración de esporas de 1×10^6 . La inoculación de los cladodios fue elaborada mediante tres métodos: punción, abrasión y sin herida. De los nueve aislados inoculados en cladodios de tuna, seis fueron patogénicos (*Dipodascus australiensis*, *Alternaria alternata* cepa 3, *Alternaria alternata* cepa 6, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Epicoccum* spp.). Como resultado de las pruebas de patogenicidad y agresividad en cladodios de tuna, se reportaron como patogénicos a: *Dipodascus australiensis*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum-equiseti*. Y los aislados que presentaron mayor agresividad fueron *Fusarium oxysporum* cepa 4 con 12,37 mm y *Alternaria alternata* con 13,07 mm del diámetro de la lesión respectivamente. Se concluyó que esta investigación es el primer aporte usando caracterización morfológica y molecular en el Ecuador, de hongos causantes de manchas necróticas circulares en cladodios de tuna. Se recomienda realizar inoculaciones a diferentes concentraciones de esporas.

Palabras clave: <AGRONOMÍA>, <FITOPATOLOGÍA>, <PATOGENICIDAD>, <ENFERMEDADES EN PLANTAS>, <TUNA(*Opuntia ficus indica*)>.



Firmado electrónicamente por:
CRISTHIAN
FERNANDO
CASTILLO RUIZ



1282-DBRA-UTP-2022

ABSTRACT

The goal of this research was to study the pathogenicity and aggressiveness of filamentous fungi associated with circular necrotic spots on prickly pear cladodes (*Opuntia ficus indica*). We started with the reactivation of fungal strains of *Cladosporium* sp.; *Dipodascus australiensis*; *Alternaria alternata* strains 3 and 6; *Fusarium incarnatum-equiseti*; *Fusarium oxysporum* strain 4, 8 and 9; *Epicoccum* spp. these were grown on a PDA medium for 15 days. Inside the laminar flow chamber, discs were cut from the mycelium with sterile sorbet segments, and five mycelial discs were added per 250 mL Erlenmeyer with V8 medium and transferred to the Orbital Shaker-Incubator, for three days. Finally, the spore count of the fungal isolates was performed, allowing adjustment to the spore concentration of 1×10^6 . Inoculation of the cladodes was conducted by three methods: puncture, abrasion, and without a wound. Of the nine isolates inoculated on prickly pear cladodes, six were pathogenic (*Dipodascus australiensis*, *Alternaria alternata* strain 3, *Alternaria alternata* strain 6, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Epicoccum* spp.). As a result, of pathogenicity and aggressiveness tests on prickly pear cladodes, the following were reported as pathogenic: *Dipodascus australiensis*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum-equiseti*. The most aggressive isolates were *Fusarium oxysporum* strain 4 with 12.37 mm and *Alternaria alternata* with 13.07 mm lesion diameter, respectively. It was concluded that this research is the first contribution using morphological and molecular characterization in Ecuador of fungi causing circular necrotic spots on prickly pear cladodes. It is recommended to conduct inoculations at different spore concentrations.

Keyword: <AGRONOMY>, <PHYTOPATHOLOGY>, <PATHOGENICITY>, <PLANT DISEASES>, <PRICKLY PEAR (*Opuntia ficus indica*)>.



Firmado electrónicamente por:
**SILVANA
PATRICIA
CELLERI
QUINDE**

Silvana Patricia Céleri Quinde

C.C. 0602669830

INTRODUCCIÓN

Importancia

La tuna (*Opuntia ficus indica*) es la cactácea con mayor trascendencia agronómica a nivel mundial, requerida no solamente por sus deliciosos frutos, sino también a sus cladodios, los cuales son usados maduros como forraje o para consumo humano cuando son tiernos (ICARDA & FAO, 2018, p. 6).

Una diversidad de empleos se genera por el cultivo de especies de *Opuntia* es una planta muy noble y tiene una diversidad de usos, que va desde su utilidad para la alimentación hasta como energía y combustible, pasando por su industrialización en la medicina, en la farmacéutica y cosmético, además las especies de *Opuntia* contribuyen a la regeneración y estabilidad del suelo. A nivel mundial el país con mayor extensión es México, el nopal tunero alcanza 53 876 hectáreas, su producción anual alcanza 428 763 ton/año. De acuerdo con un estudio realizado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG, 2017, p. 2) en Ecuador el cultivo de tuna en el país ocupa un área de 180 hectáreas donde se cultivan cuatro variedades de tuna: la tuna amarilla sin espina, la amarilla con espina, la blanca y la silvestre, principalmente en las provincias de Imbabura, Loja, Santa Elena y Tungurahua. Márquez (2018, p. 2) menciona que, en la provincia de Chimborazo, en las zonas secas de Guano y otras tres parroquias de ese cantón, existen 72 hectáreas del cultivo de tuna.

La importancia agronómica de la tuna o nopal (*Opuntia ficus indica*), radica en su alto potencial para convertirse en una fuente sustento alimenticio así también como una fuente de ingresos económicos en las zonas áridas y desérticas del Ecuador continental e insular, esta especie es tan noble que es capaz de adaptarse a pesar de factores agroclimáticos limitantes (González e Icaza, 2007, p. 14).

La relevancia de la tuna como alimento para el consumo humano reside en su alto implícito de fibra, vitamina C y agua lo que impulsa mejores procesos digestivos. Además, por sus propiedades medicinales idóneo para la diabetes, arterioesclerosis y para el control de la obesidad (Gobierno de México, 2019, p. 7).

Problema

Cabe recalcar que en Ecuador la ausencia de información y data acerca de los problemas fitosanitarios del cultivo de tuna hace necesario crear fuentes de información como el presente trabajo de investigación que provee de herramientas para el manejo fitosanitario de los patógenos en cladodios de tuna, hongos como *Pseudocerospora opuntiae*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Neoscytalidium* que han sido reportados en otros países (Monroy, 2010, p. 2) , donde representan un problema complejo por su posible interacción con otros patógenos y por ende la nutrición de la planta. Estudios enuncian que un enfoque vital en el manejo de la enfermedad integra el conocimiento de infecciones e/o inóculo latente en la planta, por la condición perenne del tejido infectado y la constante remoción de tejido vía podas que permanece en el suelo.

Justificación

En las parroquias Alacao, Chingazo y en la estación experimental Tunshi- ESPOCH el cultivo de tuna es una fuente de ingresos importante para las comunidades que viven en ese sector, en los últimos años este cultivo ha sido afectado por varias enfermedades que han sido desconocidas, de entre las principales reportamos por su patogenicidad y agresividad la conocida como "lagrime de espelma" cuyo agente causal es *Fusarium* sp., además de la presencia de otros patógenos como *Alternaria* sp., *Scytaalidium* sp., los cuales causan importantes pérdidas económicas a los agricultores. La identificación de los agentes etiológicos constituye el pilar fundamental para el establecimiento de alternativas de manejo integrado de la enfermedad en los cladodios de tuna.

Objetivos

- Objetivo General

Estudiar la patogenicidad y agresividad de hongos filamentosos asociados a manchas circulares necróticas en cladodios de tuna (*Opuntia ficus indica*).

- Objetivos específicos

a. Evaluar la patogenicidad y agresividad de diferentes aislados inoculados asociados a manchas circulares necróticas en cladodios de tuna (*Opuntia ficus indica*).

b. Caracterizar los síntomas cualitativamente de los cladodios inoculados mediante fotografía y comparación con literatura especializada.

c. Determinar el nivel de daño en los cladodios de los aislados fúngicos inoculados.

Hipótesis

- Nula

H₀: Ninguno de los hongos filamentosos inoculados causa sintomatología de manchas circulares necróticas.

- Alternativa

H₁: Por lo menos uno de los hongos filamentosos inoculados causa sintomatología de manchas circulares necróticas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEORÍCO REFERENCIAL

1.1 Origen de *Opuntia* sp.

En el siglo XVI *O. ficus-indica* era ya un cultivo importante en el centro de México. Los españoles llevaron esta especie a su patria, dadas sus peculiaridades morfológicas, y por sus frutos comestibles, propiedades antiescorbúticas y por ser el hospedante del insecto cochinilla, del cual se obtenía el colorante grana cochinilla. Después, tanto de México como de España, *O. ficus-indica* se introdujo en otras regiones del mundo, particularmente en la mediterránea (Barbera et al., 1992, p. 15 citado por Reyes, Aguirre & Hernández, 2005, p. 5). En el proceso de domesticación de *Opuntia* se presume que el grupo étnico otomí fue el actor en la domesticación de esta especie sin embargo existen evidencias arqueo botánicas que indican el uso de *Opuntia* spp. por varios grupos étnicos en México desde hace 8000 años, pero ninguno asociado directamente a *O. ficus-indica*. En México siendo el país de origen de la tuna, lugar donde se registra la mayor cantidad de nombres comunes haciendo referencia al lugar donde crece la planta, color del fruto y la presencia o ausencia de espinas siendo así, el nombre primer nombre para *O. ficus-indica* fue Tenochtli, que significa nopal divino.

1.1.1 Historia de *Opuntia* sp.

En otras latitudes los colonizadores lo nombraron Nopal de Castilla o Tuna de Castilla, cabe recalcar que daban nombre solo a los productos nativos más deseables. La denominación de tuna es una palabra cuyo origen es taíno; los árabes le llaman Higo de los Cristianos, y los portugueses Higo de los Moros. En Brasil se le conoce como Palma Forrageira, pues se utiliza mayormente como forraje en el noreste del país. El nombre del cultivar Burbank deriva del genetista Luther Burbank. La riqueza de los nombres comunes para *O. ficus indica* es un símbolo de su trascendencia. Las personas sólo nombran plantas que tienen un valor económico, social o ecológico (Martínez, 1979, p. 17 citado por Reyes, Aguirre & Hernández, 2005, p. 8)

1.2 Tuna (*Opuntia ficus indica*)

1.2.1 Aspectos Generales

La especie cactácea con mayor importancia económica en el mundo es *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Kiesling, 1999, p. 3). Se cultiva en América, África, Asia, Europa y Oceanía (Barbera et al., 1992, p. 25). A través de su área actual de distribución, se cultiva para cosechar frutos y cladodios utilizados como forraje (Mondragón & Pérez, 2001, p. 11). Sólo en México existen más de 10 500 ha para la producción de cladodios tiernos (nopalitos) consumidos como verdura (Flores, 2001, p. 3). Esta cactácea se cultiva como hospedante del insecto cochinilla (*Dactylopius coccus*), los nopalitos también se utilizan para elaborar preparaciones antidiabéticas, sus flores son usadas para preparar bebidas diuréticas, los frutos son utilizados para preparar jugos, jaleas, miel, mermeladas y pastas, y se extrae aceite de sus semillas (Reyes, Aguirre & Hernández, 2005, p. 1).

1.2.2 Clasificación Taxonómica

La taxonomía de *Opuntia ficus indica* es la siguiente:

Tabla 1-1: Clasificación taxonómica de la especie *Opuntia ficus indica*

Reino	Planta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Cactaceae
Género	<i>Opuntia</i>
Nombres Comunes	Tuna, Nopal, Higo de los Cristianos, Higo de los Moros, Palma Forrageira.

Fuente: Wikipedia, 2021.

Realizado por: Chafra E., 2022.

1.2.3 Descripción Botánica

Plantas de arbustivas a arborescentes, de 1,7 m de altura, con un tallo primario lignificado, bien definido. Tallo castaño oscuro, verde o gris, cilíndrico, de 45 cm de largo, a 20 cm de diámetro. Cladodios usualmente elípticos, pero también obovados, ovados, circulares, oblongos, oblanceolados o rómbicos, 60 cm de largo en cladodios de dos a tres años, 30 cm de anchura, 3 cm de grosor, con un área de 1182 cm², por lo general verde pálido de a oscuro (Reyes, Aguirre & Hernández, 2005, p. 8).

Flores de antesis diurna, hasta diez por cladodio, casi siempre en la parte apical del margen del cladodio; pericarpelo generalmente cilíndrico, algunas veces obovoide, ovoide o cónico, 5 cm de longitud, 2 cm de diámetro.

Numerosos estambres, erectos, ligeramente reclinados hacia el pistilo; filamentos blancos o amarillos, sensibles al tacto en las primeras horas de la antesis, 0,8 cm de longitud; anteras amarillas, sub-basifijas, 2 mm de longitud; estilo blanco, algunas veces rojo rosado, estigma verde o amarillo, al principio capitado tornándose radiante con 7 lóbulos. El fruto usualmente es turbinado, algunas veces esférico, cilíndrico o elíptico, frecuentemente amarillo brillante.

1.3 Principales enfermedades de la tuna a nivel mundial

Según La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y el Centro Internacional de Investigación Agrícola en Zonas Áridas ICARDA, (2018, pg. 123) el nopal (*Opuntia ficus-indica*) sufre de varias enfermedades bióticas y abióticas, su importancia depende del destino del producto. La información precisa sobre la etiología y la epidemiología de los patógenos es escasa, y la literatura científica no cubre adecuadamente la distribución geográfica ni el impacto económico de muchas enfermedades del nopal. Aun cuando es cierto que la mayoría de las enfermedades infecciosas son causadas por hongos, un menor número de bacterias, fitoplasmas y virus son reportados como patógenos.

Además, se han reportado en el nopal alrededor de 22 enfermedades de tipo fungosas, bacterianas y virales, que su foco de infección es: la pudrición de la raíz, la pudrición blanda son los más devastadoras (Alvarado y Santín, 2017, p. 6). A continuación, presentamos una breve recopilación de las enfermedades a nivel mundial del nopal o tuna.

Monroy (2010, p. 11) Menciona que las principales agentes causales en nopal son:

1.3.1 *Roya (Aecidium spp.)*

Destaca la siguiente sintomatología viruelas esféricas de coloración amarillenta, en pencas y frutos que al secarse se desprenden y dejan un orificio en el cladodio.

1.3.2 *Pudrición de la raíz (Armillaria mellea, Sclerotinia spp., Phytophthora spp.)*

Estos hongos destruyen el sistema radicular, se presenta en plantas mayores a 4 años. Manifiesta síntomas como marchitamiento o arrugamientos de los cladodios.

1.3.3 Enfermedad dorada o mácula de oro (Alternaria spp.)

Manifiesta la siguiente sintomatología, anillos que se dispersan a lo largo de los cladodios, de tonalidades olivo a dorado, estos disminuyen la acción fotosintética.

1.3.4 Descomposición acuosa (Phytophthora cactorum)

La sintomatología se exterioriza con espacios blandos y putrefacción del fruto.

1.3.5 Mácula gris (Phytophthora spp. y Mycosphaerella spp.)

Evidencia síntomas como; rotura de la epidermis del cladodio acompañada de necrosis.

1.3.6 Bacteriosis o Descomposición pastosa (Erwinia spp.)

Demuestra síntomas desde el ápice hasta la base del cladodio. La epidermis del cladodio se torna suave y pastosa, luego se convierte en una macula redonda color marrón con bordes húmedos, y finalmente expresa exudados amarillentos con fetideces.

1.3.7 Virosis

Exterioriza los siguientes síntomas; prominencia en el cladodio y detrimento de la tonalidad verde, disminución de retoños y flores.

Tabla 2-1: Enfermedades reportadas a nivel mundial del nopal o tuna.

ENFERMEDADES FUNGOSAS	
Nombre	Agente Causal
Pudrición del cladodio y de la fruta	<i>Lasiodiplodia theobromae, Botryosphaeria rhodina</i>
Pudrición seca por <i>Alternaria</i>	<i>Alternaria</i> spp.
Pudrición de raíces y tallos <i>Armillaria</i>	<i>Armillaria mellea</i>
Pudrición algodonosa	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Roya	<i>Aecidium opuntiae</i>
Pudrición de raíces por <i>Phytophthora</i>	<i>Phytophthora nicotianae</i>
Mancha negra	<i>Pseudocercospora opuntiae</i>
<i>Pythium</i> de la corona y pudrición del tronco	<i>Pythium aphanidermatum</i>
Pudrición de raíces por <i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>opuntiarum</i>
Moho gris	<i>Botrytis cinerea</i>
Pudrición de fruta por <i>Penicillium</i>	<i>Penicillium</i> spp.
Pudrición suave por <i>Macrophomina</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>
ENFERMEDADES BACTERIANAS	
Pudrición suave negra	<i>Pectobacterium carotovorum</i>
Agalla de la corona	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
FITOPLASMAS	
Se han identificado dos fitoplasmas diferentes (16Srl-B y 16SrV-A)	

Fuente: ICARDA y FAO, 2018.

Realizado por: Chafra E., 2022.

1.4 Principales enfermedades reportadas en Ecuador

Los escasos estudios de las enfermedades que atacan los cladodios de tuna encontramos, un estudio realizado por Alvarado et al., (2017, p. 7) en cuatro localidades de la provincia de Loja: Malacatos, San Pedro de la Bendita, Nambacola y San Vicente del Río en cultivares de *Opuntia ficus indica*, instituidas de forma natural o a campo abierto, se evaluó en varias épocas del año para recoger ejemplares de las principales sintomatologías, en cladodios y flores. Se identificó a *Fusarium* sp., patógeno transcendental que provoca el mal conocido como “lágrima de espelma” afectando plantas jóvenes y adultas; además se halló el mal conocido como “antracnosis” provocada por *Colletotrichum* sp., y una agrupación de *Alternaria* sp., y *Capnodium* sp., que ocasiona la “mancha plateada” colectivamente en tunales mayores de 5 años.

1.4.1 Enfermedades de los cladodios de tuna en Ecuador

Entre las principales enfermedades que se presentan en los cladodios de tuna son:

Tabla 3-1: Enfermedades cladodios de nopal o tuna en Ecuador.

Nombre científico	Nombre común	Sintomatología
1. <i>Fusarium</i> sp.	Lágrima de espelma de lágrima de vela.	Mancha acuosa de forma circular, en el centro tiene un color café oscuro con bordes acuosos.
2. <i>Alternaria</i> sp. y <i>Capnodium</i> sp.	Mancha plateada	Inicia con pequeñísimas erupciones, de aspecto clorótico y puntuación rojiza
3. <i>Colletotrichum</i> sp.	Antracnosis	Inicia con manchas cloróticas amarillentas, manchas rojizas, finalmente la mancha se torna blanco cremoso.

Fuente: Alvarado et al, 2017.

Realizado por: Chafla E., 2022.

1.4.1.1 Mancha negra (*Pseudocercospora opuntiae*)

(Ayala et al., 2006, p. 45 ; Quezada et al., 2005, p. 17 citado por Alonso, 2011, p. 6) mencionan que una de las enfermedades más notables en el nopal es la mancha negra causada por el hongo *Pseudocercospora opuntiae*, la cual fue detectada en 1990 en Tlalnepantla, Morelos y es la que más resalta en la baja productividad y de pérdida total en algunas huertas. Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de mancha negra circular y en forma de mapa, y sus síntomas son Mancha circular acuosa, en su etapa avanzada ocasiona desprendimiento del tejido dejando orificios que atraviesan la penca.

Manifiesta los siguientes síntomas; pudrición en los cladodios, decoloración en la cutícula, decoloraciones con forma de puntos verde claro, las manchas se tornan café oscuro de 3-4 cm con borde amarillo, crea una pústula que al secarse se desprende dejando un orificio (Alonso, 2011, p. 18).

1.4.1.2 *Neofusicoccum ribis*

(Somma et al. 1973, p. 35 citado por Aloï et al., 2020, p. 3) reportó una inusual y grave enfermedad de *O. ficus-indica* en Linosa, una pequeña isla del Archipiélago de Pelagian, sur de Sicilia.

La enfermedad fue llamada “chanchro gomoso” refiriéndose al síntoma típico en los cladodios que destruye los cladodios y representa una seria amenaza al nopal, el agente causal fue identificado como *Dothiorella ribis*, actualmente *Neofusicoccum ribis* (*Botryosphaeriaceae*).

1.5 Patogenicidad

El término se refiere a la capacidad de un organismo parásito de causarle daño al huésped (Pedrique de Castro & Gutiérrez, 2008, p. 26). También se conoce como la competencia de un microorganismo de contagiar (invadir y multiplicarse en un ser vivo), produciendo unos síntomas (enfermedad) (Clínica Universidad de Navarra, 2020, p. 15). Adicionalmente la patogenicidad se la considera como la capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible (Perea et al, 1992, p. 22).

Cisterna (2017, p. 17) manifiesta, que la patogenicidad es la cualidad, que poseen algunos microorganismos para producir daño en el huésped; es decir abren paso, para desarrollar la enfermedad. Existen distintos tipos de patógenos:

1.5.1 Patógenos potenciales, facultativos

Viven sin producir daño; se actúan como comensales en determinadas localizaciones, por ejemplo, algunas especies de estafilococos y estreptococos en la piel, hasta que dejan de serlo y producen daño (Cisterna, 2007, p.11).

1.5.2 Patógenos estrictos o patógenos obligados

Es decir, los que no están vinculados con su huésped para producir daño; el ejemplo más representativo sería el del virus del sarampión (Cisterna, 2007, p.11).

1.5.3 Patógenos oportunistas

Ocasionan daño solamente en determinadas circunstancias, coincidiendo con una disminución de los mecanismos inmunitarios, tanto locales como generales, en sujetos inmunodeprimidos. Estos microorganismos forman parte de la flora microbiana habitual del huésped o del ambiente que le rodea, siendo incapaces de producirlo en sujetos inmunocompetentes (Cisterna, 2007, p.12).

1.6 Agresividad

Fue propuesta por Vanderplank en 1963 para el grado cuantitativo de daño que realiza el patógeno a un hospedero.

1.7 Postulados de Koch

Volcy (2008, p. 11) Menciona que Robert Koch, médico alemán, es señalado como uno de los pioneros de la microbiología y de la bacteriología médica. En el siglo XIX, desarrolló la teoría microbiana de la enfermedad que planteaba que las enfermedades infecciosas son de origen microbiano y, de paso, elaboró un revolucionario protocolo experimental aplicado actualmente en la fitopatología para comprobar la patogenicidad de los microorganismos aislados asociados a una enfermedad los postulados de Koch, que son los siguientes:

1. El microorganismo debe encontrarse en todos los organismos con enfermedad, pero no debe encontrarse en organismos sanos.
2. El microorganismo debe aislarse de un organismo enfermo y crecer en cultivo puro.
3. El microorganismo deberá causar enfermedad cuando se inocula en un organismo sano.
4. El microorganismo debe volver a aislarse del huésped experimental enfermo inoculado e identificarse como idéntico al agente causal original (Volcy, 2008, p. 11).

CAPITULO II

2 MARCO METODOLÓGICO

2.1 Características del sitio

2.1.1 Localización

La investigación se estableció en diversas etapas: la etapa *in vitro*, reactivación de las cepas de hongos, ensayos de germinación, crecimiento y esporulación en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; mientras que, la etapa *in vivo* radicó en la ejecución de las pruebas de patogenicidad y agresividad localizado en la plantación de tuna de la Estación Experimental Tunshi, situada en la parroquia Licto, cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo.

2.1.2 Ubicación geográfica

2.1.2.1 Coordenadas de la Estación experimental Tunshi

Latitud: 1°39'05.8" S

Longitud: 78°41'00.4" W

Altitud: 2735 msnm

2.1.2.2 Coordenadas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Latitud: 1°44'54" S

Longitud: 78°37'32" W

Altitud: 2834 msnm

2.2 Materiales y Equipos

2.2.1 Material biológico

- 9 cepas de hongos (ANEXO A)
- 80 cladodios sanos de *Opuntia ficus indica* (ANEXO B)
- Inóculo de hongos pertenecientes a *Cladosporium* sp.
- Inóculo de hongos pertenecientes a *Dipodascus australiensis*.

- Inóculo de hongos del género *Alternaria alternata*
- Inóculo de hongos del género *Fusarium incarnatum-equiseti*
- Inóculo de hongos del género *Epicoccum* sp.
- Inóculo de hongos del género *Fusarium oxysporum*

2.2.2 *Materiales*

Bisturí (N°21), Placas de Petri de Vidrio (90 mm Ø), Frascos de tapa roscable azul (250 mL, 500 mL y 1000 mL) tubos de ensayo (20 mL), cubre y porta objetos, asas de platino, mechero eléctrico, mechero de alcohol, cuchillo, tabla de cortar hoja de bisturí, cepillo dental, micropipeta (10 mL, 100 mL y 1000 mL), puntas de micropipeta (10 µL, 100 µL 1000 µL), probetas (100 mL y 500 mL,), palillos, vaso de precipitación (50 mL, 250 mL y 1000 mL), matraz erlenmeyer (1000 mL y 250 mL), embudo de decantación, papel filtro (57,6 x 46,5 cm), canastilla, cinta de tutorar, manguera, correas de plástico, cubos de agua, algodón, piseta, fundas de polietileno color negro, Coleman 50 Quart Xtreme® 5 Wheeled Cooler, etiquetas, sorbetes, jeringas (3 mL y 10 mL) cinta adhesiva, pinzas, fosforera, marcadores, atomizador, Taipe Abro negro, Cartulinas, Film de plástico, papel aluminio, tamiz, papel toalla, gasas estériles, fundas plásticas transparentes de polietileno (20 x 30 cm), Tarjeta Micro SD 16 Gb, tarrinas plásticas transparentes (500 mL), calibrador digital (Stainless Hardened) y libreta de apuntes.

2.2.3 *Reactivos*

Agua destilada estéril, Hipoclorito de sodio al 1% (Clorox 5,25%), Alcohol al 70%, Lactoglicerol, Sulfato de Streptomycin, Chloramphenicol, Ethanol, Rifamicina, Medios de cultivos: Bacto-Agar al 2,8% (Difco™), Potato Dextrose Agar al 3,9% (PDA Difco™), Jugo V8, Sabouraud Glucosado Agar al 6% (NEOGEN), Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) y Agar-Avena (AV) (40 g /L).

2.2.4 *Equipos*

Cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC-1500IIA2-X), Estereoscopio (COMECTA – IVYMEN 5313309), Autoclave (BIOBASE BKQ-B100II), Microscopio óptico (SWIFT M10), Microscopio óptico (CARL ZEISS), Estéreo microscopio (CARL ZEISS), Baño María (CENCO 97013-16), Destilador de agua (BOECO WS 8000), Orbital Shaker Incubator (COMENTA-IVYMEN 5312096), Ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450), Refrigeradora (Durex), Incubadora (J.P.SELECTA 2001249), Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2), Secador de

vidrio (SELECTA 200038), Microondas (Panasonic 900 w), Cámara fotográfica (CANNON), Orbital Shaker Incubator, Cámara de recuento: Neubauer-improved (8100204).

2.3 Metodología

2.3.1 Reactivación de las cepas fúngicas en estudio

La reactivación de las cepas se efectuó utilizando medio de cultivo PDA marca Difco™ más antibiótico (Cloranfenicol 500 ppm y Sulfato de Estreptomicina 100 ppm), los aislados de las 9 cepas de hongos fueron repicados e incubados a una temperatura de 28° C sin fotoperíodo, valorando constantemente su crecimiento alrededor de 7 días hasta divisar que los hongos colmen por completo las cajas Petri (Figura 1-2).

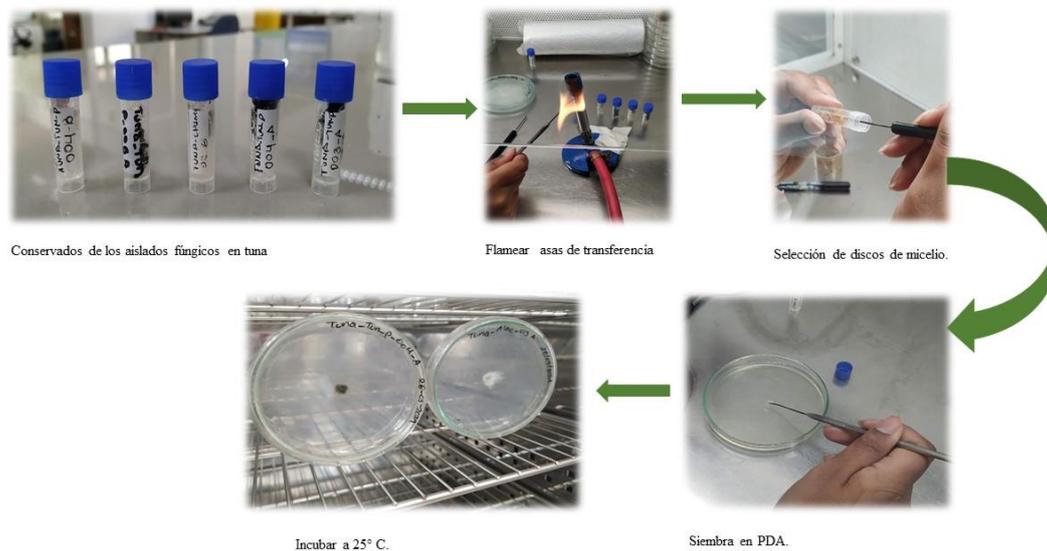


Figura 1-2. Reactivación de aislados fúngicos

Realizado por: Chafila E., 2022.

2.3.2 Preparación de suspensiones conidiales de los aislados fúngicos

Para la preparación de las suspensiones conidiales se partió de los aislados previamente reactivados crecidos en medio PDA y Agar Sabouraud, incubados a 28° C durante 15 días sin fotoperíodo, dentro de la cámara de flujo laminar, y con las cepas de hongos monospóricas, se realizó cortes circulares del micelio con segmentos de sorbetes estériles de cada uno de los hongos, para añadir 5 discos de micelio por cada Erlenmeyer de 250 mL y se colocó en caldo V8 (Figura 2-2), seguidamente se etiquetó, una vez realizada la siembra, se le trasladó al Agitador-

Incubadora Orbital, a una temperatura de 25 °C, a una velocidad de 125 rpm, durante 3 días hasta observar la formación de un halo filamentoso en la parte superior del Erlenmeyer.



Figura 2-2. Ensayo caldo V8 y su composición.

Realizado por: Chafila E., 2022.

Para determinar la cantidad de esporas existente en cada Erlenmeyer con medio de cultivo V8 (líquido), se realizó el conteo la cámara de Neubauer, se tomaron 20 μ L de esta suspensión, bajo el microscopio se realizó el conteo, finalmente se ajustó la concentración de cada uno de los inóculos a una concentración de 1×10^6 conidios/ mL (Figura 3-2).

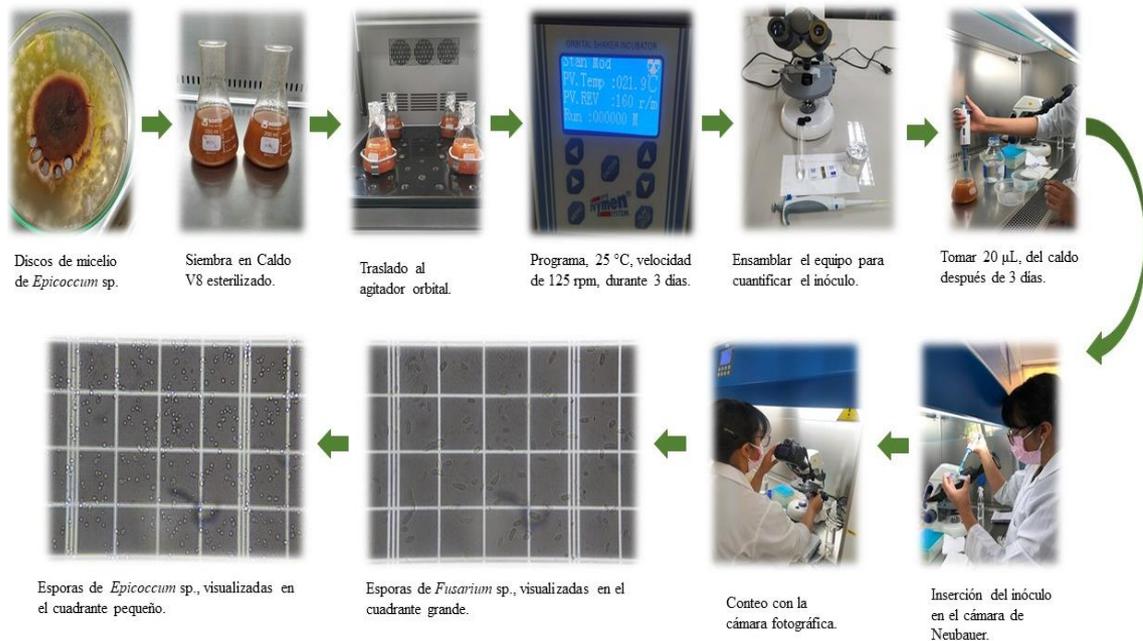


Figura 3-2. Conteo de esporas en la cámara de Neubauer.

Realizado por: Chafila E., 2022.

2.3.3 Preparación de los cladodios de tuna

Para las pruebas de patogenicidad y agresividad se utilizaron 80 cladodios de 40 plantas de tuna de 3 años, previamente establecidas en la estación experimental Tunshi de tuna de 3 años. Se realizó la poda y limpieza de los cladodios antes de las inoculaciones. De cada planta se seleccionaron 2 cladodios jóvenes completamente sanos con tamaños aproximados de 30-50 cm de longitud.

2.3.4 Inoculación de los cladodios

Los hongos aislados se inocularon en cladodios sanos de tuna mediante el empleo de tres métodos. Se transportaron los inóculos y se conservaron a temperatura baja dentro de una nevera hasta que se inocularon.

Los métodos de inoculación utilizados fueron los siguientes:

2.3.4.1 Método de Punción

Dicho método ha consistido en hacer una herida por punción (Figura 4-2) mediante una aguja estéril (jeringas estériles hipodérmicas) sobre el ápice del cladodio, y posteriormente inocular (2 mL) de la suspensión de inóculo a la concentración de 1×10^6 (conidios/mL).

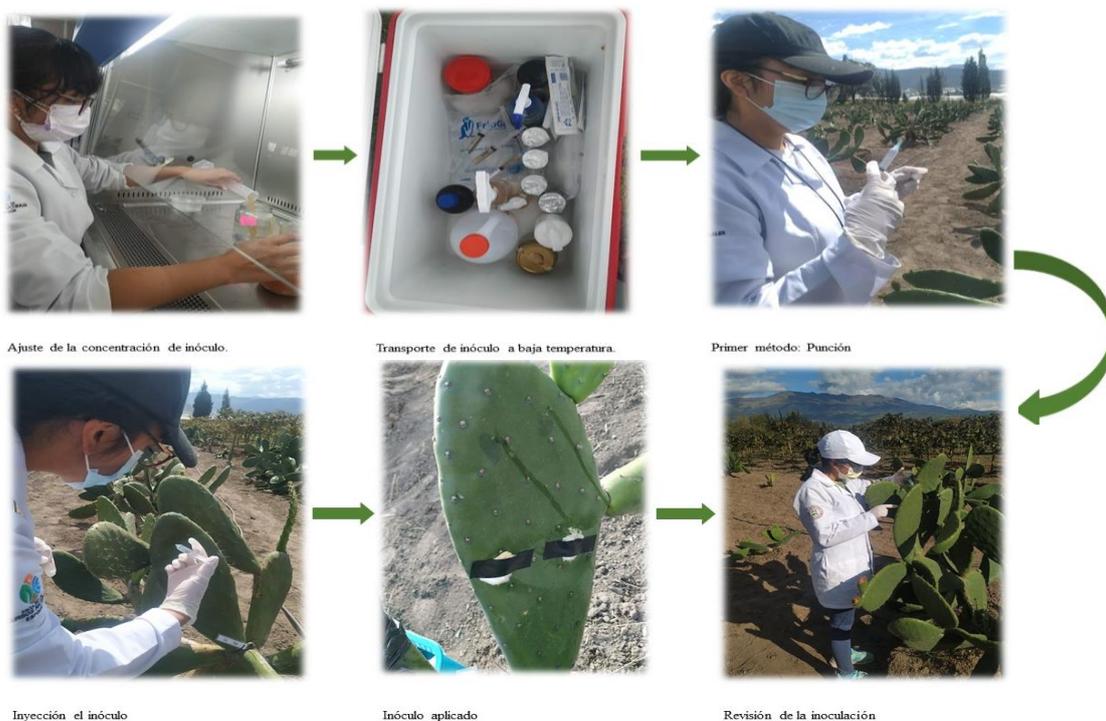


Figura 4-2. Método de punción

Realizado por: Chafra E., 2022.

2.3.4.2 Método de Abrasión

Dentro de cada cladodio de tuna debidamente desinfectado con una solución de hipoclorito de sodio al 2% sobre su superficie, fue realizado un raspado cuidadoso (Figura 5-2) sobre la parte central del cladodio, utilizando papel de lija No. 40, sobre la herida causada, se colocaron 2 discos de micelio para cada hongo y se procedió a cubrir con algodón previamente humedecido y agua que fue esterilizada, cubriendo completamente cada cladodio inoculado utilizando un plástico oscuro a fin de conservar la humedad.



Figura 5-2. Método de abrasión

Realizado por: Chafila E., 2022.

2.3.4.3 Sin Herida

El método utilizado consistió en mantener el cladodio íntegro y realizar un rociado en la parte inferior del cladodio utilizando un inóculo con una concentración de 1×10^6 (conidios/mL) mediante un atomizador manual de 1 L, de forma periódica, se hidrataron con agua esterilizada las zonas inoculadas con el fin de asegurar condiciones adecuadas.

2.3.5 Reaislamiento de agentes fúngicos

Al laboratorio se trasladaron los cladodios de tuna procedentes de cada tratamiento que presentaron síntomas de manchas necróticas circulares para procesar las muestras, se limpiaron cada uno de los cladodios utilizando un paño estéril humedecido con agua destilada estéril para quitar la impureza superficial. A continuación, en cada cladodio en la zona de necrosis, se retiró su capa externa a fin de descartar saprófitos y oportunistas a fin de proceder al reaislamiento. De los cladodios se obtuvieron fragmentos de 0,5 cm² dichos segmentos fueron lavados con agua destilada estéril durante 1 min, desinfectados con alcohol al 70% durante 1 min, posteriormente fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, finalmente, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril durante 1 min. A renglón seguido, las muestras se secaron, etiquetaron y se transfirieron a cajas de Petri con medio PDA, depositando 4 fragmentos de tejido previamente desinfectados en el interior de las cajas de Petri. Por último, las cajas de Petri con medio PDA fueron incubadas a 25° C durante 8 días. Se purificaron los cultivos mediante sucesivos repiques (Figura 6-2).

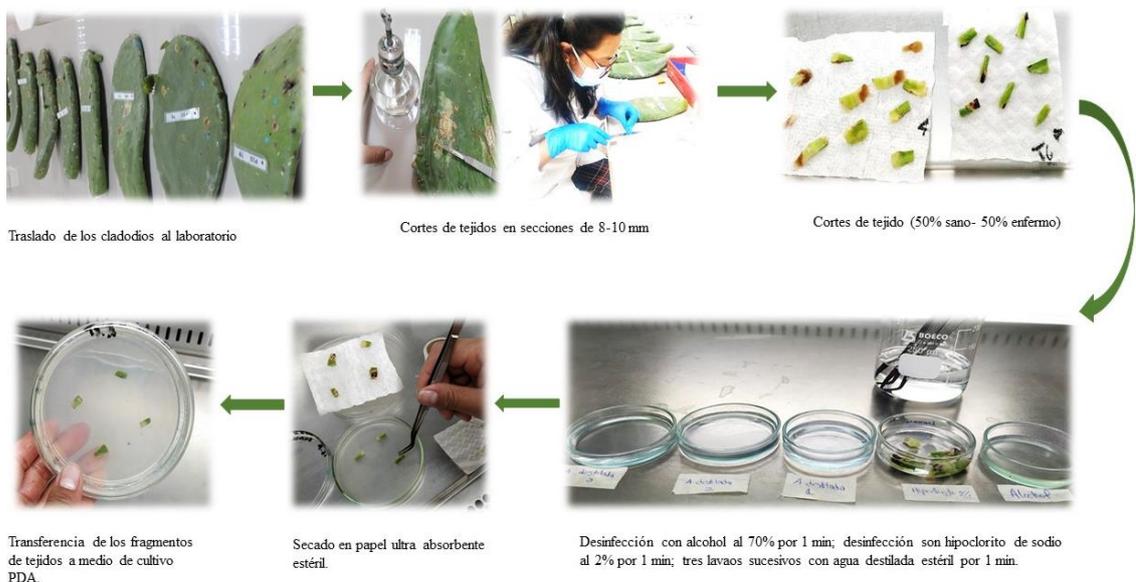


Figura 6-2. Fase 1_ Reaislamiento de agentes patógenos de tejidos sintomáticos en cladodios de Tuna.

Realizado por: Chafía E., 2022.



Figura 7-2. Fase 2_ Reaislamiento de hongos in vitro.

Realizado por: Chafra E., 2022.

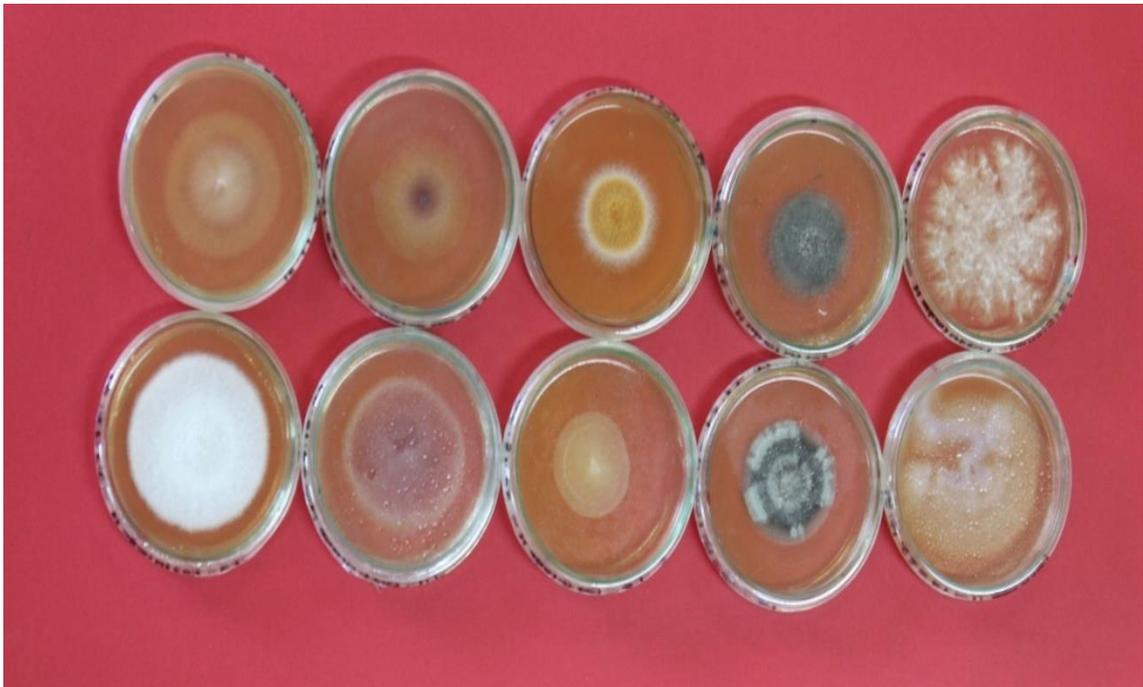


Figura 8-2. Fase 3_ Reaislamiento fase purificación

Realizado por: Chafra E., 2022.

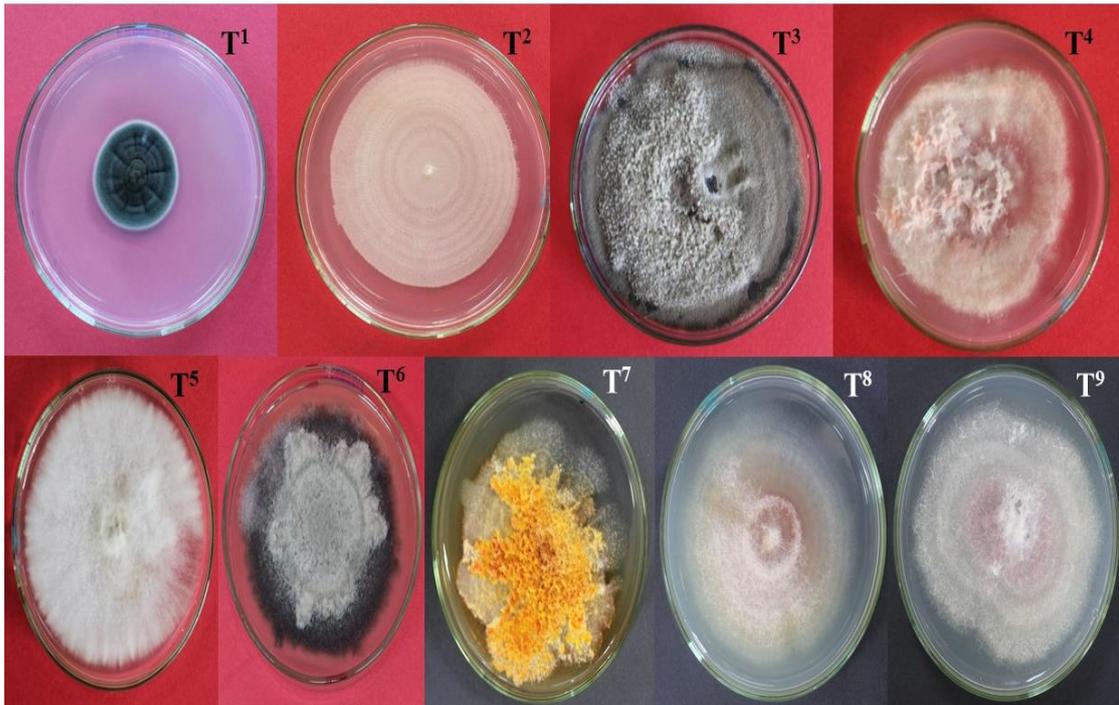


Figura 9-2. Fase 4_ Cultivo monospórico

Realizado por: Chafla E., 2022.

2.3.6 Germinación, esporulación y tasa de crecimiento micelial

2.3.6.1 Germinación

Se ejecutó el experimentos *in vitro*, con el fin de valorar el proceso de germinación de las esporas, se realizaron microcultivos, previamente en el interior de cada caja de Petri, se introdujo una lámina portaobjetos y se trazó un círculo con un lápiz de cera en el centro, añadiendo a continuación con una jeringa estéril una cantidad de 15 mL de agua destilada estéril; mediante un fino raspado de 20 s con la espátula de Drigalski, se tomó una pequeña parte de micelio esporulado, para a continuación extraer 60 μ L de la solución de esporas obtenida con anterioridad y se procedió a colocar en la laminilla porta objetos, se tapó la mezcla y se colocó en incubación por 24 h a la temperatura de 28° C, al concluir el tiempo establecido, las placas de la incubadora fueron extraídas pasando a colocar una gota de lactofenol en cada una de ellas a fin de detener el proceso germinativo, para finalmente colocar una laminilla cubreobjetos sobre cada placa. Para evaluar el ensayo de germinación se contaron 100 esporas al azar de cada laminilla portaobjetos así: *Dipodascus australiensis*, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Epicoccum* sp, como se detalla en la Tabla 7-3.

Se consideró como germinada la estructura reproductiva cuando la longitud de la hifa presentaba el doble de tamaño que la spora.

2.3.6.2 *Esporulación*

Se estableció el experimento *in vitro* de esporulación, tras el período de incubación de los cultivos a 25 °C durante 15 días, a cada caja de Petri se le añadió un volumen de 2 mL de agua destilada estéril y fue raspado suavemente con una espátula de Drigalski durante unos 20 s. A continuación, fueron tomados 10 µL de la suspensión de esporas, procediendo a colocarla en la cámara de Neubauer y calculados como número de esporas/mL, como se detalla en la Tabla 6-3.

2.3.6.3 *Tasa de crecimiento micelial*

Se ejecutó el experimento *in vitro* de la tasa de crecimiento micelial de los ocho géneros de hongos que crecieron en medio PDA, estos fueron repicados para pasar a incubarlos a temperaturas de 25° C por el lapso de 15 días en ausencia de fotoperíodo. Posteriormente se procedió a medir el diámetro micelial con un pie de rey digital en sentido horizontal y vertical, se midió en mm.día⁻¹ a las 48, 96, 120, 144 y 264 h, como se detalla en la Tabla 5-3.

2.3.7 *Diseño experimental*

Experimento *in vivo*

Los factores de estudio para evaluar la patogenicidad y agresividad en cladodios de tuna fueron: diámetro de las lesiones, para lo cual se direccionó con un diseño bifactorial de bloques completos al azar, en el cual los factores utilizados fueron los métodos de inoculación (punción, abrasión y sin herida) y los aislamientos fúngicos, siendo necesarios 4 bloques.

Tabla 4-2: Tratamientos establecidos para experimento *in vivo* (campo).

Tratamientos	Método de inoculación	Aislado fúngico	Estructura infectiva del aislado	Concentración
T1	Punción	<i>Cladosporium</i> sp.	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T2	Punción	<i>Dipodascus australiensis</i>	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T3	Punción	<i>Alternaria alternata</i>	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T4	Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T5	Punción	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T6	Punción	<i>Alternaria alternata</i>	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T7	Punción	<i>Epicoccum</i> sp	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T8	Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T9	Punción	<i>Fusarium oxysporum</i>	Conidios	1x10 ⁶
	Abrasión		Micelio	disco de 5 mm
	Sin herida		Conidios	1x10 ⁶
T10	Punción	Agua	Agua	No aplica
	Abrasión			No aplica
	Sin herida			No aplica

Realizado por: Chafra E., 2022.

2.4 Identificación molecular

2.4.1.1 Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

Los aislados monospóricos fueron cultivados a 25 °C por 15 días, en medio PDA. La extracción de ADN se realizó usando el Kit Promega Wizard, según recomendaciones del fabricante. Se evaluó la integridad y calidad del ADN mediante espectrofotometría y visualización en gel de agarosa al 1%. El ADN obtenido se diluyó hasta una concentración de aproximadamente 20 ng/uL para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se utilizaron los Primers universales EF1-983F/EF1-2218R para la amplificación. Los productos de PCR fueron purificados previo a la secuenciación por el método SANGER. La secuenciación se realizó en la Empresa MACROGEN- KOREA. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y ensambladas. Se compararon las secuencias ensambladas con la base de datos de nucleótidos del GenBank del NCBI mediante la herramienta BLAST.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

3.1 Patogenicidad y agresividad de microorganismos fúngicos en cladodios de tuna

Para las pruebas de patogenicidad y agresividad en cladodios de tuna, se inocularon 9 aislados fúngicos, los mismos que presentaron un periodo de incubación 5 días \pm 1, de los cuales fueron 6 se reportan como patogénicos pues cumplen con el cuarto postulado de Koch, y fueron: *Dipodascus australiensis* (T²), *Alternaria alternata* (T³), *Fusarium oxysporum* (T⁴), *Fusarium incarnatum-equiseti* (T⁵), *Alternaria alternata* (T⁶), *Epicoccum* sp. (T⁷), *Fusarium oxysporum* (T⁸), *Fusarium oxysporum* (T⁹). La cepa de *Cladosporium* sp. (T¹) (ANEXO I), no se asoció a la sintomatología esperada.

3.1.1 Aislados fúngicos que cumplieron con el 4^o postulado de Koch

3.1.1.1 *Dipodascus australiensis* (T²)

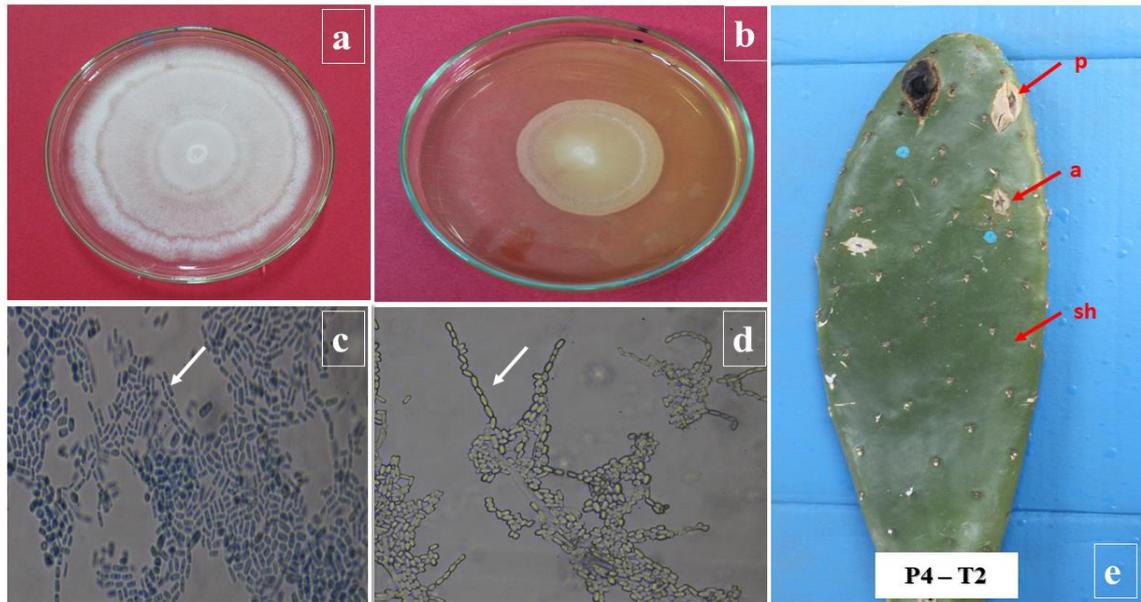


Figura 10-3. Características culturales y morfológicas de *Dipodascus australiensis* (T²).

Realizado por: Chafía E., 2022.

3.1.1.2 *Alternaria alternata* (T^3)

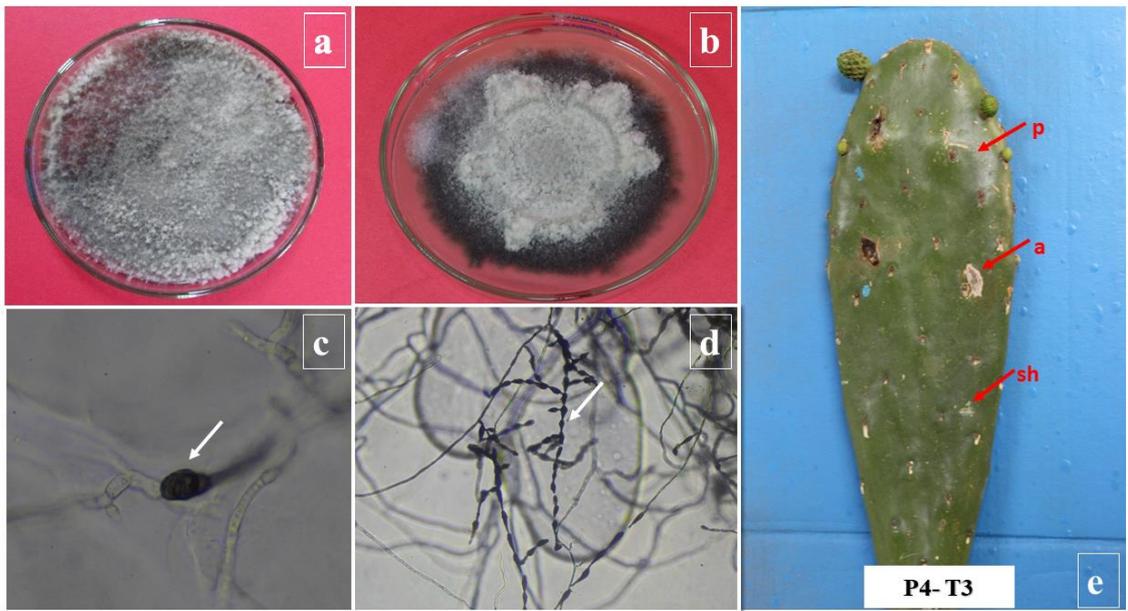


Figura 11-3. Características culturales y morfológicas del *Alternaria alternata* (T^3).

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.1.1.3 *Fusarium oxysporum* (T^4)

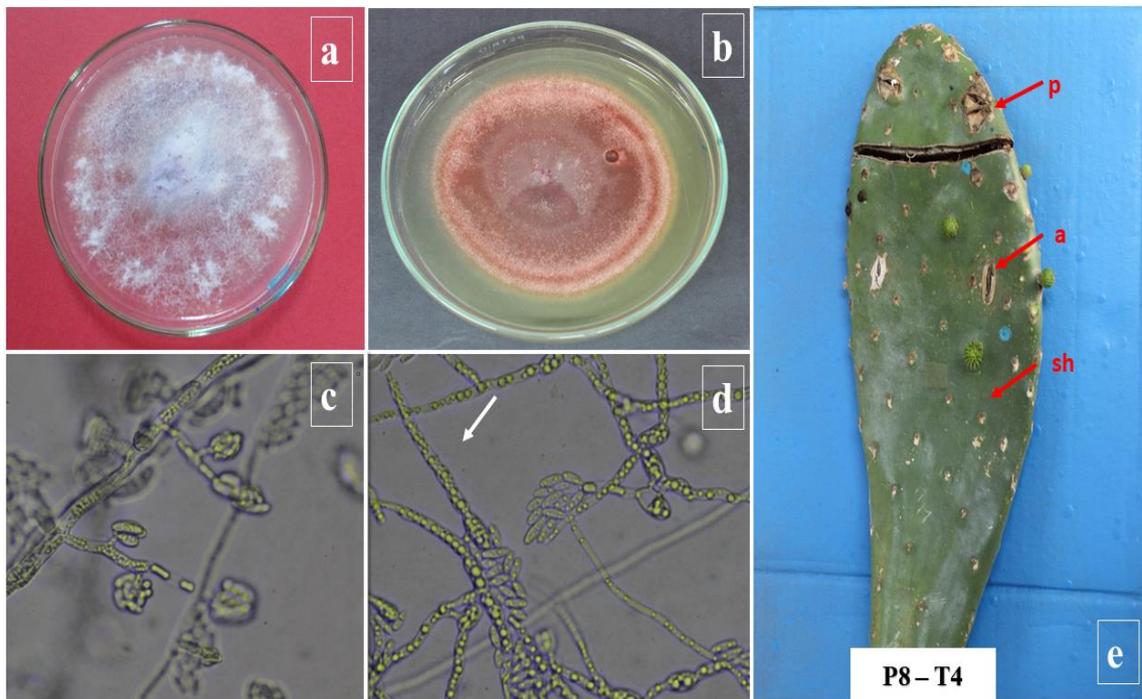


Figura 12-3. Características culturales y morfológicas del *Fusarium oxysporum* (T^4).

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.1.1.4 *Fusarium incarnatum-equiseti* (T⁵)

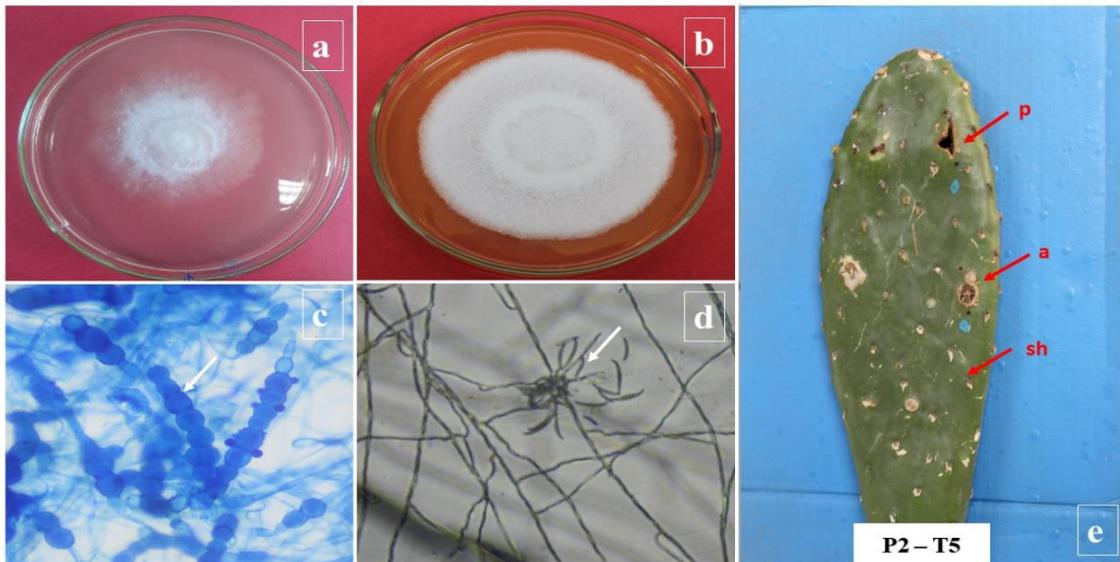


Figura 13-3. Características culturales y morfológicas del *Fusarium incarnatum-equiseti* (T⁵).

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.1.1.5 *Alternaria alternata* (T⁶)

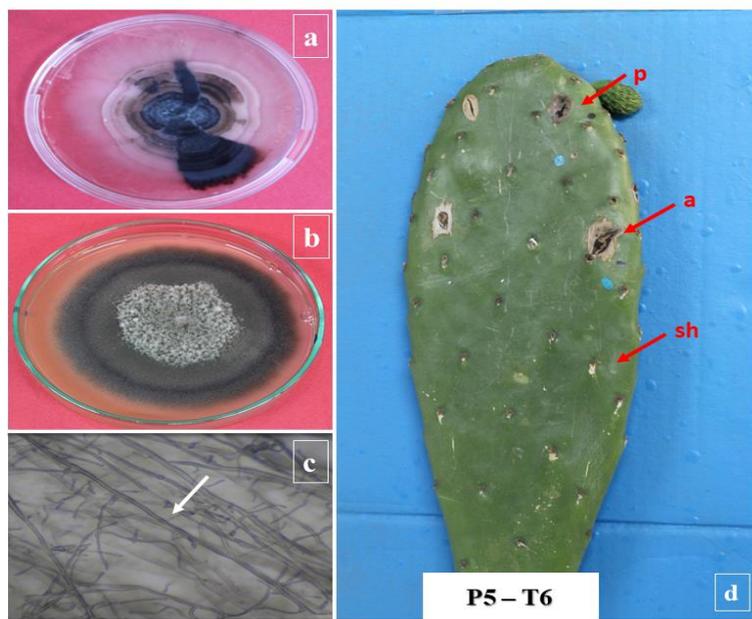


Figura 14-3. Características culturales y morfológicas de *Alternaria alternata* (T⁶).

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.1.1.6 *Epicoccum* sp. (T⁷)

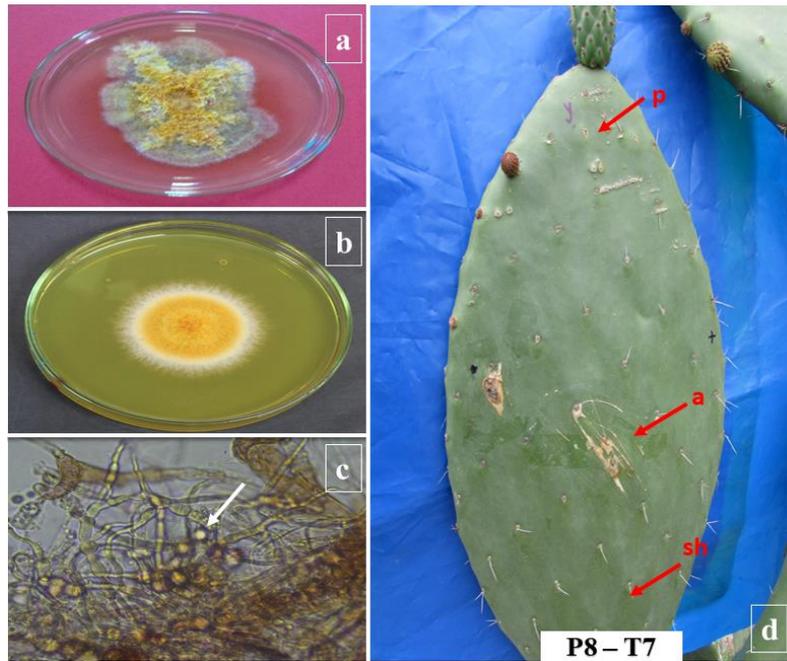


Figura 15-3. Características culturales y morfológicas del *Epicoccum* sp. (T⁷).

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.1.1.7 *Fusarium oxysporum* (T⁸)

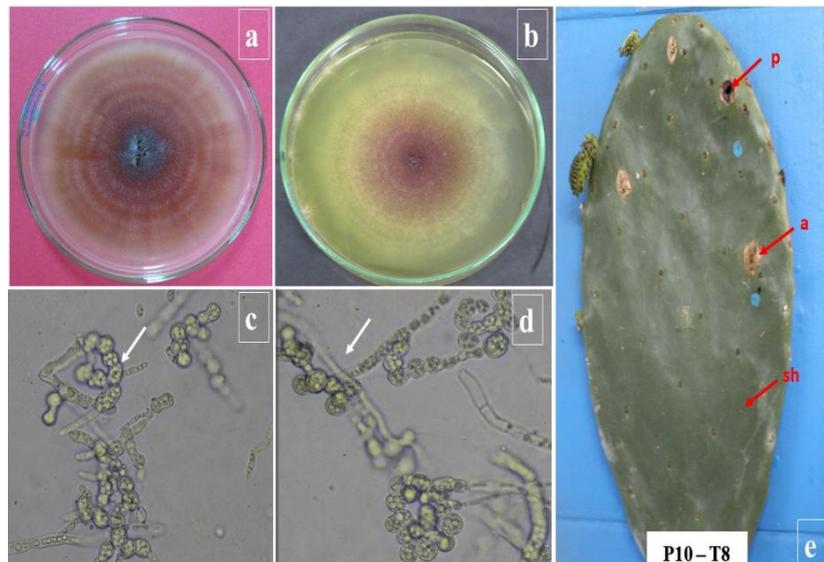


Figura 16-3. Características culturales y morfológicas de *Fusarium oxysporum* (T⁸).

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.1.1.8 *Fusarium oxysporum* (T⁹)

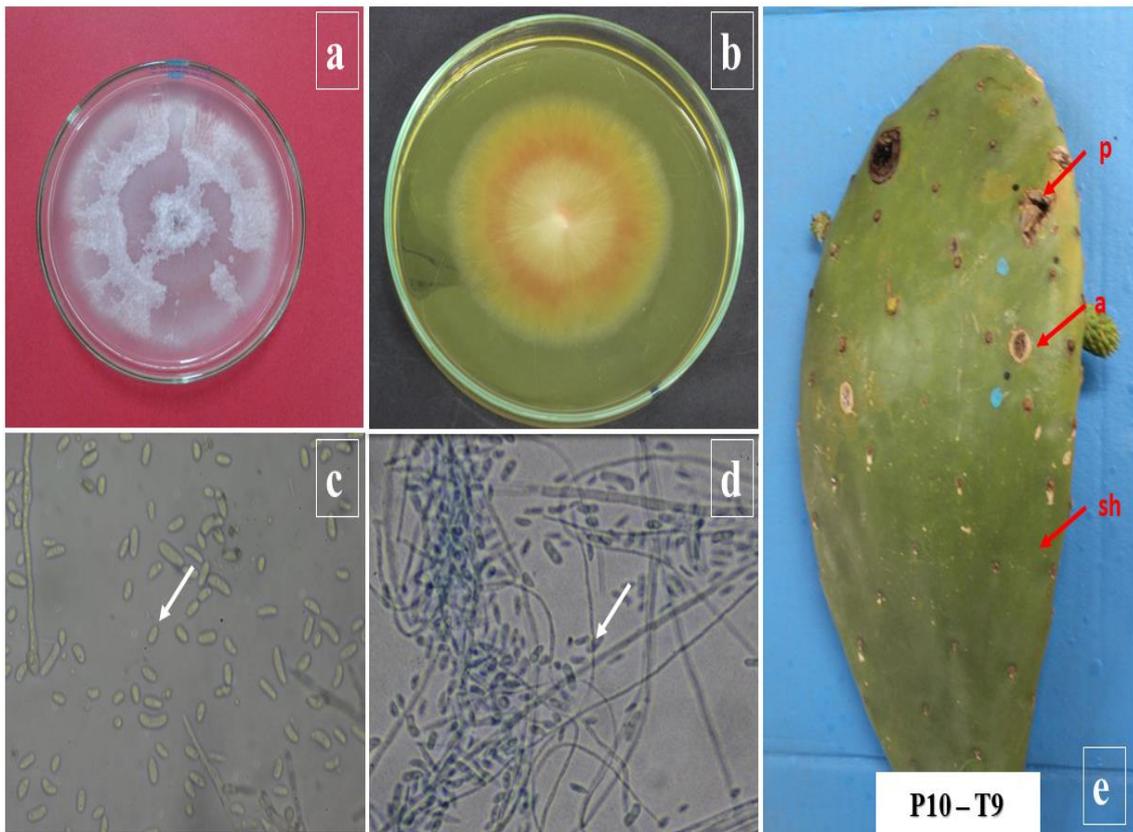


Figura 17-3. Características culturales y morfológicas de *Fusarium oxysporum* (T⁹).

Realizado por: Chafla E., 2022.

3.1.2 Agresividad

Los aislados que presentaron mayor agresividad fueron *Fusarium oxysporum* (T⁴) y *Alternaria* sp. (T⁶), como se muestra en la Figura 19-3:

- *Fusarium oxysporum* (T⁴), por el método de punción con 12,37 mm del diámetro promedio de la lesión.
- *Alternaria* sp. (T⁶), por el método de abrasión con 13,07 mm del diámetro promedio de la lesión.



Figura 18-3. Lesión por punción del hongo *Fusarium oxysporum* (T4) (a, b); lesión por abrasión del hongo *Alternaria* sp. (T6) (c).

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.2 Caracterización de la sintomatología presentada en cladodios de tuna

Las condiciones en las que se presentaron la sintomatología dentro de la plantación de tuna en la estación experimental Tunshi-ESPOCH, fueron: precipitación media anual de 680 mm, con una temperatura media anual es de $18^{\circ} \pm C$, altitud de 2821 msnm; y una humedad relativa 80 %. Cabe recalcar que los métodos de inoculación aplicados fueron punción, abrasión y sin herida; de los cuales únicamente 2 fueron útiles para evidenciar las manifestaciones de los fitopatógenos en cladodios de tuna, el método sin herida en ningún tratamiento presentó sintomatología (Guevara, 2019, p. 24).

A manera de resumen la sintomatología presentada de la amplia gama de aislados fúngicos fue: necrosis, manchas necróticas acuosas de patrones irregulares, secamiento, pudrición, lesiones cloróticas, hinchazones, hundimientos, partidura del cladodio. En el caso puntual de *Fusarium* sp., se caracterizó por una secreción blanquecina conocida como lágrima de espelma la cual se transformó en necrosis en su interior.

3.2.1 Sintomatología por *Dipodascus australiensis* (T²)

La peculiaridad sintomatológica de *Dipodascus australiensis* (T²) sp fue la siguiente: putrefacción blanda, blanquecina y húmeda, seguida de un olor ácido (León et al.,1980) citado por Espinoza, (2021, p. 28) Esta sintomatología coincide con la inoculación de *Dipodascus australiensis* (T²) que al inicio de la infección se observó en el punto de inoculación: por el método de punción se evidenció hinchamiento de los tejidos vegetales afectados; por el método de abrasión una mancha color beige que posteriormente se transformó en una costra blanquecina. Con el tiempo la presencia de este patógeno en el cladodio produce sequedad color marrón y en otros casos en una podredumbre húmeda negra con halos blanquecinos. Figura 20-3.

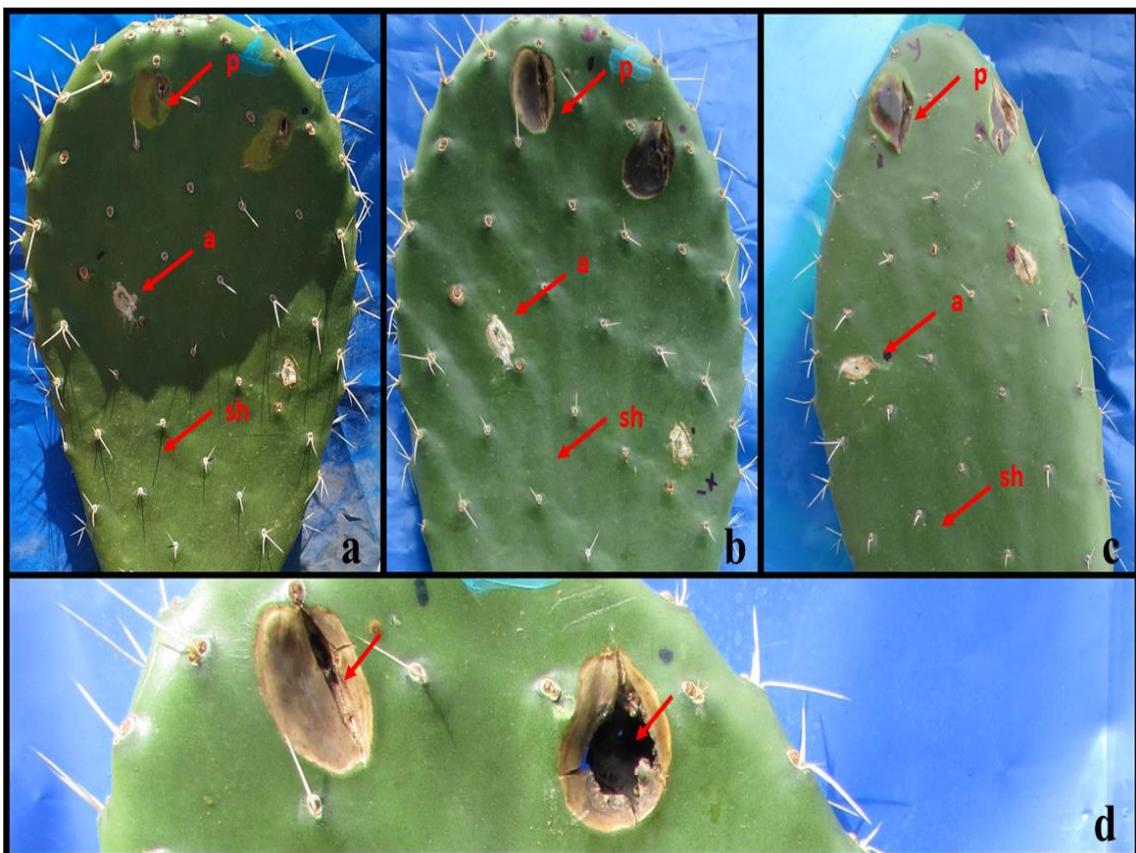


Figura 19-3. *Dipodascus australiensis* (T²) Lesiones cloróticas por punción y abrasión.

Realizado por: Chafla E., 2022.

3.2.2 Sintomatología por *Alternaria alternata* (T³)

Alvarado et al. (2017, p. 31) Indica la evidencia de lesiones de gran extensión se divisan en su centro una tonalidad marrón , además se presenta también otro tipo de magulladura cuyo centro se deprime y esta cercada por una aureola carnosa, esta enfermedad se distingue porque presenta maculas que están cubiertas por una ceniza grisácea que con el paso de los días se establece la mancha de matiz pardo que arropa la totalidad de las pencas. Esta sintomatología coincide con la presentada por *Alternaria alternata* (T³) cuyas lesiones con forman una cicatriz necrótica por abrasión, hinchamiento por punción, además de la formación de un tumor en su interior detallada en la Figura 21-3.

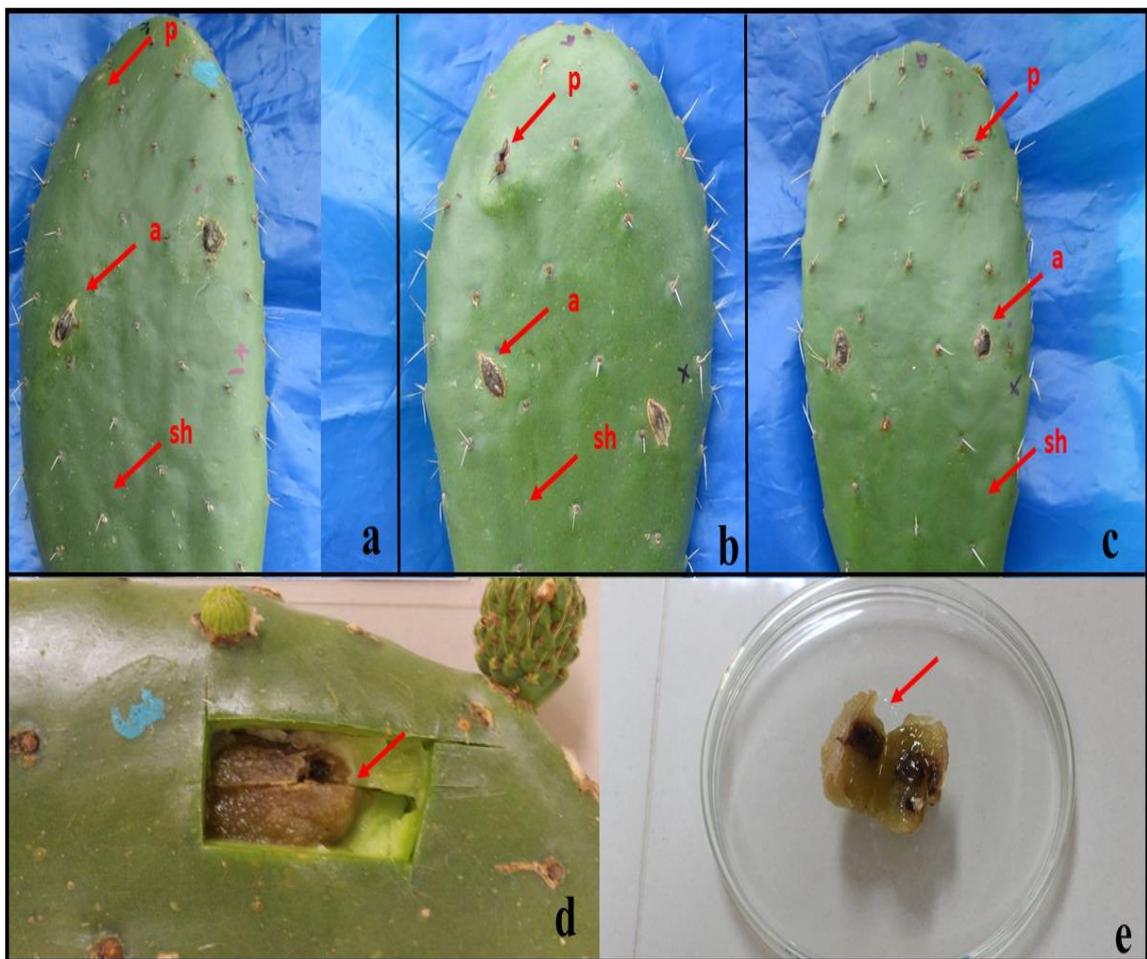


Figura 20-3. *Alternaria alternata* (T³) lesiones por abrasión y punción.

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.2.3 Sintomatología por *Fusarium oxysporum* (T⁴)

Alvarado et al. (2017, p. 31) describe la sintomatología se establece con la aparición de una mancha acuosa redonda, de tonalidad marrón con bordes caldosos, mientras se desarrolla el mal está macula se hunde, dispersándose por todas las riberas del cladodio alcanzando a cubrir más del 50 % del área. Finalmente, se seca, y forma una costra negra con hoyos que son características de la enfermedad, tanto en su médula como en los costados del cladodio. Esta sintomatología coincide con la presentada por *Fusarium* sp. y fue: mancha acuosa con depresiones en el centro, en algunos casos con secreción blanquecina peculiar de este género, seguido de la marchitez de la lesión con perforaciones en la epidermis del cladodio como se detalla en la Figura 22-3.

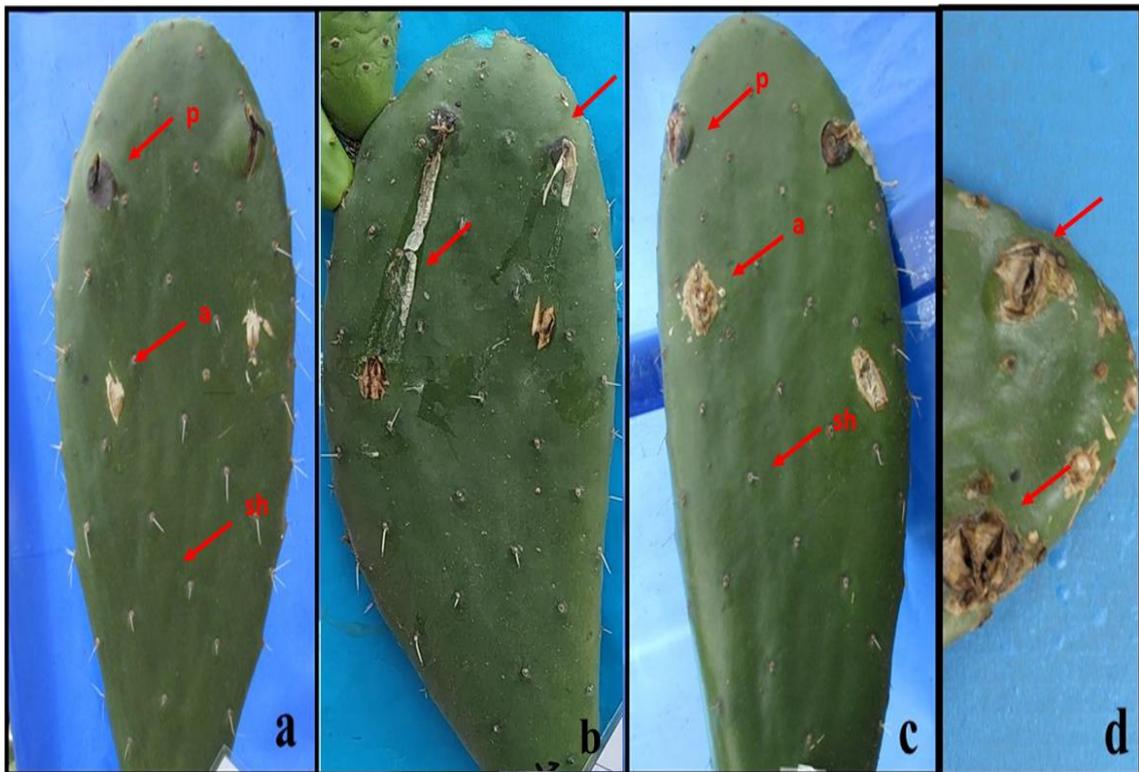


Figura 21-3. *Fusarium oxysporum* (T⁴) Mancha y depresión necrótica por punción(a) Abertura y necrosis por punción (b) Lágrima de espelma (c) Marchitez de la lesión (d).

Realizado por: Chafla E., 2022.

3.2.4 Sintomatología por *Fusarium incarnatum-equiseti* (T⁵)

De igual manera la sintomatología presentada por *Fusarium incarnatum-equiseti* (T⁵), fue: mancha acuosa interna no visible externamente, seguido de la marchitez de la lesión y la formación de una costra beige a marrón con perforaciones en la epidermis del cladodio, además de hinchamiento, marchitez de las lesiones por abrasión de coloración café como se detalla en la Figura 13-3.

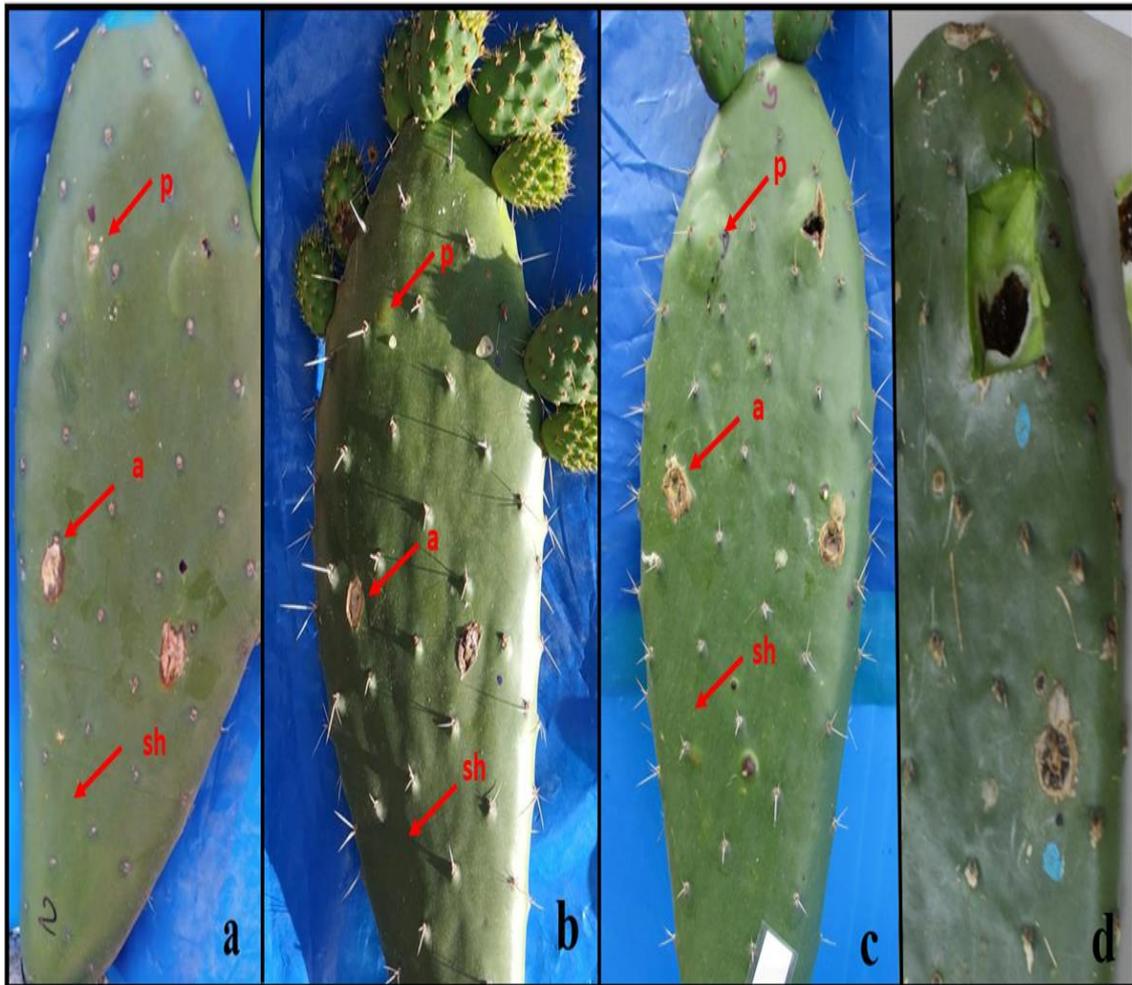


Figura 22-3. *Fusarium incarnatum-equiseti* (T⁵) Hinchamiento por punción y tumor interno, costra blanquecina y lesión necrótica por abrasión.

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.2.5 Sintomatología por *Alternaria alternata* (T⁶)

El tipo de sintomatología presentada por *Alternaria alternata* (T⁶) fue, lesiones con cicatriz necrótica por abrasión, hiperplasia e hipertrofia por punción detallada en la Figura 24-3.

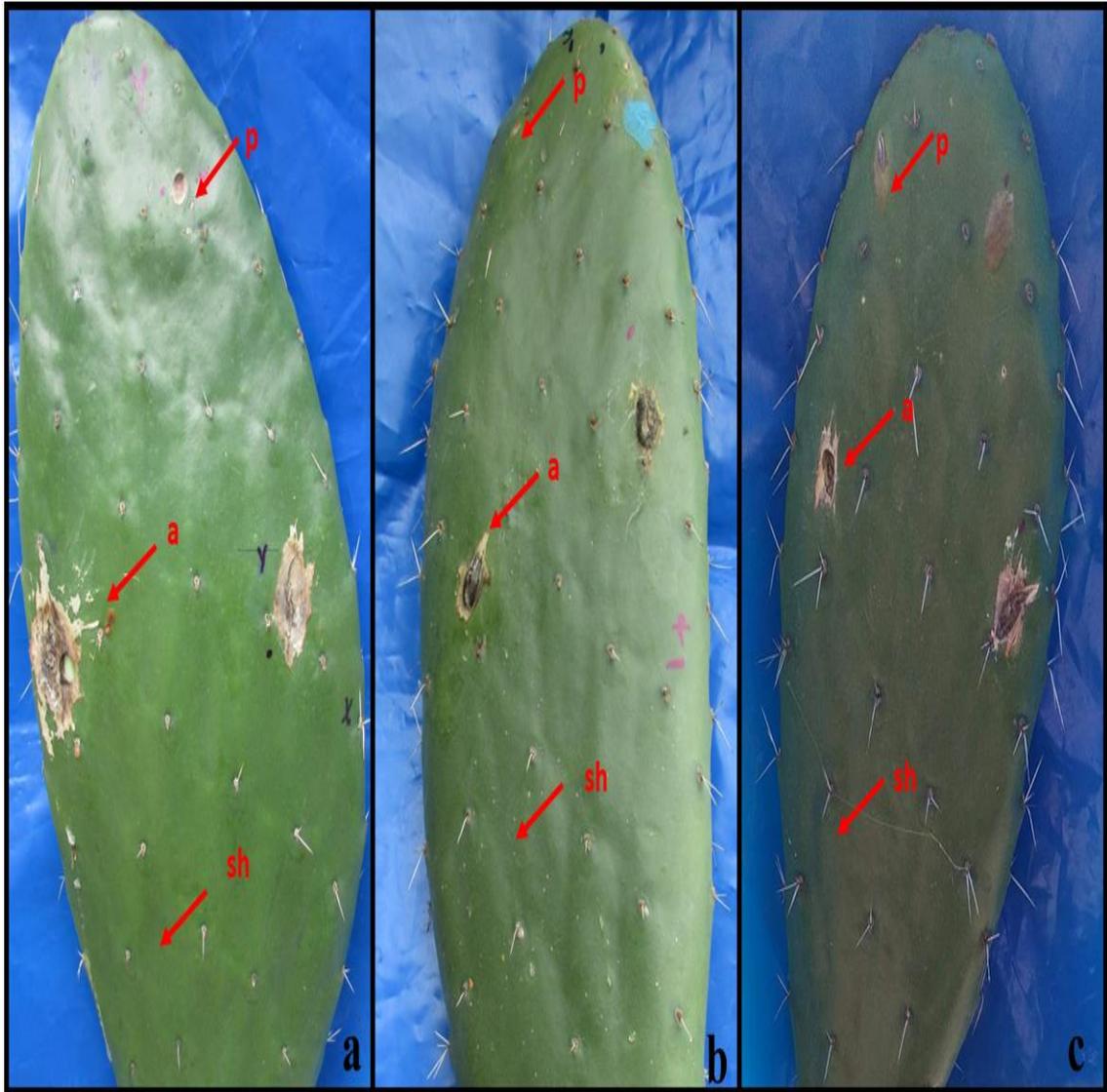


Figura 23-3. Lesiones de *Alternaria alternata* (T⁶)

Realizado por: Chafla E., 2022.

3.2.6 Sintomatología por *Epicoccum* sp. (T⁷)

En general el tipo de sintomatología presentada por *Epicoccum* sp. (T⁷) fue, una ligera lesión acompañada de cicatriz beige a marrón característica de un rasguño por abrasión, detallada en la Figura 25-3.



Figura 24-3. *Epicoccum* sp. (T⁷) La sintomatología más evidente es una sutil lesión por abrasión (a, b, c).

Realizado por: Chafía E., 2022.

3.2.7 Sintomatología por *Fusarium oxysporum* (T⁸)

Alvarado et al. (2017, p. 31) describe la sintomatología se establece con la aparición de una mancha acuosa redonda, de tonalidad marrón con bordes caldosos, mientras se desarrolla el mal está macula se hunde, dispersándose por todas las riberas del cladodio alcanzando a cubrir más del 50 % del área. Finalmente, se seca, y forma una costra negra con hoyos que son características de la enfermedad, tanto en su médula como en los costados del cladodio. Esta sintomatología coincide con la presentada por *Fusarium* sp. y fue: mancha acuosa con depresiones en el centro, en algunos casos con secreción blanquecina peculiar de este género, seguido de la marchitez de la lesión con perforaciones en la epidermis del cladodio como se detalla en la Figura 26-3.



Figura 25-3. Lesiones de *Fusarium oxysporum* (T⁸)

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.2.8 Sintomatología por *Fusarium oxysporum* (T⁹)

Por consiguiente, la sintomatología presentada por *Fusarium oxysporum* (T⁹) fue: abultamientos, grietas y aberturas en la mancha necrótica, seguido de la marchitez de la lesión en la epidermis del cladodio como se detalla en la Figura 18-3.

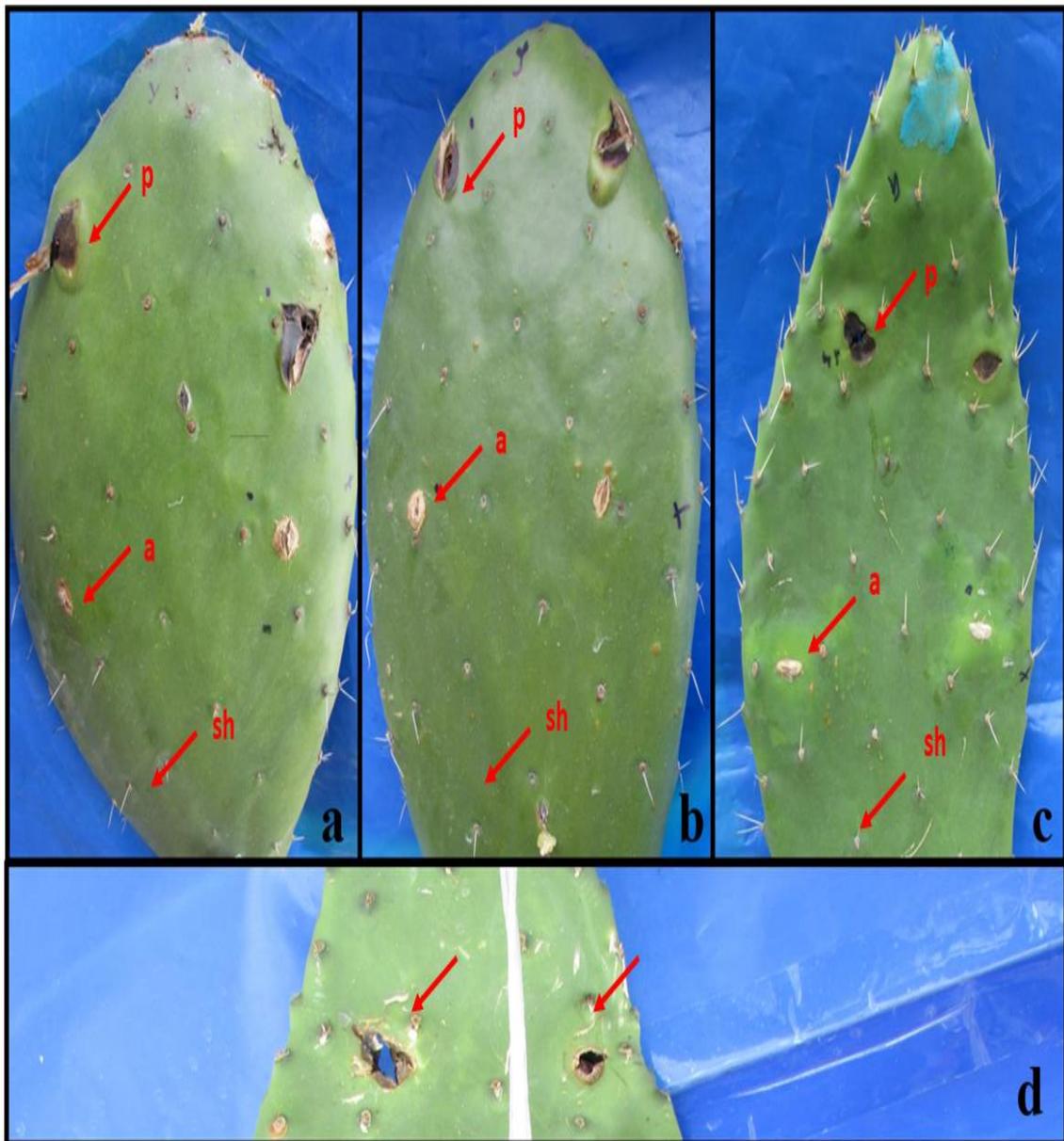


Figura 26-3. Lesiones de *Fusarium oxysporum* (T⁹)

Realizado por: Chafra E., 2022.

3.3 Experimentos *in vitro*

Tabla 5-3: Tratamientos establecidos para la evaluación de la tasa de crecimiento micelial.

<i>Tratamiento</i>	<i>Aislado fúngico</i>	<i>Medio de cultivo</i>	<i>Temperatura °C</i>	<i>Promedio del crecimiento micelial (diámetro mm/día)</i>
1	<i>Cladosporium</i> sp.		No patogénico	
2	<i>Dipodascus australiensis</i>	PDA	25	12,25±
3	<i>Alternaria alternata</i>	PDA	25	9,35±
4	<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	13,05±
5	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	PDA	25	10,54±
6	<i>Alternaria alternata</i>	PDA	25	8,77±
7	<i>Epicoccum</i> sp	PDA	25	4,19±
8	<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	9,56±
9	<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA	25	12,42±

Realizado por: Chafla E., 2022.

El aislado fúngico que presentó mayor tasa de crecimiento fue *Fusarium oxysporum* (T⁴) con 13,05 (diámetro mm/día⁻¹), el aislado fúngico que presentó una menor tasa de crecimiento fue *Epicoccum* sp. (T⁷) con un valor de 4,19 (diámetro mm/día⁻¹).

Tabla 6-3: Tratamientos establecidos para la evaluación de la esporulación de los aislados fúngicos.

<i>Tratamiento</i>	<i>Aislado fúngico</i>	<i>Esporulación promedio (ufc /mL)</i>
1	<i>Cladosporium</i> sp.	No Patogénico
2	<i>Dipodascus australiensis</i>	29,43 x 10 ⁶ ±
3	<i>Alternaria alternata</i>	1,36 x 10 ⁸ ±
4	<i>Fusarium oxysporum</i>	1,8 x 10 ⁷ ±
5	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	10,05 x 10 ⁶ ±
6	<i>Alternaria alternata</i>	5,2 x 10 ⁶ ±
7	<i>Epicoccum</i> sp.	1,38 x 10 ⁸ ±
8	<i>Fusarium oxysporum</i>	3,5 x 10 ⁶ ±
9	<i>Fusarium oxysporum</i>	40,75 x 10 ⁶ ±

Realizado por: Chafila E., 2022.

Los aislados fúngicos, que tuvieron una mayor concentración de esporas fueron *Epicoccum* sp. (T⁷) con 1,38 x 10⁸(ufc /mL), seguido de *Alternaria alternata* (T³) con 1,36 x 10⁸(ufc /mL) y finalmente el aislado con menor concentración de esporas fue *Alternaria alternata* (T⁶) con 5,2 x 10⁶ (ufc /mL).

Tabla 7-3: Tratamientos establecidos para la evaluación de la germinación de los aislados fúngicos.

Tratamiento	Aislado fúngico	Porcentaje promedio de germinación (%)
1	<i>Cladosporium</i> sp.	No patogénico
2	<i>Dipodascus australiensis</i>	6
3	<i>Alternaria alternata</i>	9
4	<i>Fusarium oxysporum</i>	80
5	<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	60
6	<i>Alternaria alternata</i>	7
7	<i>Epicoccum</i> sp.	50
8	<i>Fusarium oxysporum</i>	14
9	<i>Fusarium oxysporum</i>	60

Realizado por: Chafía E., 2022.

El aislado fúngico con mayor porcentaje de germinación fue *Fusarium oxysporum* (T⁴) con 80% y el menor porcentaje de germinación fue *Dipodascus australiensis* (T²) con 6%.

3.4 Evaluación de la agresividad de microorganismos patógenos en cladodios de tuna.

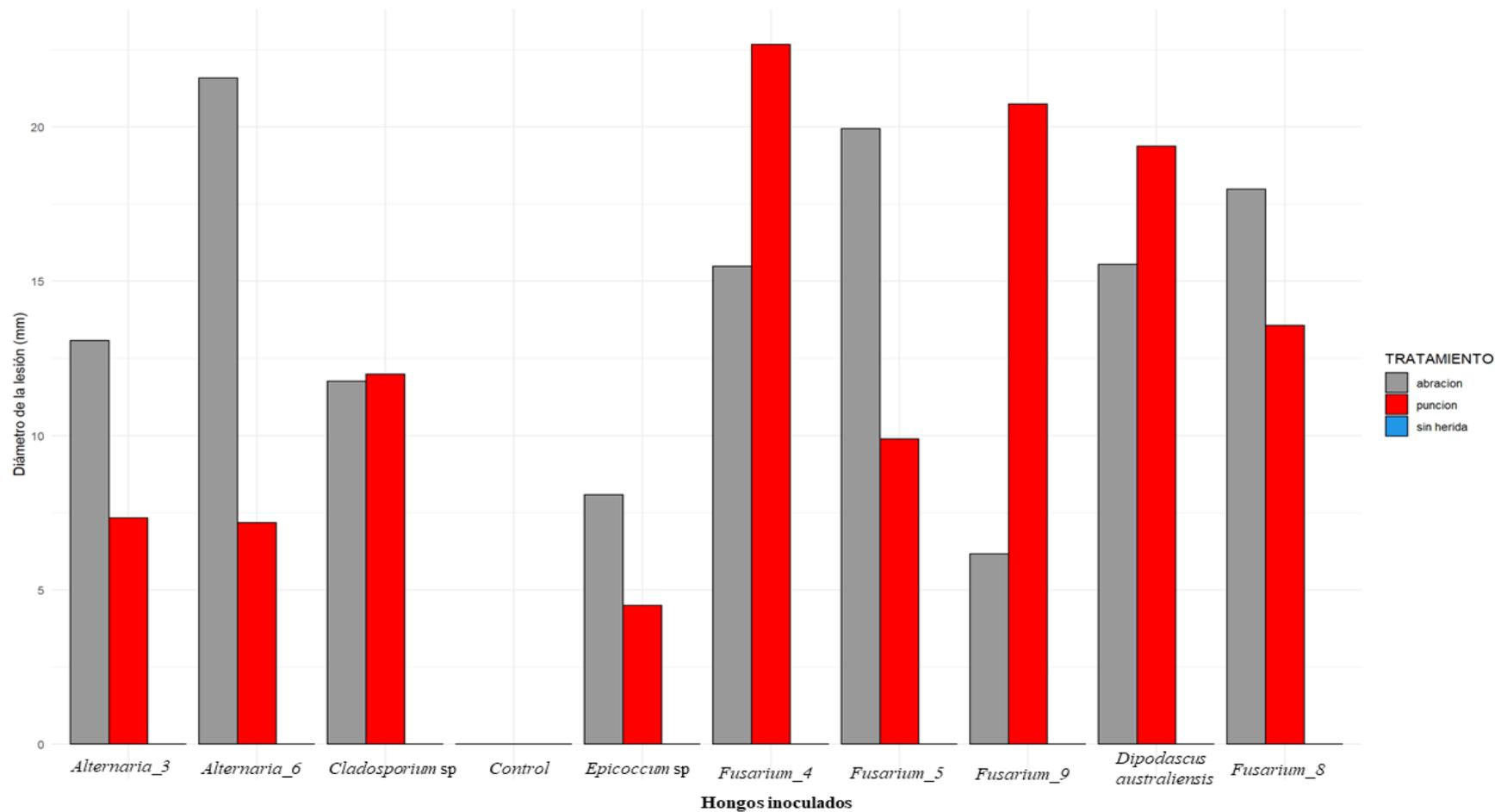


Gráfico 1-3. Diámetro de la lesión evaluado a los 60 ddi, en relación con los tratamientos inoculados durante 60 días.

Realizado por: Chafla E., 2022.

El análisis de varianza del nivel de daño causado por los diferentes aislados fúngicos mostró, efecto significativo de los diferentes hongos inoculados ($P < 0,05$) y de los diferentes métodos de inoculación ($P < 0,05$) (Tabla 8-3).

La prueba de Tukey al 5%, mostró 9 rangos de significancia (Tabla 9-3).

El diámetro de la lesión esta influenciado por los métodos de inoculación, así tenemos que el método sin herida utilizado en todos los tratamientos no causó ningún tipo de sintomatología en cladodios de tuna, el resto de las sintomatologías fueron causadas por los métodos de punción y abrasión. Donde el mayor diámetro fue de 13,06 mm causado por *Alternaria_6*: Abrasión; seguido de *Fusarium_4*: punción con un diámetro de 12,36 mm.

Dipodascus australiensis (T^2) causó una lesión cuyo diámetro es el mayor de todos los tratamientos y su valor fue de 35,79 mm por el método de punción; *Alternaria* sp. (T^6) causó una lesión cuyo diámetro es el mayor de todos los tratamientos y su valor es de 28,45 mm por el método de abrasión. Adicional a lo antes mencionado cabe recalcar que en el método sin herida no presentó sintomatología por lo tanto no generó ningún valor cuantitativo. Así también en el control utilizamos agua y corroboramos que no existen valores en dicho tratamiento.

Tabla 8-3: Análisis de varianza del nivel de daño causado por los aislados fúngicos.

Fuentes de variación	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Suma de cuadrados medios	Valor	Pr(>F)	Significancia
Hongos	9	4146	461	19,005	< 2e-16	***
Métodos de inoculación	2	11200	5600	231,018	<2e-16	***
Bloque	3	176	59	2,42	0,0642	,
Hongo: Métodos de inoculación	18	5290	294	12,125	<2e-16	***
Error	903	21889	24			
Códigos de significancia:						
	0'***'	0,001	'***' 0,01	'**' 0,05	'',0,1	' ' 1

Realizado por: Chafra E., 2022.

Nota:

p-valor: > 0,01 y > 0,05: ns (No significativo)

p-valor: > 0,01 y < 0,05: * (Significativo)

p-valor: < 0,01 y < 0,05: ** (Altamente significativo)

Tabla 9-3: Test de Tukey al 0,05 de los diámetros de las lesiones en mm de las cepas fúngicas inoculadas.

Hongos	Medias	Rangos de significancia
<i>Alternaria</i> _6: abrasión	13,06	a
<i>Fusarium</i> _4: punción	12,36	ab
<i>Fusarium</i> _4: punción	11,98	ab
<i>Dipodascus australiensis</i> : punción	11,79	ab
<i>Fusarium</i> _8: abrasión	10,98	abc
<i>Fusarium</i> _5: abrasión	10,97	abc
<i>Dipodascus australiensis</i> : abrasión	9,35	abcd
<i>Fusarium</i> _4: abrasión	8,78	abcde
<i>Alternaria</i> _3: abrasión	8,54	abcdef
<i>Fusarium</i> _8: punción	8,34	bcdef
<i>Cladosporium</i> : abrasión	6,84	cdefg
<i>Cladosporium</i> : punción	6,69	cdefg
<i>Fusarium</i> _5: punción	5,19	defg
<i>Alternaria</i> _6: punción	4,64	efgh
<i>Epicoccum</i> : abrasión	4,44	efghi
<i>Alternaria</i> _3: punción	4,26	efghi
<i>Fusarium</i> _9: abrasión	3,85	fghi
<i>Epicoccum</i> : punción	3,08	ghi
<i>Alternaria</i> _3: sin herida	0,00	hi
<i>Alternaria</i> _6: sin herida	0,00	i
<i>Cladosporium</i> : sin herida	0,00	i
Control: abrasión	0,00	i
Control: punción	0,00	i
Control: sin herida	0,00	i
<i>Epicoccum</i> : sin herida	0,00	i
<i>Fusarium</i> _4: sin herida	0,00	i
<i>Fusarium</i> _5: sin herida	0,00	i
<i>Fusarium</i> _9: sin herida	0,00	i
<i>D. australiensis</i> : sin herida	0,00	i
<i>Fusarium</i> _8: sin herida	0,00	i

Realizado por: Chafía E., 2022.

3.5 Identificación molecular de los aislados fúngicos obtenidos

La identificación inicial de las secuencias parciales obtenidas de las regiones PCR confirmó que los aislados obtenidos se asocian con los hongos de *Dipodascus australiensis*, *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., y *Epicoccum* spp., como se detalla en la (Tabla 10-3).

Tabla 10-3: Identificación inicial de las secuencias de la región TEF1- α de los hongos en estudio mediante BLASTn en el GenBank del NCBI.

Muestra	Longitud	Organismo Identificado	Fragmento amplificado	% de identidad	Accesión
T ¹		NO PATOGÉNICO			
T ²	872	<i>Dipodascus australiensis</i>	EF1- α	95,87	HF559203.1
T ³	649	<i>Alternaria alternata</i>	EF1- α	100,00	MK340863.1
T ⁴	639	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF1- α	99,84	MN329692.1
T ⁵	736	<i>Fusarium flageliforme</i> (<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i> species complex)	EF1- α	99,73	XM_046127838.1
T ⁶	639	<i>Alternaria alternata</i>	EF1- α	100,00	MK340863.1
T ⁷	640	<i>Epicoccum</i> spp.	EF1- α	100	KX894777.1
T ⁸	657	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF1- α	100	MN329692.1
T ⁹	690	<i>Fusarium oxysporum</i>	EF1- α	99,42	MH973120.1

Fuente: Chafla E., Álvarez P., 2022.

Realizado por: Chafla E., 2022.

DISCUSIÓN

Existe un primer registro en Ecuador realizado por Alvarado et al., (2017, p. 1) en donde se identificó a *Fusarium* sp., como el patógeno más importante que origina el mal llamado “lágrima de espelma” la sintomatología presentada en cladodios de tuna fue : al iniciar la enfermedad se forma una mancha acuosa regularmente circular cuyo centro posee un tono café oscuro con límites acuosos. Alvarado et al. (2017, p. 10) también encontró una asociación de los hongos *Alternaria* y *Capnodium* sp., que causan la enfermedad conocida como “mancha plateada” en cladodios mayores a 5 años, la sintomatología presentada en cladodios de tuna fue: la mancha que se origina desde la base presenta diminutas protuberancias cloróticas con puntuación rojiza, en las lesiones mayores su centro es café oscuro, acompañadas de un polvo grisáceo característico (Alvarado et al., 2017, p. 11).

Espinoza (2021, p. 40) aisló de las localidades de Tunshi, Alacao, Chingazos, y la ESPOCH en la provincia de Chimborazo a microorganismos fungosos a partir de cladodios enfermos, donde observo numerosas anomalías o algún tipo de modificación en su estructura y estas fueron: áreas necróticas, manchas cloróticas, manchas necróticas circulares, hendiduras, pústulas y presencia de halos. La sintomatología fue clasificada como: sintomatología tipo A.- áreas cloróticas alrededor de las espinas las cuales se tornan en una mancha de color oscuro, que conforme pasa el tiempo cubre toda la superficie del cladodio. Sintomatología tipo B.- se describió como hoyos circulares con bordes acuosos y de tonalidad naranja a marrón oscuro con la presencia de un exudado blanco. Sintomatología tipo C.- se identificó por la presencia de necrosis y clorosis sin un patrón definido con resquebrajaduras sobre la superficie del cladodio. Sintomatología tipo D.- necrosis sin patrón de color beige a marrón claro, las mismas que erosionan los bordes y la parte interna la superficie del cladodio (Espinoza, 2021, pp. 46-47). Además de aislarlos Espinoza, (2021, p. 40) realizó el reconocimiento morfológico de cada uno de sus aislados fúngicos, y determinó las características individuales para determinar su identidad, como se detalla a continuación y también se compara con el presente trabajo de las pruebas de patogenicidad con su recolección fúngica en cladodios enfermos.

Los registros fotográficos de *Dipodascus australiensis* (T²), en campo realizado por Espinoza, (2021, p. 81) presentaron lesiones al borde del cladodio, con depresiones marrones en un punto y en otro sitio una mancha necrótica acompañada de una depresión blanquecina que seca el cladodio. En comparación con la inoculación, presentó una mancha color beige que posteriormente se transformó en una costra blanquecina, al transcurrir tiempo la presencia de este patógeno en el cladodio produjo sequedad color marrón y en otros casos una podredumbre húmeda negra con halos blanquecinos.

La evidencia que reportó Espinoza, (2021, p. 81) acerca de *Alternaria alternata* (T³), presentó sintomatología clorosis sin patrón acompañado de costras grises a negras, de manera parecida esta sintomatología coincide en que sus lesiones forman una cicatriz necrótica con bordes beige por el método de abrasión, y por el método de punción con la formación de un tumor.

Espinoza (2021, p. 81) encontró que *Fusarium* sp. (T⁴), *Fusarium* sp. (T⁸), *Fusarium* sp. (T⁹), mostraron manchas necróticas circular con bordes acuosos y otras manchas forma de mapa que cubrieron más del 50% del cladodio además presentaron secreciones blanquecinas, de igual manera se evidenció esta sintomatología como manchas acuosas con depresiones en el centro, en algunos casos con secreción blanquecina peculiar de este género, seguido de la marchitez de la lesión con perforaciones en la epidermis del cladodio. Las indagaciones fotográficas de *Fusarium* sp (T⁵), en campo realizado por Espinoza, (2021, p. 81) mostraron manchas en forma de mapa de color marrón oscuro con puntos negros cuyos bordes fueron acuosos, y cubre en un 70% la superficie del cladodio, en este caso la sintomatología fue algo diferente, presentando: manchas acuosas internas no visibles externamente, seguido de la marchitez de la lesión y de la formación de una costra beige a marrón con perforaciones en la epidermis del cladodio. Las exploraciones fotográficas de *Alternaria* sp. (T⁶), en campo realizado por Espinoza, (2021, p. 81) registraron una sintomatología muy agresiva pues se desprendieron partes del cladodio cuyas características fueron, manchas que se sitúan indefinidamente casi redondeadas con bordes beige cuyo centro estuvo constituido de una costra negra con secamientos, en comparación con los cladodios inoculados presentando manchas necróticas circulares y lesiones con costra negra rodeadas de un halo beige por el método de abrasión. La evidencia fotográfica de *Epicoccum* sp. (T⁷), en campo realizado por Espinoza, (2021, p. 81) mostró una costra beige cuyo centro presentó una costra negra con una ligera depresión en el centro. En comparación con la sintomatología presentada que fue una lesión a manera de rasguño acompañada de cicatriz beige a marrón por el método de abrasión. Cabe recalcar que el presente trabajo de investigación es pionero en la identificación morfológica y molecular de nuevos reportes fúngicos en el Ecuador asociados a manchas necróticas circulares en tuna (*Opuntia ficus indica* Mill), estos nuevos reportes están asociados con hongos como: *Dipodascus* sp., *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum-equiseti* y *Epicoccum* sp. Agrios (2005, p. 255) menciona que a escala mundial los hongos patogénicos forman la clase más destacable en cuanto a la frecuencia y nivel de daño que pueden causar visto desde una perspectiva económica. En consecuencia, el mismo autor relaciona que en la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son promotores de enfermedades de pre y postcosecha en cultivares, siendo los agentes causales de pérdidas económicas, disminución de la tasa fotosintética, es decir, la alteración en el crecimiento y desarrollo del huésped atacado por microorganismos. Además, los fitopatógenos más relevantes que ocasionan mayores pérdidas son los hongos, autores de la descomposición de frutos, hojas, tallos, raíces; existe un grupo reconocido de hongos

fitopatógenos responsables y son: *Alternaria*, *Botrytis*, *Diplodia*, *Rhizoctonia*, *Monilia*, *Penicilium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Mucor* (FHIA, 2007, p. 34 citado en Juárez et al., 2010, p. 6).

Las manifestaciones de los fitopatógenos son muy diversas: en primera instancia pueden ser de tipo local, cuando afectan una pequeña porción de tejido; general, cuando causa daño en toda la planta (García, 2004, pp. 103-107 citado por Juárez et al, 2010, pp. 6 -7). El tipo de daño producido generalmente por los hongos es el síntoma de necrosis, la sintomatología es muy variada, puede constar también de: costras, lesiones, manchas circulares, mal formaciones, clorosis, manchas con patrones irregulares, amarillamiento, secamiento, secreciones, pudrición además pueden mostrar atrofia total o parcial en la planta, hipertrofia que es el crecimiento excesivo de las células vegetales, también afectan el sistema radicular produciendo marchitez. Para que un patógeno infecte a una planta necesita adherirse a la parte más superficial de la célula vegetal que está compuesta por celulosa y cutícula, luego ejerce presión en la superficie que desea traspasar con la ayuda de hifas revestidas de sustancias mucilaginosas, donde el patógeno como el huésped luchan por sobrevivir. Si el patógeno logra infectar en la planta cada vez, más y más secreta enzimas que degradan la pared celular (Fitoagro, 2018, p. 3).

La ubicación geográfica del Ecuador es aventajada desde punto de vista agronómico, ya que nos permite poseer varios pisos altitudinales lo que se traduce en la siembra de una mayor variedad de productos que garantizan la seguridad alimentaria, los mismos que abastecen de una amplia gama de nutrientes. Por esta razón podemos gozar una variedad de frutos como la tuna, frutilla, mora, pitahaya, café, banano, arroz, plátano verde, avena, té, lechuga, papa, maíz, sandía, frutales, etc., ¿Y esto qué tiene que ver con las pruebas de patogenicidad? Los frutos obtenidos son el resultado de un largo trabajo que requirió de mucha energía empleada por las plantas en el campo, los mismos que en la mayoría de las veces se ven interrumpidos por hongos, bacterias, virus, nemátodos, fitoplasmas, factores bióticos y factores abióticos, etc. Con este preámbulo en el presente trabajo revelamos a los hongos fitopatógenos que afectan los cladodios en el cultivo de tuna.

Hoog & Herrero (2005, p. 389) reportan a *Dipodascus australiensis*, (el género anamorfo es *Geotrichum*) parece ser específico en frutas y hojas podridas de suculentas en zonas desérticas, aislado de cladodios podridos con necrosis de *Opuntia*. Decco (2019, p. 4) expone entre las cualidades trascendentales de la sintomatología de *Geotrichum candidum* es un característico pupretafacto suave, seguido de un olor desagradable en cítricos y frutas de hueso. Por consiguiente (Butler, 1965, p. 24 citado por Nakamura, 2017, p. 3) designaron a *Geotrichum candidum* como el causante de la podredumbre agria de los cítricos, donde se aplicaron pruebas de patogenicidad en frutos cítricos con un enfoque fisiológico, para distinguir entre los tipos de patogenicidad del hongo designaron el término “raza de los cítricos” a este patógeno para diferenciarlo de las cepas no cítricas haciendo referencia a su patogenicidad en los frutos cítricos, debido a que los tipos

cítricos y no cítricos son morfológicamente indistinguibles. Más tarde Caretta (1961, p. 9) confirmó la patogenicidad de *Geotrichum candidum* en tomate ya que los patógenos se propagan en el interior del fruto y preponderantemente en el área de los haces fibrovasculares de la placenta.

Así mismo, coexisten cepas virulentas de *Geotrichum candidum* para tomate. Flores et al. (2013, p. 1) reportaron un total de 41 aislamientos fúngicos, 7 aislamientos causaron lesiones en cladodios según las pruebas de patogenicidad. La identificación morfológica y molecular demostró a el aislamiento de *Alternaria alternata*, *Fusarium lunatum*, los cuales presentan sintomatología de manchas circulares en cladodios. También (Swart & Kriel 2002, p. 15 citado por Flores et al., 2013, p. 2) mencionan *Alternaria tenuissima*, se aisló de superficies secas con necrosis y causa manchas cloróticas, de igual manera *Alternaria alternata* y *Fusarium solani* constantemente fueron aisladas del tejido infectado en cladodios de tuna. De nuevo (Am mar et al., 2004, p. 21 citado por Flores et al., 2013, p. 6) relaciona a *Alternaria alternata* como el agente causante de manchas en cladodios de tuna *O. ficus-indica*, en Egipto. Por otra parte, Flores et al., (2013, p. 6) expone que en base a las pruebas patogenicidad e identificación morfológica y molecular, que *Alternaria alternata*, *Fusarium lunatum* están relacionadas con síntomas de manchas redondas en cladodios de tuna. De la misma forma (Granata y Sidoti., 1997, p. 322 citado por Ochoa, 2015, p. 3) concluyeron que, entre las enfermedades asociadas al nopal en México, la de mayor incidencia es la “enfermedad dorada” provocada por el hongo *Alternaria alternata*. Asimismo, Ramírez (2021, p. 33) describe la enfermedad llamada mancha de las pencas “Antracnosis” o “Mal del Oro”, se atribuyéndola a *Alternaria* sp. Este mal se caracteriza por una modificación progresiva en el matiz del color verde que a continuación se transforma en amarillo dorado. La jerarquía de esta mal reside en que paraliza el proceso de fotosíntesis en los cladodios afectadas al ser tapadas por un manto secretado por el hongo, lo cual reduce drásticamente la productividad del nopal.

Respecto a *Fusarium* Laureano, (2021, pg. 3) reportó que es causante de manchas marrón oscuro a negro, que afectan superficialmente los tejidos, cuando el ciclo de la enfermedad se completa se puede notar desprendimiento de las zonas atacadas dejando a su paso cicatrices y deformidades sobre el cladodio, coloquialmente se ha denominado esta enfermedad como costra negra, pudiendo llegar a una incidencia del 60%. De igual forma Monzón & Rodríguez, (sin fecha, p. 1) exponen la propagación del género *Fusarium* que encaja dentro de las infecciones categorizadas por hialohifomicosis, dada a su vasta expansión cosmopolita se le adjudica su potencial de propagación donde el viento y la lluvia son sus mejores aliados. Se ha confirmado que el viento puede transportar esporas inclusive a 400 km de recorrido. Además, Gryzenhout et al. (2017, p. 1) describen la sintomatología, de dos clases la primera por una putrefacción inolora interna en cladodios, que manifestó hinchazones con pudriciones en el interior en cultivares mejorados como Fusicaulis y Fresno mas no se produjo muerte en los cladodios. La segunda presentó necrosis desde la punta de los cladodios hacia toda la planta, el proceso de infección en cultivares distintos

a los citados previamente puede tomar 2 años hasta su muerte. Se aisló microorganismos fúngicos de cladodios con manchas necróticas superficiales. En efecto se demostró la presencia de *Fusarium lunatum* en el complejo *Fusarium dimerum* que en el transcurso de una semana de haberse inoculado se evidenció heridas con exudados blanquecinos, las cuales crecían al interior del tejido convirtiéndose en necrosis. Los reaislamientos recuperaron con éxito al inoculo de las lesiones inducidas, y se comprobó que *Fusarium lunatum* es partícipe de manchas en cladodios de tuna. De igual manera la baja productividad y detrimento en cultivares de tuna es causado por la mácula negra en cladodios. Los actores asociados a la etiología de la enfermedad fueron *Colletotrichum gloeosporioides* según (Osada & Cárcamo, 1999, p. 115). Y *Fusarium solani* de acuerdo con (Morales & Hernández, 2002, p. 11 citado por Quezada, 2006, p. 5).

Taguiam et al. (2020, pp. 4-7) reportaron a *Epicoccum sorghinum*, como patógeno en pitahaya o fruta del dragón, donde se pudo evidenciar en tallos inoculados al transcurso de 3 días, manchas necróticas marrones con depresiones en el lugar de inoculación. Esta investigación demostró la patogenicidad de *Epicoccum sorghinum* en tallos de pitahaya mediante la identificación molecular y esta patogenicidad en 3 especies de pitahaya (*Hylocereus undatus*, *H. monacanthus* y *H. megalanthus*) reportándose como un patógeno peligroso para este cultivo. Por esta razón si se deja pasarlo desapercibido tendría consecuencias devastadoras en la producción de pitahaya y lo mismo podría potencialmente suceder en el caso de tuna.

Taguiam et al. (2021, p. 2) reportan varias especies de *Epicoccum* que producen enfermedades en las plantas y ciertas especies actúan como agentes de control biológico contra una variedad de patógenos de las plantas. Las 18 especies de *Epicoccum* que causan enfermedades producen manchas foliares. Entre ellas se destaca, *Epicoccum nigrum* que causa la mancha foliar en *Lotus corniculatus*, una importante especie forrajera en Argentina.

En India, se informó que una mancha foliar causada por *Epicoccum nigrum* en lentejas (*Lens culinaris*) que provocó una reducción del rendimiento del 20 al 35 % (Mahadevakumar et al., 2014, p. 98 citado por Taguiam et al, 2021, pp. 7-10). En el caso del arroz la infección producida por *Epicoccum nigrum* causa manchas marrones en las glumas (Kodama & Tsuchiya, 1981, pp. 107-109 citado por Taguiam et al, 2021, pp. 2-7). Los resultados logrados en la presente investigación demuestran la relación cercana entre los hongos del género *Geotrichum* sp. o *Dipodascus australiensis* (Teleomorfo) , *Alternaria* spp. *Fusarium* spp. y *Epicoccum* sp., con la sintomatología de manchas necróticas en el cultivo de tuna en las principales localidades muestreadas, por lo tanto, se convierte en una herramienta necesaria para el manejo fitosanitario y manejo agronómico, de los cultivares de tuna para prevención y manejo de las enfermedades de los cladodios de tuna en otras localidades del Ecuador, con este aporte a la ciencia se concede el respaldo a la agricultura familiar campesina que dependen de esta noble planta para el sustento de sus familias.

CONCLUSIONES

- Esta investigación es el primer aporte usando caracterización morfológica y molecular en el Ecuador, determinando que los aislados fúngicos: *Dipodascus australiensis*, *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Epicoccum* spp., fueron patogénicos en cladodios de tuna, además de que no existen registros de géneros de hongos fitopatógenos *Epicoccum* spp. y *Dipodascus australiensis* como causantes de manchas necróticas circulares en cladodios de tuna en el Ecuador.
- De los nueve aislados inoculados en cladodios de tuna, seis fueron patogénicos (*Dipodascus australiensis*, *Alternaria alternata* cepa 3, *Alternaria alternata* cepa 6, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Epicoccum* spp.) causando sintomatología externa (manchas necróticas, secamiento, costras, secreciones, abultamientos) y sintomatología interna (pudrición, necrosamiento, tumores). *Dipodascus australiensis* manifestó la siguiente sintomatología mancha color beige que posteriormente se transformó en una costra blanquecina, sequedad color marrón y en otros casos en una podredumbre húmeda negra con halos blanquecinos, *Alternaria alternata* cepa 3 manifestó la siguiente sintomatología cicatriz necrótica con bordes beige acompañada de un tumor. *Alternaria alternata* cepa 6 manifestó la siguiente sintomatología manchas necróticas circulares lesiones con costra negra rodeadas de un halo beige. *Fusarium incarnatum-equiseti* manifestó la siguiente sintomatología manchas acuosas interna, marchitez de la lesión y la formación de una costra beige con perforaciones en la epidermis del cladodio. *Fusarium oxysporum* manifestó la siguiente sintomatología manchas acuosas con depresiones en el centro, secreción blanquecina peculiar de este género, marchitez de la lesión con perforaciones en la epidermis del cladodio. *Epicoccum* spp. manifestó la siguiente sintomatología lesión a manera de rasguño acompañada de cicatriz beige.
- *Cladosporium* sp. no fue patogénico, esto se concluyó debido a la ausencia de sintomatología de manchas circulares necróticas en cladodios de tuna.
- Las cepas fúngicas más agresivas con el mayor nivel de daño fueron: *Fusarium oxysporum* cepa 4, por el método de punción con 12,37 mm del diámetro promedio de la lesión y *Alternaria alternata* cepa 6, por el método de abrasión con 13,07 mm del diámetro promedio de la lesión

RECOMENDACIONES

1. Realizar inoculaciones con diferentes concentraciones de esporas de *D. australiensis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Alternaria alternata*, *Epicoccum* sp para ver el efecto de la concentración de esporas sobre el desarrollo de los síntomas.
2. Mantener condiciones de humedad en los puntos de inoculación para que *Dipodascus australiensis*, *Alternaria alternata*, *Fusarium incarnatum-equiseti*, *Fusarium oxysporum* y *Epicoccum* spp. colonicen más rápidamente y se manifiesten de la mejor manera su sintomatología.
3. La transmisibilidad de enfermedades en plantas se da través de vectores, insectos, heridas o estomas por esto en el caso particular de la tuna, las podas deben realizarse con altos estándares de fitosanidad.
4. Realizar PCR y secuenciación de otras regiones génicas como RPB2 para hacer análisis filogenéticos concatenados (TEF-1+RPB2) para establecer las especies filogenéticas dentro de los complejos de *Fusarium*: *F. oxysporum* y *F. incarnatum-equiseti*.

GLOSARIO

AISLADO: Cepa de un organismo que es mantenido en cultivo puro, ya sea activo

o preservado, bajo condiciones de laboratorio (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 14).

AISLAMIENTO: Proceso que se sigue para la obtención de un hongo u otro organismo en cultivo puro (Ulloa et al., 2006, p. 14).

AGRESIVIDAD: La capacidad relativa de tipo cuantitativa de un patógeno de plantas (fitopatógeno) para colonizar y causar daños a las plantas (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 8).

ARTROCONIDIO/A: Tipo de conidio holoártico que se caracteriza por la conversión de un elemento hifal preexistente, de crecimiento determinado, que se desprende por desarticulación, como ocurre en *Geotrichum*. Sin. de artrospora. (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 37).

CARACTERIZACIÓN: La caracterización es un tipo de descripción cualitativa que puede recurrir a datos o a lo cuantitativo con el fin de profundizar el conocimiento sobre algo. Para cualificar ese algo previamente se deben identificar y organizar los datos; y a partir de ellos, describir (caracterizar) de una forma estructurada; y posteriormente, establecer su significado (sistematizar de forma crítica) (Sánchez, 2011, p. 189).

CLAMIDOSPORA: Espora asexual en reposo de pared gruesa o de doble pared formada a partir de células hifas (terminales o intercalares) o por transformación de células conidiales que pueden funcionar como una etapa de hibernación (D'Arcy et al., 2001, p. 1).

CONIDIO: Es una espora fúngica asexual nucleada, inmóvil que se desarrolla externamente o se libera de la célula que la formó (D'Arcy et al., 2001, p. 1).

CONIDIÓFORO: Hifa simple o ramificada, que esta morfológicamente y/o fisiológicamente diferenciada de una hifa somática para producir y portar conidios; estos generalmente se encuentran sobre células conidiógenas especializadas, las cuales se pueden disponer de diversas maneras (Ulloa et al., 2006, p. 121).

ENDÓFITO/TA: Hongo que vive dentro de tejidos vegetales sin mostrar signos externos de su presencia, como ciertos parásitos fúngicos de pastos, los cuales son tóxicos para los alimentos que se alimentan (Ulloa et al., 2006, p. 77).

EPIDERMIS: La capa superficial de las células de las hojas y otras partes de la planta (D'Arcy et al., 2001, p. 2).

ESPECIE: Es la unidad fundamental de la taxonomía biológica. Grupo de individuos estrechamente relacionados, que son capaces de interreproducirse dando lugar a una progenie fértil (Pío Font Quer, 2010, p. 405).

ESPORA: Pequeña unidad de propagación, unicelular o multicelular, asexual o sexual, móvil o inmóvil, que es capaz de originar un nuevo individuo (Ulloa et al., 2006, p. 202).

ESPORULACIÓN: Acción y efecto de esporular (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 209).

FENOTIPO: Tipo de organismo en cuanto a sus caracteres sensibles, apreciables directamente por nuestros sentidos, que son producidos por la interacción del individuo dentro del medio ambiente que se desarrolla (Pío Font Quer, 2010, p. 462).

GERMINACIÓN: Conjunto de fenómenos relativos al organismo que germina, ya sea se formen uno o varios tubos germinales a partir de una sola espora, ya sea sexual o asexual (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 265).

HIALINO: Transparente o casi; translúcido; utilizado a menudo en el sentido de incoloro (D'Arcy et al., 200, p. 2).

HIFA: Filamento tubular que representa la unidad estructural (Talo) de la mayoría de los hongos (Ulloa et al., 2006, p. 286).

INOCULACIÓN: Acto o proceso de inocular; especialmente la introducción de un patógeno en un organismo vivo (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 314).

INFECTAR: proceso por el cual un organismo entra, invade y establece una relación de patogenicidad con un organismo hospedante (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 312).

INÓCULO: Material fúngico que es transferido (micelio, esporas) que es transferido a un organismo, un sustrato o un medio de cultivo con el fin de propagarlo (Ulloa & Hanlin, 2006, p. 314).

MACROCONIDIOS: Conidio o espora de reproducción asexual, encorvado y sigmoide, que se distingue del microconidio tanto por su mayor tamaño como por ser multicelular (Ulloa et al., 2006, p. 352).

MOHO: Una fina capa de crecimiento micelial y esporas en la superficie de las partes de la planta infectadas (D'Arcy et al., 2001, p. 3).

MICELIO: Conjunto o masa de hifa que constituye el cuerpo vegetativo o talo del hongo (Ulloa et al., 2006, p. 364).

MICROCONIDOS: Conidio pequeño, generalmente unicelular. En los hongos conidiales los conidios funcionan como esporas asexuales (Ulloa et al., 2006, p. 376).

NECROSIS: Muerte de las células, en totalidad o en parte; muerte de grupos celulares más o menos extensos de un organismo (Pío Font Quer, 2010, p. 742).

PARÁSITO/TA: Organismos que deriva su alimento de otro organismo, ya sea una planta, un animal o un hongo; si el parasito invade y causa enfermedad se considera como patógeno (Ulloa et al., 2006, p. 422).

SÍNTOMA: Reacciones o alteraciones internas o externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad (Peña et al., 2015, p. 11).

SINTOMATOLOGÍA: Parte de la patología vegetal que estudia los síntomas de las enfermedades, así como la etiología estudia sus causas (Pío Font Quer, 2010, p. 1003).

SIGNO: Características de un patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante (Peña et al., 2015, p. 11).

BIBLIOGRAFÍA

ALFENAS, Acelino; & MAFIA, Reginaldo. *Métodos em Fitopatologia*. Viçosa. 2ª ed. Sao Paulo-Brasil: UFV, 2016, pp. 56-71.

ALOI, F., et al.“New insights into scabby canker of *Opuntia ficus-indica*, caused by *Neofusicoccum batangarum*”. *Phytopathologia Mediterranea* [En línea],2020, (Italia), 59(2), pp. 269-284. [Consulta: 20 febrero 2021]. ISSN 15932095. Disponible en: <https://oajournals.fupress.net/index.php/pm/article/view/11225/11617>

ALONSO, Berenice. Etiología de un síndrome fungoso y viral en cladodios de nopal verdura (*Opuntia ficus indica*) [En línea] (Trabajo de titulación).(Maestría). Colegio de postgraduados, Ciencias Agrícolas, Postgrado en Fitosanidad. Montecillo Texcoco-México. 2011.p. 195.[Consulta:2022-02-28]. Disponible en: http://www.biblio.colpos.mx:8080/jspui/bitstream/handle/10521/256/Sanchez_Borja_M_DC_Fitosanidad_2010.pdf?sequence=1.

ALVARADO JARAMILLO,V.; & SATÍN CALVA, J. “Plagas y enfermedades de la tuna *Opuntia ficus indica* L. en las condiciones ecológicas de la provincia de Loja”. *Bosques Latitud Cero* [En línea], 2017, (Ecuador). 7(1), pp. 7-11. [Consulta: 15 enero 2021]. ISSN 1390-3683. Disponible en: <https://revistas.unl.edu.ec/index.php/bosques/article/view/169/165>

BOTHA, A.; & BOTES, A.”*Geotrichum*”. *ScienceDirect* [En línea], 2014, (United States)14 (2), pp. 2-18. [Consulta: 15 marzo 2022]. ISSN 1770-3613. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/Geotrichum>

CARETTA, G., “ Patogenicità di *geotrichum* ed altri funghi artrosporei per il frutto dipomodoro”. *Rivista di Patologia Vegetale* [En línea],1961, (Italia) 1(4), pp.4-10. [Consulta: 25 marzo 2022]. ISSN 4255-5911. Disponible en: <https://sci-hub.hkvisa.net/https://www.jstor.org/stable/42555911>

CISTERNA, R., *Desafíos de la Microbiología* [En línea]. País Vasco: 2007. [Consulta: 2 marzo 2021]. Disponible en: <https://web-argitalpena.adm.ehu.es/listaproductos.asp?IdProducts=UCB00188632&titulo=Desaf%EDos%20de%20la%20Microbiolog%EDa.%20Libro%20homenaje%20al%20profesor%20Ram%F3n%20Cisterna%20Cancer>

CLÍNICA UNIVERSIDAD DE NAVARRA, *Patogenicidad* [blog]. [Consulta: 30 April 2021]. Disponible en: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/patogenicidad>.

D'ARCY, C. ; & SCHUMANN, G. “Illustrated Glossary of Plant Pathology”. The Plant Health Instructor. The American Phytopathological Society (APS) [En línea], 2001, (EE.UU.) 10(3), pp.1-6. [Consulta: 26 mayo 2021]. Disponible en: <https://www.apsnet.org/edcenter/resources/illglossary/Pages/default.aspx>

DECCO, Nicolas. *Geotrichum candidum: qué es y cómo afecta en la postcosecha.* [blog]. [Consulta: 28 de marzo 2022]. Disponible en: <https://www.deccoiberica.es/geotrichum-candidum-que-es-y-como-afecta-en-la-postcosecha/>

ESPINOZA CASTRO, Maria Fernanda. “Aislamiento de microorganismos fungosos asociados al cultivo de tuna (*Opuntia ficus indica* (L.) Mill) en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales” (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba-Ecuador. 2021. pp. 28-35.

FITOAGRO, Pesquisa. *Como atacan los hongos a las plantas*[blog]. [Consulta: 29 de marzo 2022]. Disponible en: <https://www.tecnicoagricola.es/como-atacan-los-hongos-a-las-plantas/>

FLORES FLORES, Rosalba, Identificación de hongos asociados a la mancha negra del Nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill) y su Sensibilidad al quitosano [En línea] (Trabajo de titulación). (Maestría) Instituto Politécnico Nacional - Centro de desarrollo de productos bióticos, Yautepec, Morelos, México. 2012. pp. 37-42. [Consulta: 2022-02-28]. Disponible en: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12450/Tesis%20Octubre%202012%20Rosalba%20Flores%20Flores..pdf?sequence=1&isAllowed=y>

GRYZENHOUT, M. et al., “First Report of a Serious Cladode Disease of *Opuntia ficus-indica* (Prickly Pear) in South Africa caused by *Bisifusarium lunatum*”. The American Phytopathological Society (APS) [En línea], 2017, (EE. UU.) 101(12), pp.1-6. [Consulta: 27 abril 2022]. ISSN: 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/toc/pdis/101/12>

GUEVARA, Carmen. “Plan de desarrollo y ordenamiento territorial 2015- 2019”. *Gobierno Autónomo Descentralizado Parroquial Rural Licto*, vol.5, n°2 (2014), (Ecuador) p. 273.

HIDALGO OROZCO, Maria Rocío. *Infección fúngica invasiva por *Geotrichum capitatum* caso clínico y revisión de la literatura* [blog]. [Consulta: 28 febrero 2022]. Disponible en: https://www.areasaludbadajoz.com/images/datos/docencia_e_investigacion/infeccion_fungica.pdf

HOOG, Sybren; & HERRERO, Maudy. *Dipodascus*. Países Bajos: Atlas, 2012, p. 390.

ICARDA & FAO, “*Ecología del cultivo, manejo y usos del nopal*” . Science for resilient [en línea], 2018, (Italia)77(14), pp. 119-127. [Consulta: 21 marzo 2021]. ISBN 978-92-5-130494-5. Disponible en: https://agroavances.com/img/publicacion_documentos/I7628ES.pdf

JUÁREZ BECERRA, Pedro. *Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción de métodos de control* [blog]. [Consulta: 2 marzo 2022]. Disponible en: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4\(2\)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No4-Vol-2/TSIA-4(2)-Juarez-Becerra-et-al-2010.pdf)

LAUREANO, A., et al.“ Etiology of black scab on prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) in Mexico”. *Revista Mexicana de Fitopatología* [En línea], 2021, (México), 39(2), pp. 3-8. [Consulta: 27 febrero 2022]. ISSN 0185-3309. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185->

MONROY, L., “Plagas y enfermedades del Nopal (*Opuntia ficus-indica* Berg)”. *TecnoAgro*, n° 52 (2010)(México) pp. 3-5.

MONZÓN, A. et al , “Infecciones causadas por el género *Fusarium* “. *Nopal divino*, n° 44 (2015)(México) pp.7.9.

NAKAMURA, M. et al., “Differentiation of pathogenic and nonpathogenic isolates of *Geotrichum candidum* sensu Suprapta et al. (1995) on citrus fruit based on PCR-RFLP analysis of rDNA ITS and PCR using specific primers designed in polygalacturonase genes”. *Mycoscience* [en línea], 2008, (Japón) 49(2), pp.1-4. [Consulta: 27 abril 2022]. ISSN 16182545. Disponible en: <https://www.reader/7f2e7a03-5a08-3ce2-a691-67784c31e385/3d28d01f-de2e-15b3-2c4f-2dbbc3d8ec0e>

OCHOA, Maria Judith, Tolerancia genética de los nopales, *Opuntia* sp., cultivados en Jalisco, a la enfermedad “mancha negra” producida por *Pseudocercospora opuntiae* [En línea] (Trabajo de titulación). (Doctorado)Universidad de Guadalajara, Zapopan, México. 2015. pp. 8-19. [Consulta: 27 abril 2021]. Disponible en: <http://repositorio.cucba.udg.mx:8080/xmlui/handle/123456789/5948>

PEDRIQUE, M. et al. “9 Principios de enfermedad y epidemiología y mecanismos de patogenicidad microbiana”. *Microbiología* [en línea], 2008, (México) 11(4), pp. 7-14 [Consulta: 21 marzo 2021]. Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Tema_9_Patogenicidad.pdf.

PEÑA, Rafael. *Glosario General: Fitopatología* [blog]. [Consulta: 28 mayo 2021]. Disponible en: <https://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/glosario.pdf>

PEREA, Francisco. *Patogenicidad y Virulencia.* [blog]. [Consulta: 1 mayo 2021]. Disponible en: <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num4/art35/art35-2.htm>.

PÍO FONT QUER, S. *Diccionario de Botánica.* México D.F: Balderas, 2010, pp.1-1124.

QUEZADA. S. et al ,”Etiología de la mancha negra del nopal (*Opuntia ficus-indica* Mill)en Tlalnepantla, Morelos, México”. *Redalcy.org* [en línea], 2006, (México) 40 (5), pp. 6-14. [Consulta: 15 febrero 2021]. ISSN: 1405-3195. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30240509>

RAMÍREZ, C. et al., “*Opuntia* género americano, su cultura prehispánica, innovaciones desarrolladas y la propiedad intelectual en su entorno [en línea], 2021, (México) 14(5),pp. 45-52 [Consulta: 2 marzo 2022]. ISBN 978-607-571-218-5. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/354517702_Opuntia_Aportaciones_a_su_conocimiento_y_aprovechamiento/link/613c09ec4e1df271062ada03/download

REYES, A., et al., “Notas sistemáticas y una descripción detallada de *Opuntia ficus-indica* (L.) mill. (Cactaceae)”. *Agrociencia* [en línea], 2005, (México)39(4), pp. 395-408. [Consulta: 5 abril 2021]. ISSN 14053195. Disponible en: http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/directorio/h/hernandez_hec/Opuntia_ficus.pdf.

SÁNCHEZ UPEGUI, Alexander. “Manual de redacción académica e investigativa: cómo escribir, evaluar y publicar artículos”. Cartagena [en línea], 2011, (Colombia) 25(11), pp. 180-189. [Consulta: 28 febrero 2021]. Disponible en: <https://www.ucn.edu.co/institucion/sala-prensa/documents/manual-de-redaccion-mayo-05-2011.pdf>

TAGUIAM, J. et al. “*Epicoccum* species: ubiquitous plant pathogens and effective biological control agents”. *European Journal of Plant Pathology* [en línea], 2021, (EE.UU.) 101(12), pp. 3-12. [Consulta: 25 febrero 2022].ISSN 1573-8469. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-021-02207->

ULLOA, Miguel; & HANLIN, Richard. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. Saint Paul, Minnesota-United States of America: The American Phytopathological Society, 2006, pp.1-23.

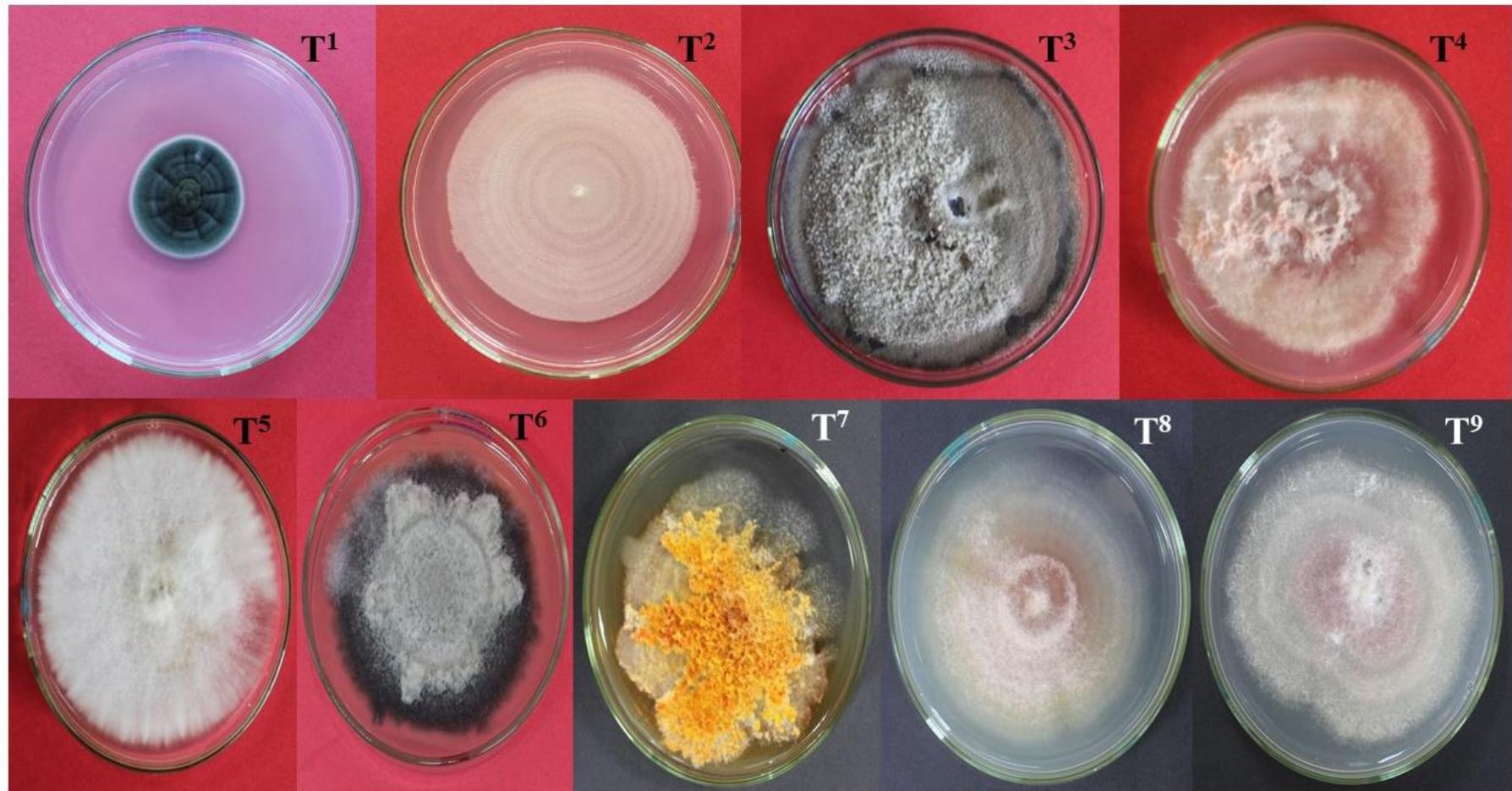


Firmado electrónicamente por:

**CRISTHIAN
FERNANDO
CASTILLO RUIZ**

ANEXOS

ANEXO A: CEPAS USADAS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

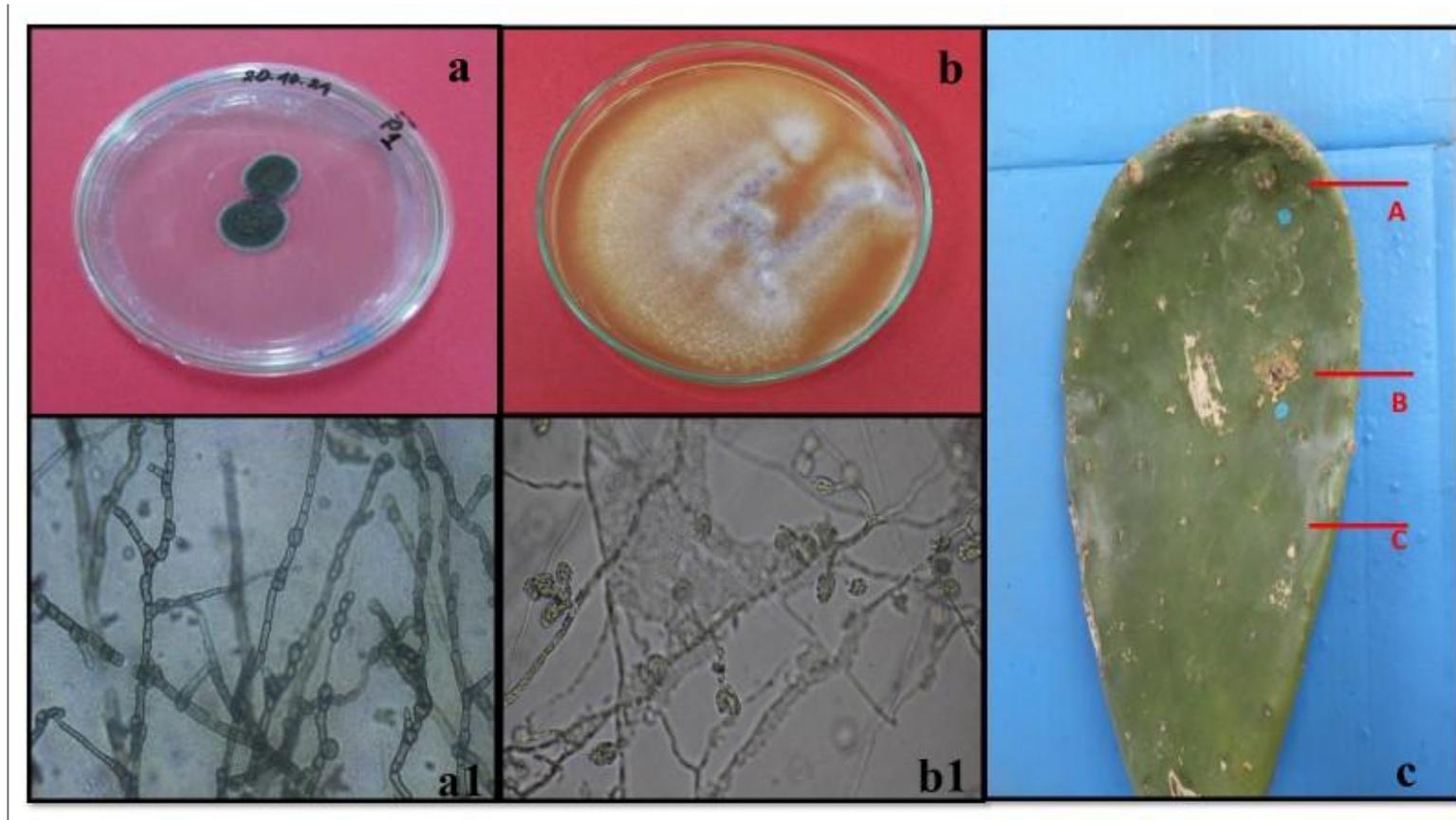


<i>Cepas de aislados inoculados</i>		<i>Códigos</i>
<i>Cladosporium</i> sp.	Tuna_chin_02_B	<i>T¹</i>
<i>Dipodascus Australiensis</i>	Tuna_Alac_024_A	<i>T²</i>
<i>Alternaria alternata</i> cepa 3	Tuna_tun_p_04_A	<i>T³</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> cepa 4	Tuna_tun_p_04_B	<i>T⁴</i>
<i>Fusarium incarnatum-equiseti</i>	Tuna_tun_p_09_B	<i>T⁵</i>
<i>Alternaria alternata</i> cepa 6	Tuna_chin_04_A	<i>T⁶</i>
<i>Epicoccum</i> sp.	Tuna_tun_p_003_B	<i>T⁷</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> cepa 8	Tuna_tun_p_06_A	<i>T⁸</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> cepa 9	CH008	<i>T⁹</i>

ANEXO B: PLANTAS DE TUNA EN LA ESTACIÓN EXPERIMENTAL TUNSHI USADAS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN.



ANEXO C: HONGO NO PATOGENICO- *Cladosporium* sp.



Cladosporium sp. (Tuna_chin_02_B)(a) Hifas septadas (a1) Hongo recuperado(b) Hifas ramificadas (b1) Cladodio A -Punción; B-Abrasión; C- Sin herida (c).



epoch

**Dirección de Bibliotecas y
Recursos del Aprendizaje**

**UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y
DOCUMENTAL**

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 28/ 06 / 2022

INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)
Nombres – Apellidos: Evelyn Cristina Chafla Chariguaman
INFORMACIÓN INSTITUCIONAL
Facultad: Recursos Naturales
Carrera: Agronomía
Título a optar: Ingeniera Agrónoma
f. responsable: Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz



Firmado electrónicamente por:
**CRISTHIAN
FERNANDO
CASTILLO RUIZ**



1282-DBRA-UTP-2022