



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE TRES AISLADOS  
DE (*Fusarium* spp.) ASOCIADOS CON EL SISTEMA RADICULAR  
EN MORA (*Rubus glaucus* Benth) EN INVERDERO”**

**Trabajo de titulación**

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar el grado académico de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR:** ALEXIS JAVIER GUERRERO LLONGO

**DIRECTOR:** Ing. FERNANDO JOSÉ RIVAS FIGUEROA PhD.

Riobamba – Ecuador

2021

© 2021, Alexis Javier Guerrero Llongo

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

Yo, Alexis Javier Guerrero Llongo, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación; El patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Riobamba, 29 de marzo del 2021



---

Alexis Javier Guerrero Llongo  
060392927-4

**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**  
**FACULTAD DE RECURSOS NATURALES CARRERA DE**  
**AGRONOMÍA**

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de titulación; Tipo: Proyecto de investigación, **“EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD DE TRES AISLADOS DE (*Fusarium spp.*) ASOCIADOS CON EL SISTEMA RADICULAR EN MORA (*Rubus glaucus Benth*) EN INVERDERO”** realizado por el señor: **ALEXIS JAVIER GUERRERO LLONGO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Trabajo de Titulación, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

FIRMA

FECHA

Ing. Norma Erazo Sandoval PhD.

**PRESIDENTE DEL TRIBUNAL**

NORMA  
SOLEDAD  
ERAZO  
SANDOVAL

Firmado digitalmente  
por NORMA SOLEDAD  
ERAZO SANDOVAL  
Fecha: 2021.05.05  
16:47:11 -05'00'

2021-03-29



Firmado electrónicamente por:  
**FERNANDO JOSE  
RIVAS FIGUEROA**

Ing. Fernando José Rivas Figueroa PhD.

**DIRECTOR DE TRABAJO DE TITULACIÓN**

JUAN  
EDUARD  
O LEON  
RUIZ

Firmado digitalmente por JUAN  
EDUARDO LEON RUIZ  
DN: cn=JUAN EDUARDO  
LEON RUIZ o=EC  
o=SECURITY DATA S.A. 1  
ou=ENTIDAD DE  
CERTIFICACION DE  
INFORMACION  
Motivo: Soy el autor de este  
documento  
Ubicación:  
Fecha: 2021-05-05 16:26:05:00

Ing. Juan Eduardo León Ruiz. PhD.

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

2021-03-29

## **DEDICATORIA**

A, Dios por guiarme durante el transcurso de camino.

A mis padres María Cleotilde Llongo Ballín y Washington Efraín Aguaguiña Quilligana; quienes son y serán la guía en mi camino y mi motor fundamental en mi vida y en mi desarrollo académico profesional.

A mi hermana Daniela Johana Aguaguiña Llongo quien es parte fundamental de mi vida para alcanzar mis metas

*Alexis Guerrero*

## TABLA DE CONTENIDO

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

### CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL .....	4
1.1. Generalidades agronómicas del cultivo de mora.....	4
1.1.1. Origen y distribución.....	4
1.1.2. Clasificación taxonómica.....	4
1.1.3. Fenología.....	4
1.1.4. Características botánicas del cultivo .....	5
1.1.4.1. Raíz.....	5
1.1.4.2. Tallo.....	5
1.1.4.3. Hojas.....	5
1.1.4.4. Flores y frutos .....	5
1.1.5. Manejo agronómico del cultivo .....	6
1.1.5.1. Riego.....	6
1.1.5.2. Podas.....	6
1.1.6. Principales enfermedades del cultivo de mora .....	6
1.2. Enfermedades en el cultivo de mora ocasionados al sistema radicular.....	8
1.2.1. Marchitamiento vascular .....	8

<b>1.3.</b>	<b>Características culturales y morfológicas de géneros de <i>Fusarium</i> sp. asociadas al sistema radicular.....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.</b>	<b><i>Patogenicidad</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.1.</b>	<b><i>Patogenicidad</i> .....</b>	<b>9</b>
<b>1.4.2.</b>	<b><i>Evaluación de la patogenicidad de <i>Fusarium</i> spp en modelos vegetales</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>1.4.3.</b>	<b><i>Aplicación de los postulados de Koch</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.</b>	<b><i>Métodos de aislamiento</i> .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.1.</b>	<b><i>Aislamiento directo</i>.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5.2.</b>	<b><i>Aislamiento indirecto</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>1.6.</b>	<b><i>Identificación molecular</i> .....</b>	<b>11</b>

## **CAPÍTULO II**

<b>2.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.</b>	<b>Materiales y equipos .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.1.</b>	<b><i>Material Biológico</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.2.</b>	<b><i>Medios de cultivo</i> .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1.3.</b>	<b><i>Soluciones</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.4.</b>	<b><i>Materiales de laboratorio</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.5.</b>	<b><i>Equipos de laboratorio</i> .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1.6.</b>	<b><i>Materiales de campo y equipos de campo</i>.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2.</b>	<b>Metodología .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.</b>	<b><i>Aislamiento de hongos asociados al marchitamiento en el cultivo de mora en campo</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.1.</b>	<b><i>Recolección de plantas sintomáticas</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.2.</b>	<b><i>Procesamiento de muestras</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.3.</b>	<b><i>Aislamiento directo de tejidos con presencia o ausencia de marchitamiento</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.4.</b>	<b><i>Aislamiento de colonias fúngicas</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.5.</b>	<b><i>Obtención de cultivos monospórico</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2.</b>	<b><i>Caracterización microbiología de los aislados obtenidos</i> .....</b>	<b>17</b>

2.2.2.2. <i>Características morfológicas</i> .....	17
<b>2.2.3. <i>Identificación molecular</i></b> .....	<b>18</b>
2.2.3.1. <i>Extracción, amplificación y secuenciación de DNA</i> .....	18
2.2.3.2. <i>Análisis Filogenéticos</i> .....	19
<b>2.2.4. <i>Caracterización de la patogenicidad de los hongos filamentosos obtenidos</i></b> .....	<b>20</b>
2.2.4.1. <i>Establecimiento de plantas de mora</i> .....	20
2.2.4.2. <i>Condiciones durante el ensayo</i> .....	20
<b>2.2.5. <i>Diseño del ensayo</i></b> .....	<b>20</b>
2.2.5.1. <i>Factores de estudio</i> .....	20
2.2.5.2. <i>Tratamientos</i> .....	21
<b>2.2.7. <i>Métodos de inoculación</i></b> .....	<b>22</b>
2.2.7.1. <i>Método de inoculación mediante corte al sistema radicular más inmersión de raíces en suspensión de inóculo</i> .....	22
2.2.7.2. <i>Método de inoculación mediante punción al sustrato</i> .....	22
<b>2.2.8. <i>Evaluación de cepas inoculadas en campo</i></b> .....	<b>23</b>
2.2.8.1. <i>Evaluación de síntomas externos</i> .....	23
2.2.8.2. <i>Evaluación de síntomas internos</i> .....	23
<b>2.2.9. <i>Aislamiento de agentes fúngicos inoculados</i></b> .....	<b>24</b>
2.2.9.1. <i>Procesamiento de plantas</i> .....	24
2.2.9.2. <i>Registro de síntomas</i> .....	24
2.2.9.3. <i>Procesamiento estadístico</i> .....	24

### **CAPÍTULO III**

<b>3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1. Aislamiento de hongos asociados al marchitamiento del cultivo de mora en campo</b> .....	<b>25</b>
<b>3.1.1. <i>Recolección de plantas sintomáticas</i></b> .....	<b>25</b>
<b>3.2. Caracterización cultural y morfológica de los agentes fúngicos obtenidos en el cultivo de mora</b> .....	<b>26</b>



<b>3.2.1. Velocidad de crecimiento .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.2. Características culturales y morfológicas .....</b>	<b>26</b>
3.2.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	26
3.2.2.2. <i>Fusarium redolens</i> .....	28
<b>3.2.3. Identificación molecular .....</b>	<b>31</b>
3.2.4.2. <i>Evaluación de los síntomas internos y externos causados por Fusarium oxysporum</i> ...	36
3.2.4.3. <i>Evaluación de los síntomas internos y externos causados por Fusarium redolens</i> .....	38
3.2.4.4. <i>Evaluación de los síntomas internos y externos causados por Fusarium solani</i> .....	39
<b>3.2.5 Re-aislamiento de especies fúngicas inoculadas .....</b>	<b>43</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>GLOSARIO</b>	
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	
<b>ANEXOS</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1-1:</b> Clasificación taxonómica de la mora.....	4
<b>Tabla 2-1:</b> Enfermedades causadas por organismos fungosos (hongos y oomycetes).....	6
<b>Tabla 3-1:</b> Organismos fungosos asociados al sistema radicular en mora.....	8
<b>Tabla 1-2:</b> Tratamientos establecidos para las pruebas de patogenicidad en mora.....	21
<b>Tabla 2-2:</b> Escala cuantitativa de necrosis a nivel de la corona establecida por (Sánchez et al., 2019).....	24
<b>Tabla 1-3:</b> Identificación inicial de las secuencias ITS y TEF1- de hongos filamentosos en estudio mediante BLAST en el GenBank.....	32

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1-3:</b> (a-b) Marchitez en plantas de mora en campo, (c) necrosis del sistema radicular, (d) Necrosis en la corona de tonalidad marrón en el centro. ....	25
<b>Figura 2-3:</b> a) color violáceo pálido del reverso de la colonia, b) color blanco del reverso de la colonia. ....	27
<b>Figura 3-3:</b> a-) microconidios 400x, b-) macroconidios 400x, c-) monofiálides 400x, d-) falsas cabezas 400x, e-) clamidosporas 400x. ....	28
<b>Figura 4-3:</b> a) color crema pálido del reverso de la colonia, b) color blanco - crema del reverso de la colonia.....	28
<b>Figura 5-3:</b> a-) microconidios 400x, b-) macroconidios 100x, c-) monofiálides 400x, d-) falsas cabezas 400x, e-) clamidosporas 400x. ....	29
<b>Figura 6-3:</b> a) color crema pálido del reverso de la colonia, b) color blanco - crema del reverso de la colonia.....	30
<b>Figura 7-3:</b> a-) microconidios 400x, b-) macroconidios 40x, c-) monofiálides 400x, d-) falsas cabezas 400x, e-) clamidosporas 400x. ....	31
<b>Figura 8-3:</b> Árbol filogenético inferido a partir del análisis Neighbor - Joining (NJ) del alineamiento de las secuencias EF1 de <i>Fusarium</i> spp.....	32
<b>Figura 9-3:</b> Árbol filogenético inferido a partir del análisis Neighbor - Joining (NJ) del alineamiento de las secuencias EF1 de <i>Fusarium</i> spp.....	33
<b>Figura 10-3:</b> Árbol filogenético inferido a partir del análisis Neighbor - Joining (NJ) del alineamiento de las secuencias ITS de <i>Fusarium</i> spp. ....	34
<b>Figura 11-3:</b> a-) amarillamiento del área foliar, b-) necrosis de ápice del foliolo, c-) necrosis de del margen de los foliolos.....	35
<b>Figura 12-3:</b> a-) necrosis vascular vista mediante un corte longitudinal, b-) necrosis vascular vista mediante un corte transversal, c-) corte longitudinal de la corona, planta control, d) corte longitudinal de la corona, planta control .....	35
<b>Figura 13-3:</b> a, b-) anverso y reverso de <i>F. oxysporum</i> crecidas en PDA, c, d-) anverso y reverso de <i>F. solani</i> crecidas en PDA, e, f-) anverso y reverso de <i>F. redolens</i> crecidas en PDA.....	43

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1-3:</b> Velocidad de crecimiento micelial radial (mm/día) evaluado cada 24 horas durante siete días de <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y <i>F. redolens</i> cultivadas en medio de cultivo PDA a 28°C.....	26
<b>Gráfico 2-3:</b> Evaluación de síntomas Foliare causado por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	36
<b>Gráfico 3-3:</b> Evaluación de necrosis en la corona causado por <i>Fusarium oxysporum</i> .....	37
<b>Gráfico 4-3:</b> Evaluación de síntomas foliares causado por <i>Fusarium redolens</i> .....	38
<b>Gráfico 5-3:</b> Evaluación de necrosis en la corona causado por <i>Fusarium redolens</i> .....	39
<b>Gráfico 6-3:</b> Evaluación de foliares causado por <i>Fusarium solani</i> .....	40
<b>Gráfico 7-3:</b> Evaluación de necrosis en la corona causado por <i>Fusarium solani</i> .....	41
<b>Gráfico 8-3:</b> Curva del progreso de la enfermedad según el método de inoculación de los agentes fúngicos obtenidos ( <i>F. oxysporum</i> , <i>F. solani</i> y <i>F. redolens</i> .) de plantas de mora en invernadero .....	42

## **ÍNDICE DE ANEXOS**

**ANEXO A:** PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ADN IDGEN

**ANEXO B:** VELOCIDAD DE CRECIMIENTO MICELIAL RADIAL (mm/hora) DE *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. solani* EN MEDIO DE CULTIVO PDA A 28°C

**ANEXO C:** INSTALACIÓN DE PLANTAS EN INVERNADERO

**ANEXO D:** PREPARACIÓN DEL INOCULO

**ANEXO E:** INOCULACIÓN DE AISLADOS FÚNGICOS

**ANEXO F:** PLANTAS DE MORA INOCULADAS

## RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar la patogenicidad de tres aislados de *Fusarium* spp. asociados al sistema radicular en el cultivo de mora. Para ello, se procedió a muestrear plantas de mora ubicadas en la parroquia San Luis, provincia de Chimborazo con síntomas asociados al marchitamiento, necrosis de la corona y del sistema radicular sintomatología presente en diferentes zonas productoras del cultivo. A partir del tejido afectado en la corona de plantas colectadas se obtuvo una colección de aislados fúngicos y se realizó la identificación mediante características morfológicas, culturales y molecular. El análisis molecular se realizó mediante la técnica de amplificación de DNA total, los fragmentos de las regiones ITS rDNA y 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ) fueron amplificadas y secuenciadas, posteriormente se realizó árboles filogenéticos individuales, para ellos se utilizó secuencias adicionales del GenBank de *Fusarium* spp. La evaluación de la patogenicidad se realizó en invernadero con plantas de 7 meses de edad y la inoculación se realizó con los tres aislados identificados con una concentración de  $1 \times 10^6$  conidio  $\cdot ml^{-1}$  mediante dos métodos (inoculación al sustrato de prueba e inmersión más daño al sistema radicular). Mediante las características morfológicas y culturales se identificó al género de *Fusarium* spp y mediante los análisis filogenéticos se identificó a *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. solani*. Las plantas inoculadas presentaron sintomatologías similares con cada especie de *Fusarium*, causando un marchitamiento foliar y necrosis del tejido vascular a nivel de la corona, entre los métodos de inoculación utilizados, no se presentaron diferencia significativa en el progreso de la enfermedad. Se concluye que las especies de *Fusarium* inoculadas son causantes del marchitamiento y necrosis radicular, se reporta por primera vez la actividad patógena de *F. solani* y *F. redolens* en el Ecuador en el cultivo de mora. Se recomienda mediante este estudio implementar medidas de manejo de la enfermedad.

**Palabras clave:** <MARCHITAMIENTO FOLIAR> <NECROSIS DE LA CORONA> <AISLADOS FÚNGICOS> <FUSARIUM> <PATOGENICIDAD>



Firmado electrónicamente por:  
**HOLGER GERMAN**  
**RAMOS UVIDIA**

1061-DBRA-UPT-2021

2021-04-22

## ABSTRACT

This investigation aims to evaluate the pathogenicity of three isolates of *Fusarium* spp. associated with the root system of blackberry. For this purpose, blackberry plants located in San Luis parish, Chimborazo province with symptoms associated with wilting, crown necrosis and root system necrosis, symptoms present in different areas of the crop, were sampled. A collection of fungal isolates was obtained from the affected tissue in the crown of the collected plants and identification was carried out by means of morphological, cultural and molecular characteristics. Molecular analysis was performed by total DNA amplification technique, the fragments of the ITS rDNA and 1- (TEF1- ) regions were amplified and sequenced, and then individual phylogenetic trees were carried out, using additional sequences from the GenBank of *Fusarium* spp. The pathogenicity evaluation was carried out in greenhouses with 7-month-old plants and inoculation was performed with the three ones isolates identified with a concentration of  $1 \times 10^6$  conidio\* $ml^{-1}$  using two methods (inoculation to the test substrate and immersion plus damage to the root system). Morphological and cultural characteristics identified *Fusarium* spp. gendre was identified and by means phylogenetic analyses *F. oxysporum*, *F. redolens* and *F. solani* were identified. Inoculated plants showed similar symptomatologies with each *Fusarium* species, causing leaf wilting and necrosis of the vascular tissue at the crown level. There was no significant difference in the progress of the disease among the inoculation methods,. It is concluded that *Fusarium* inoculated species cause wilting and root necrosis. The pathogenic activity of *F. solani* and *F. redolens* is reported for the first time in Ecuador in the blackberry crop. It is recommended to implement disease management measures by means this study

**Keywords:** <ROOT WILT> <CROWN NECROSIS> <FUNGAL ISOLATES>  
<FUSARIUM> <PATHOGENICITY>

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de mora tiene un gran potencial a nivel nacional con valores de exportación crecientes desde el año 2015 con 44 toneladas a 68 toneladas en el 2017; no obstante, en el año 2018 se registró una disminución del 11% equivalente a 60 toneladas. Las provincias ecuatorianas con los mayores niveles de producción en el 2018 fueron: Tungurahua con el 48%, Cotopaxi con el 27% y Bolívar con el 9% y Chimborazo registró el mayor rendimiento con 10.81 t/ha a diferencia de las demás provincias. (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 2019).

A nivel nacional se reportan una superficie aproximada de 5000 ha de mora cultivada, que involucran de manera directa a 15000 pequeños y medianos productores de la sierra los cuales obtienen rendimientos promedios a nivel nacional de 5t ha<sup>-1</sup> (Ayala et al., 2016). La provincia de Chimborazo cuenta con un área de producción de 525,88 ha destinadas al cultivo de mora cuya superficie alcanzo en el 2012 un volumen de producción de 468,22TM, los cantones con mayor superficie cultivada son Pallatanga con 450,43 ha, Penipe con 28,66 y Riobamba con 22,73 ha (Gobierno Autónomo Descentralizado de la Provincia de Chimborazo, 2015). En los últimos años, la provincia de Chimborazo ha incrementado el área del cultivo de mora, debido a su rentabilidad y facilidad de manejo.

En el cantón Riobamba, Provincia de Chimborazo, el manejo inadecuado del cultivo de mora y el desconocimiento de la sintomatología de diferentes agentes fúngicos asociados principalmente al sistema radicular causantes del marchitamiento del área foliar y necrosis del sistema radicular, entre los cuales se encuentran hongos como: *Dactylonectria torresensis*, *Ilyonectria robusta*, *Ilyonectria venezuelensis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, *Lasiodiplodia parva*, *Lasiodiplodia theobromae* y los oomycetes *Phytophthora megasperma* y *Phytophthora bilorbang* (Sánchez et al., 2019; Proaño, 2014; Gordon et al., 2016; Pastrana et al., 2017; Contreras et al., 2019; Aghighi et al., 2012; Ducan y Kennedy, 2016), repercuten en el desconocimiento sobre la etiología causante de dicha enfermedad por lo que los agricultores obtienen bajos rendimientos y no pueden diseñar prácticas de manejo fitosanitario adecuados.

Por tal motivo en este trabajo investigativo se pretende evaluar la sintomatología, incidencia y severidad en el cultivo de mora mediante la inoculación de tres aislados de *Fusarium* spp asociados al sistema radicular, mediante pruebas de patogenicidad para demostrar si los aislados obtenidos de plantas con presencia de síntomas de marchitamiento tienen capacidad patogénica.



## **IMPORTANCIA**

En los últimos años la demanda del cultivo de mora aumentado exponencialmente debido a su facilidad de procesamiento ya que se puede consumirla como fruta de mesa o se puede utilizar como materia prima en la industria y también en la facilidad de manejo de las diferentes prácticas culturales que se realiza, por esta razón tanto personas jóvenes y adultas han implementado el cultivo en sus parcelas disminuyendo la migración a las ciudades. Por este motivo la importancia del cultivo de mora en la provincia de Chimborazo radica principalmente en el número de empleos que genera de manera directa e indirecta, siendo una alternativa para los pequeños agricultores.

Históricamente la identificación de especies en el género *Fusarium* han sido asociadas a la necrosis del sistema radicular y marchitamiento del área foliar en diferentes cultivos alrededor del mundo provocando la muerte total de la planta. A pesar de la importancia de la enfermedad en diferentes plantas aún se desconoce la etiología del marchitamiento en el cultivo de mora no solo en el cantón de Riobamba si no a nivel nacional, porque no se han realizado trabajos de aislamiento, caracterización morfológica, cultural, molecular y patogénica de los patógenos asociados a la sintomatología del marchitamiento.

## **JUSTIFICACIÓN**

En el Cantón Riobamba existen parroquias rurales, las mismas que se caracterizan por la cultura y producción de una alta gama de productos entre ellos la mora, en los últimos años el cultivo está siendo afectado por diferentes enfermedades, de entre las principales se destaca el marchitamiento del área foliar por su agresividad y difícil control debido a que se asocia principalmente al colapso del sistema radicular causando pérdidas económicas significativas a los agricultores. La identificación de los agentes etiológicos causantes de esta enfermedad constituye el primer paso en el reconocimiento de medidas de control para el marchitamiento del área foliar y necrosis radicular. Por tal motivo los resultados obtenidos en esta investigación será un aporte para futuras investigaciones relacionadas con enfermedades causadas por patógenos del suelo como especies del género *Fusarium*.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar la patogenicidad de tres aislados de *Fusarium* spp. asociados con el sistema radicular en mora (*Rubus glaucus* Benth) en invernadero.

### **Específicos**

- Aislar los patógenos causantes de marchitamiento de fragmentos de raíces del cultivo de mora.
- Caracterizar microbiológicamente los diferentes aislados obtenidos a partir de fragmentos de raíces de mora.
- Evaluar la patogenicidad de especies de *Fusarium* identificadas en el cultivo de mora.

# CAPÍTULO I

## 1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

### 1.1. Generalidades agronómicas del cultivo de mora

#### 1.1.1. Origen y distribución

Según (Chancusig, [sin fecha]) el cultivo de mora tuvo su origen en Centro América, distribuyéndose en todo el trópico americano; aunque se han reportado especies similares en África.

#### 1.1.2. Clasificación taxonómica

Según (Ballesteros et al., 2004) la planta de mora tiene la siguiente clasificación taxonómica:

**Tabla 1-1:** Clasificación taxonómica de la mora

<b>Reino:</b>	<i>Plantae</i>
<b>Sub reino:</b>	Tracheobionta
<b>Super división:</b>	Spermatophyta
<b>Filo:</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Clase:</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Sub clase:</b>	Rosidae
<b>Orden:</b>	<i>Rosales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Rosaceae</i>
<b>Genero:</b>	<i>Rubus</i>

Realizado por: Guerrero, A., 2020

#### 1.1.3. Fenología

Según (Ayala et al., 2016) es una planta de vegetación perenne, cuyo hábito de crecimiento es trepador, con tallos semirectos de longitud variable, conformada por varios tallos espinosos que pueden crecer a veces hasta 3 metros de largo, redondos, espinoso, ramificados, la planta emite constantemente brotes en la base.

#### ***1.1.4. Características botánicas del cultivo***

##### ***1.1.4.1. Raíz***

La corona de la planta de mora origina gran número de tallos, también las raíces superficiales que proporcionan anclaje a la planta creciendo a una profundidad de entre 30-50 cm, dependiendo de: tipo de suelo, disponibilidad de nutrientes, humedad disponible, temperatura del suelo. Las raíces o tallos subterráneos presentan varias yemas que favorecen la reproducción asexual o vegetativa (Delgado, 2012).

##### ***1.1.4.2. Tallo***

Todos los tipos de mora poseen una espina en forma de anzuelo, un tallo herbáceo, recto y se ramifica en secundarios y terciarios (Leiva, 2011). Los tallos son bianuales crecen durante el primer año, durante el segundo florecen y producen. Por lo general las moras criollas se comportan erectas durante la etapa de crecimiento, conforme crecen se arquean y llegan al suelo, donde desarrollan raíces en los entrenudos y ápices o puntas. El grosor varía según el tipo de planta además los tallos primarios o principales desarrollan tallos secundarios y estos a su vez los terciarios, donde se concentra la mayor parte de las inflorescencias (Delgado, 2012).

##### ***1.1.4.3. Hojas***

Tanto las especies de mora criolla como las híbridas poseen hojas trifoliadas o penta-foliadas con el margen aserrado, su ubicación en los tallos es alterna, parte de esto las hojas también tienen espinas en el envés, a lo largo de la vena central, el color y tamaño varía de acuerdo con el tipo de mora. (Delgado, 2012)

##### ***1.1.4.4. Flores y frutos***

Las inflorescencias se presentan en racimos terminales, aunque en ocasiones se ubican en las axilas de las hojas. (Delgado, 2012). Los frutos son de forma globular u ovoide, el cual consiste en drupas carnosas y jugosas, todas muy juntas sobre el receptáculo. Son de color amarillo y de forma general son más dulces que la mora común (Ballesteros et al., 2004)

### **1.1.5. Manejo agronómico del cultivo**

#### **1.1.5.1. Riego**

Según (Bautista 1977; citado en Cárdenas, 2013) el cultivo de mora requiere para su crecimiento óptimo y de producción aproximadamente 3 cm de agua por semana. El aumento en rendimiento resulta de un mayor tamaño de la fruta, así como un mayor número y diámetro de las cañas. El tiempo crítico para regar es durante la floración y el crecimiento de la fruta.

#### **1.1.5.2. Podas**

Según (Bejarano 1992; citado en Leiva, 2011), manifiesta que las podas son cortes de cualquier tipo de ramas realizada para estimular el desarrollo de nuevas ramas fructíferas en la planta, facilitar las prácticas culturales y reducir la incidencia de enfermedades. Al favorecer la aireación en el cultivo, facilita la cosecha, facilita las labores de deshierba, fertilización, facilita la aplicación de productos para el control fitosanitario, facilita el desplazamiento de las personas entre el cultivo.

### **1.1.6. Principales enfermedades del cultivo de mora**

La alteración de las condiciones climáticas genera grandes retos para los productores y comercializadores de mora debido al incremento de los problemas fitosanitarios, en particular los relacionados con la incidencia y severidad de enfermedades atacando diferentes órganos de la planta y disminuyendo el rendimiento de las cosechas. La fuerte ola invernal durante los años 2010 y 2011 asociada al fenómeno de La Niña incrementaron la humedad de los terrenos y aumentaron la humedad relativa en los cultivos de mora, favoreciendo la incidencia y severidad de varias enfermedades (Leiva, 2011).

**Tabla 2-1:** Enfermedades causadas por organismos fúngicos (hongos y oomicetes)

<b>Enfermedades de la raíz y la corona causadas por Hongos y Oomicetos</b>	
<b>Organismo fúngico</b>	<b>Enfermedad</b>
<i>Phytophthora megasperma</i>	Putridión de la raíz por <i>Phytophthora</i>
<i>Phytophthora rubi</i>	
<i>Armillaria mellea</i>	
<i>Phytophthora cambitor</i>	
<i>Phytophthora drechsleri</i>	

<i>Phytophthora cactorum</i>	
<i>Verticillium dahliae</i> <i>Verticillium albo-atrum</i>	Marchitamiento por verticillium
<i>Armillaria mellea</i> <i>Armillaria solipes</i> <i>Armillaria tabescens</i>	Pudrición de la raíz por armillaria
<i>Vararia sp</i>	Pudrición de la raíz blanca
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchites por fusarium
<b>Enfermedades foliares y de la caña causadas por hongos y oomycetes</b>	
<i>Elsinoë necátor</i> <i>Colletotrichum gloeosporioide</i> <i>Glomerella cingulata</i>	Antracnosis
<i>Paraconiothyrium fuckelii</i>	Tizón de la caña
<i>Xenodidymella applanata</i>	Tizón del espolón
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	Botritis de la caña
<i>Septocya ruborum</i>	Mancha morada
<i>Seimatosporium lichenicola</i>	Muerte regresiva de Ascospora
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Cancro del bastón
<i>Cercospora rubi</i>	Roseta de la mora
<i>Peronospora rubi</i>	Mildiú vellosa
<i>Podospaera aphanis</i>	Moho polvoriento
<i>Sphaerulina rubi</i>	Mancha de la hoja
<i>Sphaerulina westendorpii</i>	Septoria de la mancha de hoja
<i>Thelonectria rubi</i>	Cancros de la frambuesa
<i>Chondrostereum purpureum</i>	Hoja de plata
<i>Septoria Rubi</i>	Manchas foliares
<i>Gerwasia cundinamarcensis</i>	Roya
<i>Conyothirium fuckelii</i>	Cáncer por heridas
<b>Enfermedades de frutas y flores causadas por hongos</b>	
<i>Botryotinia fuckeliana</i> <i>Botryis cinerea</i>	Pudrición de la fruta
<i>Rhizopus stolonife</i>	Pudrición blanda
<i>Hapalosphaeria deformans</i>	Tizón del estambre
<b>Enfermedades de la roya</b>	
<i>Arthuriomyces peckianus</i> <i>Gymnoconia nitens</i>	Óxido naranja
<i>Kuehneola uredinis</i>	Óxido de caña y hojas
<i>Phragmidium rubi- idaei</i>	Óxido amarillo
<i>Pucciniastrum americanum</i>	Roya tardía
<i>Phragmidium violaceum</i>	Óxido de la mora

Fuente: (Martin et al., 2017; Forero, 2001)

Realizado por: Guerrero, A., 2020

## 1.2. Enfermedades en el cultivo de mora ocasionados al sistema radicular

### 1.2.1. Marchitamiento vascular

Los hongos fitopatógenos que están relacionados al sistema radicular es ocasionado habitualmente por la infección de algunos hongos fitopatógenos que viven en el suelo, como algunas especies de los géneros *Verticillium* sp, *Fusarium* sp y *Rosellinia* sp, enfermedades que se manifiestan por la presencia de amarillamiento del área foliar y marchitez de las plantas (Montoya et al., 1997; Leiva, 2011; Forero, 2001). Aunque puede haber ligeras diferencias en los síntomas causados por cada patógeno, en general causan daño en las raíces lo que lleva a que las hojas se marchitan, se secan y se desprendan, finalmente toda la planta se marchita y muere.

**Tabla 3-1:** Organismos fúngicos asociados al sistema radicular en mora

Organismos fúngicos	Lugar de reporte	Síntomas observados	Referencia
<i>Dactylonectria torresensis</i> , <i>Ilynectria robusta</i> <i>Ilynectria venezuelensis</i>	Ecuador	Es conocida como la enfermedad del pie negro presentado lesiones necróticas en la corteza de las raíces y corona. Se identifica por la reducción del vigor, necrosis en el tejido vascular, clorosis, pudrición del cuello y raíces y ausencia de brotes en la planta	(Sánchez et al., 2019)
<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Cylindrocarpon destructans</i> <i>Verticillium albo-atrum</i> <i>Verticillium dahliae</i>	Ecuador (Bolívar-Tungurahua)	Presenta síntomas de marchitez ascendente hasta llegar a la muerte total de la planta	(Proaño, 2014; Martínez, 2014)
<i>Phytophthora megasperma</i>	Escocia	Produce un ahogamiento de la raíz, disminuyendo la cantidad de raíces y a nivel foliar produce un marchitamiento general	(Ducan y Kennedy, 1989)
<i>Fusarium oxysporum</i>	California	Se presenta un marchitamiento foliar y las plantas sintomáticas poseen tallos descoloridos	(Gordon et al., 2016)
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>mori</i>	California	Síntomas de marchitamiento y amarillamiento del área foliar	(Pastrana et al., 2017)
<i>Fusarium oxysporum</i>	México	Síntomas de marchitamiento y amarillamiento del área foliar y los tallos muestran una franja de color marrón oscuro cerca del nivel del suelo	(Hernández et al., 2020; Meraz et al., 2018)

<i>Dactylonectria torresensis</i>	Alemania	Los síntomas a nivel aéreo es la presencia de una clorosis ascendente y desarrolla una pudrición negra de la raíz	(Weber & Entrop, 2017)
<i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>Lasiodiplodia parva</i>	México	Presentan síntomas de clorosis, así como áreas con necrosis de hojas y tallos	(Contreras et al., 2019)
<i>Phytophthora bilorbang</i>	Australia	Sus síntomas se asocian al declive del cultivo de mora el cual produce un ahogamiento de la raíz	(Aghighi et al., 2012)

Realizado por: Guerrero, A., 2020

### 1.3. Características culturales y morfológicas de géneros de *Fusarium* sp. asociadas al sistema radicular.

Para la identificación de los complejos de *Fusarium*, se debe partir de cultivos obtenidos de una sola espora (cultivo monospórico) (Leslie & Summerell, 2006; Balmas et al., 2016). Además, los mismos autores mencionan los caracteres que se deben tomar en cuenta para la identificación de la especie:

- a. Forma de los macroconidios
- b. Número de septos de macroconidios
- c. Número de septos de microconidios
- d. Presencia o ausencia de microconidios
- e. Forma y modo de formación de microconidios
- f. Naturaleza de los conidióforos
- g. Tamaño de las fiálides
- h. Presencia de clamidosporas
- i. Diámetros de colonias a 25 °C y 30 °C. después de 72 h con PDA
- j. Color de la placa (parte ventral)

### 1.4. Patogenicidad

#### 1.4.1. Patogenicidad

La patogenicidad de los microorganismos se define como su capacidad para producir enfermedad en huéspedes susceptibles por tanto va a depender del tipo de cepa y adaptación de los patógenos en la planta, y puede ser estimada por la rapidez del patógeno en dañar al hospedante (Pariaud et al., 2009).



#### ***1.4.2. Evaluación de la patogenicidad de Fusarium spp en modelos vegetales***

El género *Fusarium* es ampliamente conocido por su capacidad fitopatógena, típicamente asociada al marchitamiento vascular. Las pruebas de patogenicidad en plantas no mostraron todos los síntomas asociados al marchitamiento vascular en los tres modelos vegetales, pero la colonización y la necrosis de los haces vasculares observada en todos los casos, independientemente de la especie de *Fusarium* y el origen del aislamiento, demostrando el potencial infeccioso de *Fusarium* spp. en las diferentes especies de plantas (Forero et al., 2019).

#### ***1.4.3. Aplicación de los postulados de Koch***

Según (Agrios, 2005) los postulados establecidos por Robert Koch para validar la existencia de una enfermedad son:

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se "examinen"
- 2.. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parásito no obligado) o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parásito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca.
3. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
4. El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

### **1.5. Métodos de aislamiento**

Según (Alfenas y Mafia, 2016) las técnicas básicas de aislamiento consiste en obtener colonias fúngicas de tejido enfermo del hospedador, dependiendo de la naturaleza del órgano enfermo. Los métodos de aislamiento básicos son:

#### ***1.5.1. Aislamiento directo***

Este método consiste en transferir diferentes estructuras del patógeno como esporas, hifas, rizomorfos, esclerocios directamente del órgano afectado al ambiente de cultivo. Cuando se

trabaja con esporas presentes en muestras, es recomendable estimular la esporulación del hongo mediante la realización de una cámara húmeda con una duración de uno a tres días a una temperatura de 25°C, para ello se recomienda utilizar el uso de placas de Petri o bandejas envueltas en una bolsa de plástico transparente con al menos una tapa translúcida para poder evidenciar el crecimiento micelial. Las bandejas o placas Petri deben contener papel filtro humedecido para obtener un micro clima óptimo para el crecimiento micelial Otro método es el uso de medio de Agar Agua que se pueda utilizar como medio de soporte para la germinación de esporas ya que también funciona como una cámara húmeda (Alfenas & Mafia, 2016). De esta forma se logran buenos resultados con aislamiento directo de:

- Producción de conidióforos y conidios libres en hifomicetos.
- Producción de picnidios y acérvulos en coelomicetes con cirros conidiales en ápices de estas estructuras.
- Producción de peritecios en ascomicetes, teniendo en algunos casos la acumulación de ascosporas exudadas en los ápices de estas estructuras (Alfenas & Mafia, 2016)

### ***1.5.2. Aislamiento indirecto***

Este método consiste en transferir porciones infectadas de tejido o muestra de suelo, semillas infestadas al medio de cultivo. Los métodos varían de acuerdo con el tipo de órgano o tejido afectado sea leñoso, no leñoso, carnoso, no carnoso o sustrato del que se recupere el organismo. En muchos casos, el patógeno está dentro de los tejidos de las plantas sin producir estructuras en la superficie del órgano lesionado. En estas situaciones, la superficie del tejido muerto es invadida por otros organismos saprófitos, lo que dificulta la obtención del patógeno en cultivo puro, para evitar la incidencia de contaminantes, se debe hacer el aislamiento, siempre que sea posible del material recién infectado, donde el patógeno está creciendo activamente en los tejidos y hay menos saprófitos invasores. También se utilizan métodos de aislamientos especiales, según la naturaleza del órgano infectado, para reducir o eliminar por completo los contaminantes de la superficie (Alfenas & Mafia, 2016)

## **1.6. Identificación molecular**

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) ha sido la principal herramienta diagnóstica que ha aprovechado las bondades de la biología molecular al

punto de alcanzar gran versatilidad como técnica de análisis. Sus aplicaciones son variables e ilimitadas, ejemplo de ello, es la posibilidad de realizar estudios de expresión genética, secuenciación directa de secuencias amplificadas, detección de mutaciones, seguimiento de la efectividad de tratamiento de enfermedades, diagnósticos de enfermedades genéticas e infecciosas y en ciencia forense en la identificación de restos biológicos, determinación de paternidad y pruebas periciales en criminalística. (Merchán et al., 2017)

Existen otras técnicas moleculares que han aportado significativamente a la investigación como los denominados marcadores RAPD (Polimorfismo amplificado aleatorio ADN), quienes con base en la RCP, gracias a ellos es posible la detección de los polimorfismos existentes en la secuencia de ADN a estudiar y los RFLP (Polimorfismo de Longitud de Fragmento de Restricción), los cuales expresan las diferencias entre individuos en secuencias específicas del ADN y que son reconocidas por diferentes enzimas que cortan dichas secuencias, y da origen a pequeños fragmentos que pueden ser analizados a través de electroforesis. (Merchán et al., 2017)

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO METODOLÓGICO

La investigación se realizó en diferentes etapas: la primera parte consistió en el análisis fitosanitario de raíces procedentes de plantas de mora con sintomatología de marchitamiento muestreadas en la parroquia San Luis, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo para obtener una colección de hongos filamentosos monospóricos. Los aislamientos obtenidos se realizó una caracterización microbiológica tanto cultural como morfológica realizada en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de recursos naturales (FRN) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (ESPOCH). La parte molecular se tercerizó los servicios de extracción, amplificación y secuenciación de ADN a través de la empresa ID-GEN. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en un vivero ubicado en la Estación Experimental Tunshi perteneciente a la ESPOCH.

#### 2.1. Materiales y equipos

##### 2.1.1. *Material Biológico*

- 10 plantas de mora con síntomas de marchitamiento
- 56 plantas de mora (*Rubus glaucus* Benth)
- Inóculo de hongos pertenecientes al complejo *Fusarium oxysporum*
- Inóculo de hongos pertenecientes al complejo *Fusarium redolens*
- Inóculo de hongos pertenecientes al complejo *Fusarium solani*

##### 2.1.2. *Medios de cultivo*

- Potato Dextrose Agar (PDA Difco™)
- Carnation Leaf Agar (CLA (Leslie y Summerell, 2006))
- Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA (Leslie y Summerell, 2006))
- Agar Agua (Bacto™ Agar)
- Agar Sabouraud

### **2.1.3. Soluciones**

- Estreptomicina
- Chloranfenicol
- Glicerina al 70%

### **2.1.4. Materiales de laboratorio**

- Mechero Bunsen
- Micropipeta
- Puntas de micropipetas (1000  $\mu$ L)
- Cajas de Petri de vidrio (90 mm  $\varnothing$ )
- Fundas Ziploc (64)
- Asas de platino
- Bisturí
- Agujas de disección en acero recto
- Pinzas de laboratorio (longitud 200 mm)
- Vaso de precipitación (100 mL)
- Probeta graduada (500 mL)
- Tubos de ensayo (35 mL)
- Matraz erlenmeyer (1000 mL)
- Criotubos (1.8 mL)
- Placas porta y cubre objeto
- Marcador permanente punta fina
- Cinta parafina

### **2.1.5. Equipos de laboratorio**

- Cámara de flujo laminar vertical
- Incubadora
- Baño María
- Destilador de agua
- Ultra-congelador
- Estereoscopio
- Autoclave

- Microscopio óptico
- Balanza de precisión
- Agitador magnético
- Secador de vidrio
- Cámara de recuento, Neubauer-improved

#### ***2.1.6. Materiales de campo y equipos de campo***

- Tijera de podar
- Azadón
- Rastrillo
- Cámara fotográfica
- libreta de apuntes
- Registrador de temperatura y humedad relativa (HOBO®)
- Jeringuillas (5 ml)
- Sustrato (BM2)
- Insumos (fertilizantes, insecticida, acondicionadores de agua)
- Fundas ziploc (26.8 x 27.3 cm)
- Fundas de polietileno para vivero (37x26 cm)
- Probeta graduada (100 mL)
- Pomas de agua esterilizados (6 L)
- Cocina industrial
- Cilindro gas doméstico
- Olla aluminio
- Taque plástico (200 L)
- Jarra graduada (1 L)
- Mallas de metal esterilizadas

## **2.2. Metodología**

### ***2.2.1. Aislamiento de hongos asociados al marchitamiento en el cultivo de mora en campo.***

#### *2.2.1.1. Recolección de plantas sintomáticas*

Se realizó el muestreo de tejidos del sistema radicular y foliar de diez plantas de mora ubicadas en la parroquia San Luis y San Isidro, que presentaron los siguientes síntomas: área foliar marchita, hojas color café, secas y marchitamiento parcial de folíolos en los bordes. Las plantas que fueron recolectadas se almacenadas en fundas ziploc etiquetadas dentro de un contenedor para su transporte a laboratorio de fitopatología de FRN de la ESPOCH para su posterior procesamiento.

#### *2.2.1.2. Procesamiento de muestras*

Las plantas muestreadas fueron lavadas con agua corriente a presión hasta eliminar cualquier vestigio de suelo que se encuentre adherido al sistema radicular. Posteriormente fue secado con papel absorbente y se procedió a realizar la separación de órganos (área radicular y área foliar). Para el muestreo del área radicular se procedió a realizar cortes de raíces secundarias y para área de la corona se realizó un corte transversalmente y longitudinal registrando la presencia o ausencia de necrosis y se obtuvieron fragmentos aproximadamente a  $1\text{cm}^2$  de longitud de la raíz y corona. (Agrios, 2005).

#### *2.2.1.3. Aislamiento directo de tejidos con presencia o ausencia de marchitamiento*

Los fragmentos muestreados se sometieron a un proceso de desinfección en alcohol al 70% durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 0.1% por 2 minutos y se realiza un triple lavado con agua estéril. Posteriormente las muestras serán transportadas a la cámara de flujo laminar y serán colocadas en cajas Petri con Agar Sabouraud e incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  siguiendo los criterios de (Alfenas y Mafia, 2016).

#### *2.2.1.4. Aislamiento de colonias fúngicas*

Las colonias fúngicas observadas en las cajas Petri con agar Sabouraud fueron transferidas a cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA Difco<sup>TM</sup>) más antibiótico (Estreptomina

y cloranfenicol revisar) mismas que fueron transportadas a la incubadora a 25°C durante un determinado tiempo hasta las colonias puedan alargar las hifas.

#### *2.2.1.5. Obtención de cultivos monospórico*

Para la realización cultivo monospórico se basó en los criterios establecidos por (Duarte et al., 2016) donde se tomaron muestras de cultivos mayores a 7 días de incubación para realizarles cortes de 1cm<sup>2</sup> en los bordes de cada colonia, posteriormente se depositó cada cuadro de medio en un tubo de ensayo con 10 ml de agua estéril y se homogenizaron en agitador Vortex por 30s. Con una micropipeta se tomar 50 µl de la suspensión y se distribuyó en una caja Petri (Ø=90mm) con medio Agar agua. Todas las cajas Petri se sellaron con papel Parafilm y se incubaron a 28°C durante 24 horas. Después se procedió a localizar con un estereoscopio los conidios solitarios germinados y con una aguja de siembra flameada se transfirió cada conidio a una placa Petri con medio de cultivo PDA más antibiótico, las placas Petri se sellaron y fueron incubadas a 28°C durante 7 días.

Luego de haber obtenido los cultivos monospóricos se transportaron fragmentos de micelio a glicerol al 30% previamente esterilizado para ser conservados a (-4°C ver temperatura del ultra congelador).

### **2.2.2. Caracterización microbiología de los aislados obtenidos**

#### *2.2.2.1. Características culturales*

Para la caracterización, se tomó discos de micelio de cultivos monospóricos de 5mm de diámetro y se colocaron en placas Petri (90 mm Ø) con medio de cultivo PDA e incubadas a 28°C. Se evaluarán 3 réplicas por aislado donde se consideraron valores como: Color de la colonia del anverso y reverso según la tabla de colores PANTONE, velocidad de crecimiento en mm registrada cada 24 horas, forma del borde de las colonias, textura del micelio, presencia de exudados y pigmentación del medio de cultivo.

#### *2.2.2.2. Características morfológicas*

Para evaluar las características morfológicas de los aislados fúngicos se utilizó la técnica de micro cultivo siguiendo los criterios establecidos de (Alfenas y Mafia, 2016). Para inducir a la formación de



estructuras reproductoras cada aislado fue transferidos a medios de cultivos específicos, Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA) para facilitar la formación de microconidios y macroconidios se utilizó medio de cultivo y en ellos se incluyeron fragmentos de papel filtro (Whatman<sup>TM</sup> N°1) estéril de 1 cm<sup>2</sup>, se utilizó medio de cultivo Carnation Leaf-piece Agar (CLA) para facilitar la formación de clamidosporas, al cual se le incorporo hojas de clavel estéril. Para la evaluación de las características morfológicas de cada aislados fúngico se realizó con un microscopio de luz LEICA DM 150

Se observo la forma de 50 microconidios y macroconidios, en caso de los microconidios se identificó su disposición en el conidióforo (falsas cabezas, en cadena entre otros) y su forma (ovales, elipsoides, reniforme, ovoide entre otras) y para los macroconidios se evaluó su forma (características de la célula apical, célula basal, pared dorsal, pared ventral, número de septos y dimensiones de cada estructura) y su longitud en micras ( $\mu\text{m}$ ). Se evaluó un total de 10 clamidosporas en las cuales se consideró su forma y dimensión según las claves taxonómicas de *Fusarium* de (Leslie y Summerell, 2006; Balmas et al., 2016)

### **2.2.3. Identificación molecular**

#### *2.2.3.1. Extracción, amplificación y secuenciación de DNA*

Los aislados monospóricos fueron cultivadas a 22°C por 8 días, en medio PDA. El micelio de los aislados fue removido, con auxilio de un palito de madera esterilizado, y transferidos para un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL. La lisis de las células para la liberación del DNA fue realizada a través del congelamiento del micelio con nitrógeno líquido y trituración utilizado un pistilo esterilizado. Para la extracción de DNA toral fue utilizado el protocolo de acuerdo con la empresa ID- GEN 2020 ubicada en Quito.

Para la amplificación del DNA, los siguientes reactivos fueron utilizados en las reacciones de reacción de la cadena de polimerasa (PCR): 12,5  $\mu\text{L}$  de Dream Taq <sup>TM</sup> PCR Master Mix 2x (MBI Fermentas, Vilnius, Lituania), 1  $\mu\text{L}$  de cada primer a 10  $\mu\text{M}$  (Forward y Reverse) sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, U.S.A.), 1  $\mu\text{L}$  de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma - Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.), 5  $\mu\text{L}$  de albumina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A.) 100  $\times$  (10 mg/mL), 2  $\mu\text{L}$  de DNA genómico de cada aislado fúngico (25 ng/ $\mu\text{l}$ ) e 2,5  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas para completar el volumen total para 25  $\mu\text{L}$ .

Los fragmentos de la región ITS y de los genes TEF-1 de todos los aislados fueron amplificados y secuenciados, utilizando los pares de oligonucleótidos iniciadores ITS1: 5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G y ITS4: 5' GCT GCG TTC TTC ATC GAT GC (White et al., 1990) y los

iniciadores EF1-728F: 5' CAT CGA GAA GTT CGA GAA GG y EF1-986R: 5' TAC TTG AAG GAA CCC TTA CC (Carbone & Kohn 1999).

Las etapas del PCR, realizadas en el termociclador C1000<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BIO-RAD), consistieron en un ciclo desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos compuestos cada uno por: i) una desnaturalización a 94 °C por 1 min; ii) un anelamiento a 55 °C por 1 minuto (TEF1- ) o a 52 °C por 1 min (ITS) e; iii) una extensión a 72 °C por 2 min. La última etapa, la extensión final, consistió en un ciclo a 72 ° por 10 min. Los productos del PCR fueron teñidos con GelRed<sup>TM</sup> (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), sometidos a una electroforesis en gel de agarosa (2%) en buffer TAE 1 × y las bandas resultantes visualizadas sobre luz UV en un fotodocumentador (L-Pix Touch, Locus Biotecnologia) para verificar el tamaño y cualidad de las amplificaciones. Los amplicones fueron purificados y secuenciados por Macrogen Inc., Korea del Sur.

#### 2.2.3.2. Análisis Filogenéticos.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron editadas manualmente utilizando el software de bioinformática SeqAssem y el arreglo de los nucleótidos en posiciones ambiguas fueron corregidos por comparación de las secuencias forward y reverse para el montaje de los contigs. Los aislados fueron inicialmente identificados por la verificación de la región parcial del gene ITS y TEF-1 en el banco de datos público GenBank, utilizando la herramienta BLAST nucleotide (Basic Local Alignment Search Tool).

Los análisis filogenéticos utilizando los genes ITS y TEF1- , fueron realizadas con base en la identificación inicial del GenBak. Secuencias adicionales de especies de *Fusarium* spp fueron seleccionadas a partir de los estudios de (Lombard et al., 2019). Todas las secuencias recuperadas fueron alineadas con las secuencias de los aislados fúngicos utilizando el software Muscle®, implementado en el programa MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (KUMAR, 2016). La concatenación de genes para los árboles concatenados fue realizada usando el Sequence Matrix v.1.8 (Vaidya, 2011).

Los análisis filogenéticos fueron basados en Neighbor-Joining Tree (ML) y fueron realizados en con RAxML v. 8.2.12 (Stamatakis, 2014). Los Parámetros utilizados fueron: análisis bootstrap rápido (con 500 replicatas) y la búsqueda para el mejor puntaje del ML tree.

#### **2.2.4. Caracterización de la patogenicidad de los hongos filamentosos obtenidos**

La inoculación y caracterización de la patogenicidad de los aislados fúngicos obtenidos se realizó en el invernadero de la Estación Experimental Tunshi de la ESPOCH en el mes de octubre del año 2020 y la preparación del inóculo y re-aislamiento de los hongos inoculados, se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la FRN de la ESPOCH.

##### *2.2.4.1. Establecimiento de plantas de mora*

Se utilizaron plantas de mora con espinos (mora Andina o mora de Castilla) reproducidas mediante acodo de punta en sustrato BM2. Para el trasplantadas se utilizó sustrato BM2 humedecido el cual fue previamente esterilizado con agua hervida durante 10 min y colocado en fundas de polietileno para vivero posteriormente se procedió a realizar el trasplante.

##### *2.2.4.2. Condiciones durante el ensayo*

La nutrición de las plantas se realizó mediante fertirriego con agua hervida, de acuerdo con los requerimientos nutricionales del cultivo y las condiciones ambientales. La temperatura y humedad relativa media dentro del invernadero durante el ensayo fue: 24,08 °C y 46,38 % durante el día; 12,67 °C y 93,36 % durante la noche. Esta información se obtuvo mediante un Datalogger HOBO®.

#### **2.2.5. Diseño del ensayo**

Para el ensayo de patogenicidad se utilizaron 56 plantas de mora distribuidas en dos unidades experimentales dispuestas en dos bloques con 7 tratamientos repartidos al azar.

##### *2.2.5.1. Factores de estudio*

Factor A: hongos filamentosos

A1: *Fusarium solani*

A2: *Fusarium oxysporum*

A3: *Fusarium redolens*

A4: Agua destilada estéril

## Factor B: Métodos de inoculación

B1: Inmersión de raíces más daño al sistema radicular

B2: Punción sustrato

### 2.2.5.2. Tratamientos

Los tratamientos resultaron de la combinación de los dos factores en estudio A y B. Para establecer un control experimental se utilizó agua destilada estéril, esta fue colocada en las plantas del ensayo de la misma forma que los caldos microbianos.

**Tabla 1-2:** Tratamientos establecidos para las pruebas de patogenicidad en mora.

<b>Bloque 1</b>		<b>Bloque 2</b>	
Tratamiento	código	Tratamiento	código
T1	B1A1	T1	B1A1
T2	B2A1	T2	B2A1
T3	B1A2	T3	B1A2
T4	B2A2	T4	B2A2
T5	B1A3	T5	B1A3
T6	B2A3	T6	B2A3
T7	B1A4	T7	B2A4

Realizado por: Guerrero, A., 2021

## 2.2.6. Preparación del inóculo de especies de *Fusarium* spp.

### 2.2.6.1.1. Incremento del inóculo

Para la preparación de inóculo se subcultivo micelio de cultivos monospóricos de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens* y *Fusarium solani* respectivamente en placas Petri (90mm Ø) con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar estéril más antibiótico y se incubaron a 25°C. A los catorce días se agregará 20 mL de agua desionizada estéril en cada caja Petri agitándole levemente, la suspensión de esporas obtenidas se depositó en un Erlenmeyer de 250 mL.

### **2.2.6.1.2. Cálculo de la concentración de inóculo**

Para cada suspensión se realizó el conteo de conidios utilizando una cámara Neubauer. Con los datos obtenidos se ajustó la concentración a  $1 \times 10^6$  conidios \* mL<sup>-1</sup>, valiéndose de la siguiente fórmula:  $V1 \times C1 = V2 \times C2$  para lograr la concentración.

De donde: V1 = Volumen 1

C1= Concentración 1

V2= Volumen 2

C2= Concentración 2

### **2.2.7. Métodos de inoculación**

Los hongos filamentosos obtenidos fueron inoculados en plantas sanas de 7 meses de edad para posteriormente comprobar los postulados de Koch. La suspensión de esporas fue inoculada mediante corte al sistema radicular más inmersión de las raíces apicales en la suspensión de inóculo y punción al sustrato.

#### *2.2.7.1. Método de inoculación mediante corte al sistema radicular más inmersión de raíces en suspensión de inóculo*

El método de inoculación se realizó mediante el corte de las raíces apicales más la inmersión de raíces en una suspensión de conidios (2000ml) durante 10 minutos. Previamente las plantas de mora se retirará el sustrato y se procederá a realizar cortes de 1 cm de longitud a las raíces apicales con la ayuda de un cuchillo. Después se procedió a trasplantar nuevamente las plantas utilizando el mismo sustrato retirado anteriormente.

#### *2.2.7.2. Método de inoculación mediante punción al sustrato.*

El método de inoculación se realizó inyectando 20ml de la suspensión de conidios en el sustrato distribuyéndolo en 4 puntos cardinales (norte, sur, este y oeste) a 1cm del tallo principal.

### 2.2.8. Evaluación de cepas inoculadas en campo.

La evolución de la sintomatología de las plantas de mora se llevó a cabo cada 2 días y el cálculo de la incidencia se realizó mediante la fórmula planteada por la Sociedad Inglesa de Micología:

$$\text{Incidencia (I) (\%)} = \text{Número de plantas afectadas} / \text{Número total de plantas evaluadas}$$

Los síntomas foliares fueron registrados fotográficamente y la presencia de necrosamiento de la corona fue registrado fotográficamente con la ayuda de un estereoscopio. El reaislamiento de los agentes fúngicos inoculados, se realizó siguiendo los pasos del literal 2.2.1.

#### 2.2.8.1. Evaluación de síntomas externos

La sintomatología presentada por cada planta fue valorada cualitativamente mediante la escala propuesta por (Pastrana et al., 2017) en el cultivo de mora. Los registros escritos se llevaron fotográficamente.

**Tabla 5-2:** Escala cualitativa de daños foliares establecida por (Pastrana et al., 2017)

<b>Escala ordinal descriptiva</b>	
<b>Grado</b>	<b>Porcentaje de marchitamiento</b>
1	No síntomas
2	Secado y muerte de hojas más viejas
3	Hojas viejas sintomáticas acompañado de marchitamiento de las hojas más jóvenes y/o retraso del crecimiento
4	Síntomas foliares graves y ennegrecimiento del tallo
5	Planta muerta

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021

#### 2.2.8.2. Evaluación de síntomas internos

El porcentaje de necrosis a nivel de la corona se determinará finalizado el ensayo y se registrará el avance del daño ocasionado a la corona realizando un corte transversal y longitudinal para determinar el porcentaje de marchitamiento vascular mediante el programa APS asses 2.0 y para el registro de tatos se utilizó la escala propuesta por (Sánchez et al., 2019) realizada en el cultivo de mora.

**Tabla 2-2:** Escala cuantitativa de necrosis a nivel de la corona establecida por (Sánchez et al., 2019)

Escala ordinal descriptiva	
Grado	Porcentaje de daño
0	0
1	1 - 25
2	26 – 50
3	51 – 75
4	>75

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021

### ***2.2.9. Aislamiento de agentes fúngicos inoculados.***

#### *2.2.9.1. Procesamiento de plantas*

En el mes de noviembre del 2019 se transportó las plantas previamente etiquetadas con su tratamiento, repetición y bloque correspondiente al laboratorio de FRN en la ESPOCH. Las plantas fueron lavadas con agua corriente a presión hasta eliminar cualquier vestigio de sustrato adherido al sistema radicular y secadas con papel absorbente.

#### *2.2.9.2. Registro de síntomas*

Se procedió a realizar un registro fotográfico de la parte área radicular y área foliar. La valoración de síntomas internos de cada planta en estudio se realizó fotográficamente en un estereoscopio registrado la presencia o ausencia de marchitamiento vascular en la corona cortada transversal y longitudinalmente.

#### *2.2.9.3. Procesamiento estadístico*

El procesamiento estadístico de los datos de las variables evaluadas se realizó mediante una prueba estadística T Student para muestras independiente con el paquete estadístico Statistic Package for Social Science (SPSS) versión 21.0 para Windows.

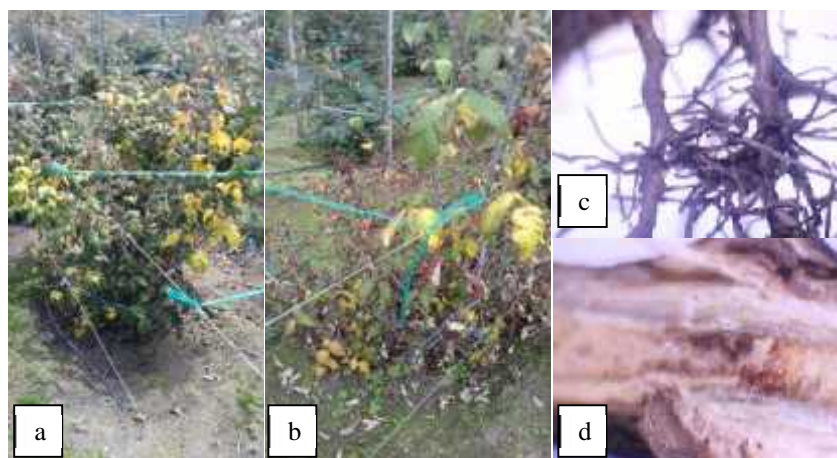
## CAPÍTULO III

### 3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

#### 3.1. Aislamiento de hongos asociados al marchitamiento del cultivo de mora en campo.

##### 3.1.1. *Recolección de plantas sintomáticas*

El cultivo de mora muestreado, los síntomas asociados al marchitamiento mostrados por las plantas en su totalidad fueron muy similares. En el follaje se identificó un marchitamiento parcial o total de la parte aérea observándose en los foliolos amarillamiento, necrosis y secos en su mayoría. Se pudo observar un sistema radicular pobre y necrosado con poca o escasa presencia de la zona pilífera. Al realizar un corte longitudinal a nivel de la corona se observó una necrosis de los tejidos vasculares manifestada por una decoloración con una tonalidad marrón en el centro.



**Figura 1-3:** (a-b) Marchitez en plantas de mora en campo, (c) necrosis del sistema radicular, (d) Necrosis en la corona de tonalidad marrón en el centro.

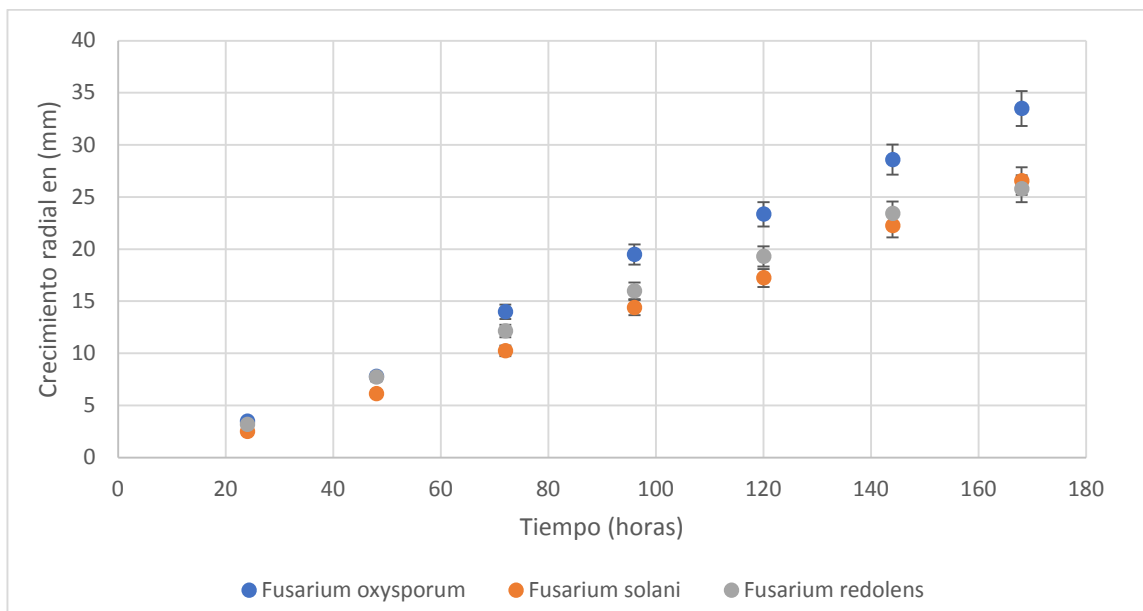
**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.



### 3.2. Caracterización cultural y morfológica de los agentes fúngicos obtenidos en el cultivo de mora.

#### 3.2.1. Velocidad de crecimiento

Entre los aislados fúngicos obtenidos a partir de tejido necrosado a nivel de la corona de plantas de mora se observó diferencias significativas respecto a la velocidad de crecimiento micelial para *F. oxysporum* aislado con mayor velocidad de crecimiento de ( $4,45 \text{ mm día}^{-1}$ ) presentado una mayor diferencia significativa respecto a *F. solani* ( $3,36 \text{ mm día}^{-1}$ ) y *F. redolens* de ( $3,79 \text{ mm día}^{-1}$ ).



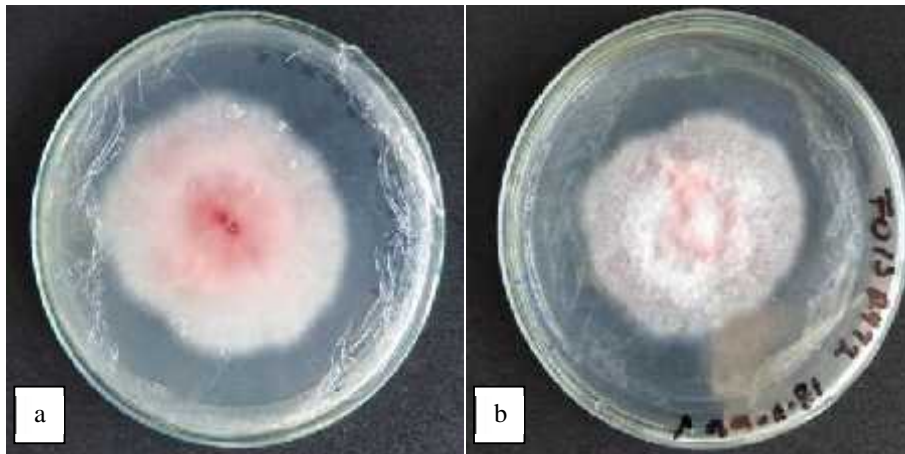
**Gráfico 1-3:** Velocidad de crecimiento micelial radial (mm/día) evaluado cada 24 horas durante siete días de *F. oxysporum*, *F. solani* y *F. redolens* cultivadas en medio de cultivo PDA a 28°C.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

#### 3.2.2. Características culturales y morfológicas

##### 3.2.2.1. *Fusarium oxysporum*

Los aislados obtenidos de *F. oxysporum* crecidas en medio de cultivo PDA incubadas a 28°C. Presentaron una coloración en el reverso de la colonia de blanca – violeta pálido (PANTONE 812C) y en el anverso fue de color blanco, con bordes irregulares, textura algodonosa, y hubo ausencia de líquido de transpiración

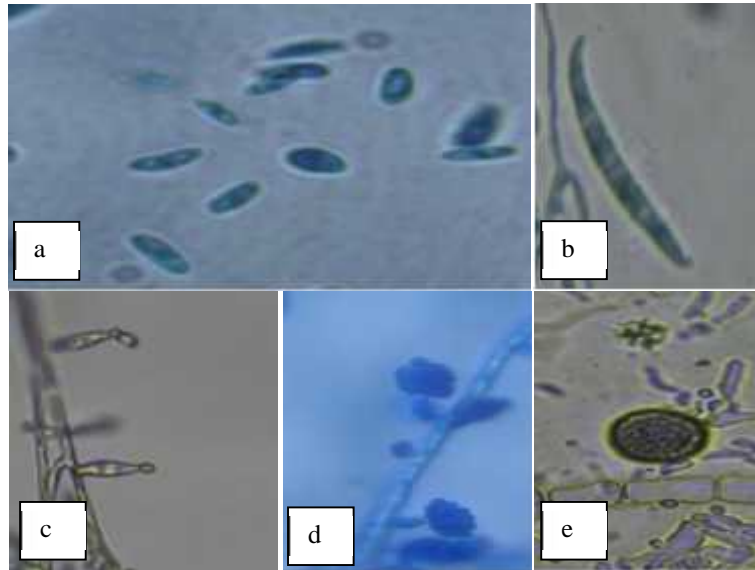


**Figura 2-3:** a) color violáceo pálido del reverso de la colonia, b) color blanco del reverso de la colonia.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

Las características morfológicas observadas en los aislados de *F. oxysporum*, formaron macroconidios de una longitud promedio de  $34,83\mu\text{m}$  largo x  $3,28\mu\text{m}$  de ancho ligeramente curvados. La célula apical de los macroconidios fue en forma de gancho. La célula basal de los macroconidios fue en forma de pie. Generalmente los macroconidios presentaron 3 septos. Los microconidios ( $8,21\mu\text{m}$  de largo x  $2,28\mu\text{m}$  de ancho), presentaron forma oval, reniforme y generalmente elipsoides. Los observaron microconidios en disposición de falsas cabezas. Los conidióforos se presentaron en forma de monofiálides cortos en forma de botella o de bolo. Se observaron clamidosporas solitarias con paredes lisas.

Las características culturales y morfológicas observadas en los aislados de *F. oxysporum*, fueron similares a los citados por (Leslie & Summerell, 2006; Balmas et al., 2016; Tsuneo, 2002). Sin embargo difiere con las características mencionadas por (Lombard et al., 2019) describiendo a los macroconidios con 3 septos con  $27\mu\text{m}$  de largo y los microconidios no septadas con una medida promedio de  $8\mu\text{m}$  x  $3\mu\text{m}$  y con un septo  $14\mu\text{m}$  x  $3\mu\text{m}$ .

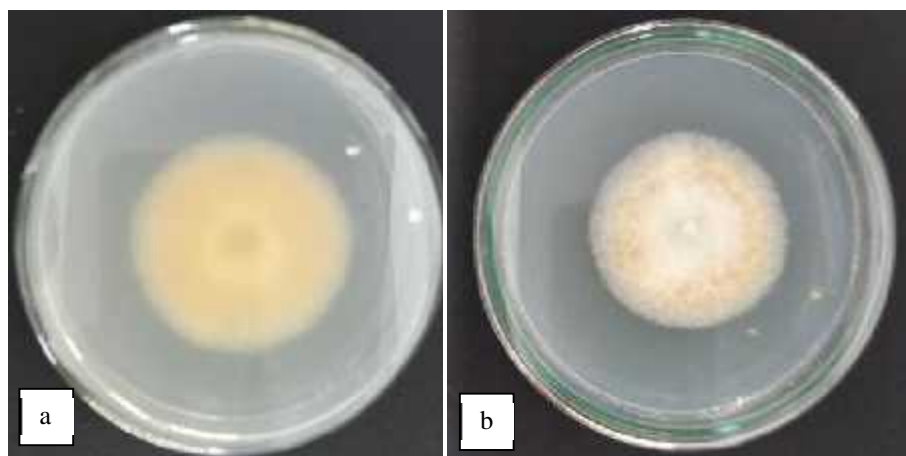


**Figura 3-3:** a-) microconidios 400x, b-) macroconidios 400x, c-) monofiálides 400x, d-) falsas cabezas 400x, e-) clamidosporas 400x.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

#### 3.2.2.2. *Fusarium redolens*

Los aislados obtenidos de *Fusarium redolens* crecidas en medio de cultivo PDA incubadas a 28°C. Presentaron una coloración en el reverso de la colonia crema (PANTONE 1205C) y en el anverso fue de color blanco con crema (PANTONE 1205C), con bordes regulares, textura algodonosa, y hubo ausencia de líquido de transpiración

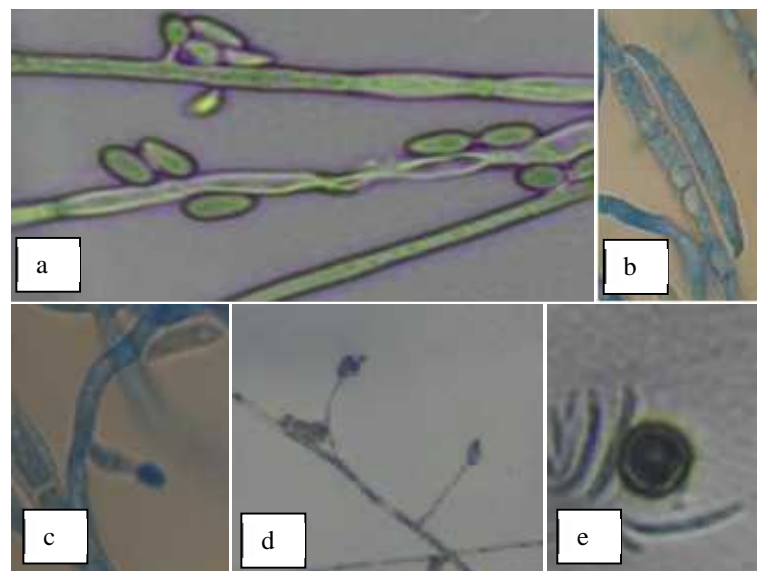


**Figura 4-3:** a) color crema pálido del reverso de la colonia, b) color blanco - crema del reverso de la colonia.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021

Las características morfológicas observadas en los aislados de *Fusarium redolens*, formaron macroconidios de una longitud promedio de 35,96  $\mu\text{m}$  largo x 3,78  $\mu\text{m}$  en forma de bote. La célula apical de los macroconidios fue en forma de gancho. La célula basal de los macroconidios fue en forma de pie. Generalmente los macroconidios presentaron 3 septos. Los microconidios (8.21  $\mu\text{m}$  de largo x 2.28 $\mu\text{m}$  de ancho), presentaron generalmente forma ovoide con la base truncada. Los observaron microconidios con cero septos en disposición de falsas cabezas. Los conidióforos se presentaron en forma de monofiálides cortos. Se observaron clamidosporas solitarias con paredes ligeramente rugosas.

Las características culturales y morfológicas observadas en los aislados de *F. redolens*, fueron similares a los citados por (Leslie & Summerell, 2006; Bienapfl et al., 2010).

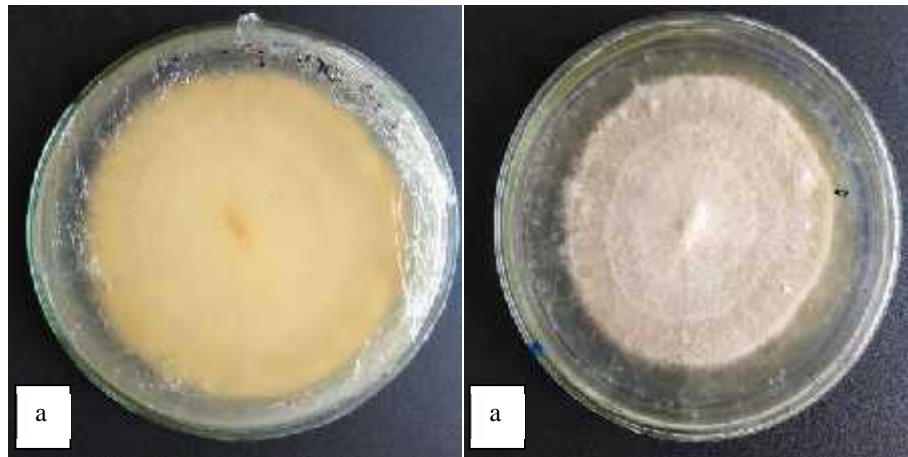


**Figura 5-3:** a-) microconidios 400x, b-) macroconidios 100x, c-) monofiálides 400x, d-) falsas cabezas 400x, e-) clamidosporas 400x.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

### 3.2.2.3. *Fusarium solani*

Los aislados obtenidos de *F. solani* crecidas en medio de cultivo PDA incubadas a 28°C. Presentaron una coloración en el reverso de la colonia marrón pálido (PANTONE 101C) y en el anverso fue de color blanco con crema (PANTONE 1205C), con bordes regulares, textura algodonosa, y hubo ausencia de líquido de transpiración

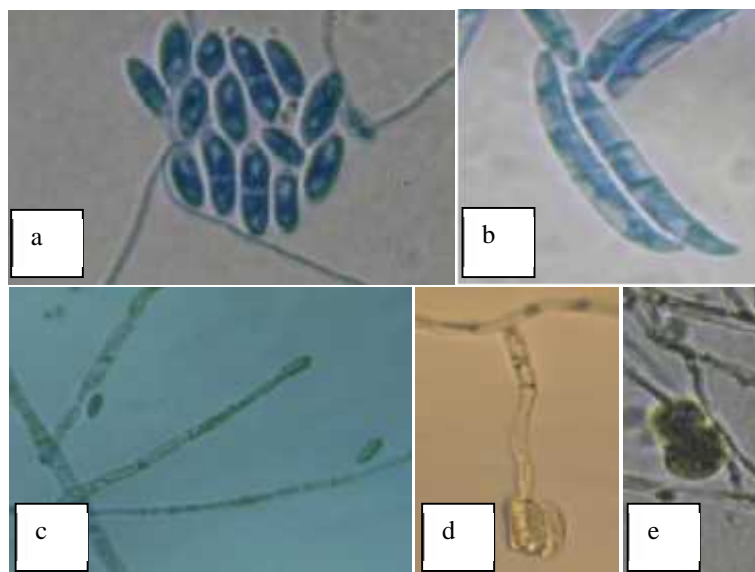


**Figura 6-3:** a) color crema pálido del reverso de la colonia, b) color blanco - crema del reverso de la colonia.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021

Las características morfológicas observadas en los aislados de *F. solani*, formaron macroconidios de una longitud promedio de 36,51  $\mu\text{m}$  largo x 4,42  $\mu\text{m}$  de ancho ligeramente curvados. La célula apical de los macroconidios fue ligeramente en forma de gancho y engrosadas. La célula basal de los macroconidios fue en forma de pie. Generalmente los macroconidios presentaron 4 septos. Los microconidios (9.3  $\mu\text{m}$  de largo x 2.80  $\mu\text{m}$  de ancho), presentaron forma reniforme y generalmente elipsoides. Las microconidios en disposición de falsas cabezas. Los conidióforos se presentaron en forma de monofiálides alargados. Se observaron clamidosporas acopladas con paredes verrugosas.

Las características culturales y morfológicas observadas en los aislados de *F. solani*, fueron similares a los citados por (Leslie & Summerell, 2006; Balmás et al., 2016; Tsuneo, 2002; Chehri et al., 2015).



**Figura 7-3:** a-) microconidios 400x, b-) macroconidios 40x, c-) monofiálides 400x, d-) falsas cabezas 400x, e-) clamidosporas 400x.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021

### 3.2.3. *Identificación molecular*

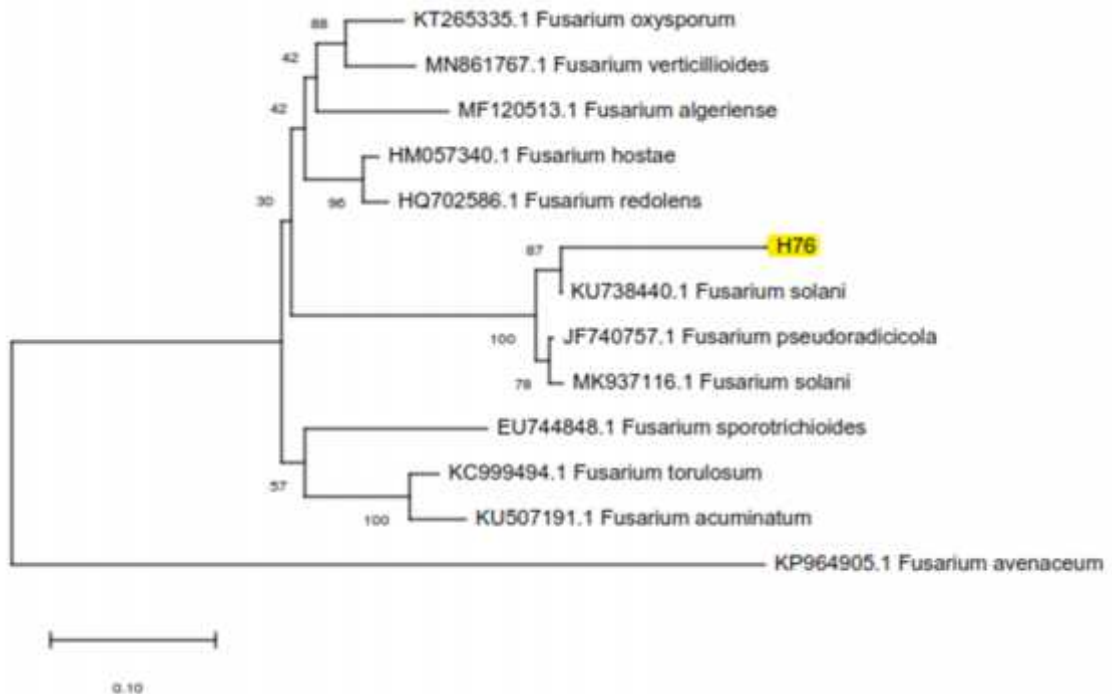
La identificación inicial de las secuencias parciales obtenidas de las regiones la región EF1- confirmó que el aislados obtenidos se asocian con los fenotipos de *F. solani* y *F. redolens* y las secuencias parciales obtenidas de las regiones ITS confirmo que el aislado obtenido se asocia con los fenotipos de *F. oxysporum*. Esta identificación fue verificada tanto por los árboles filogenéticos individuales de la región ITS del aislado H80 pertenecientes a la especie *F. oxysporum* y la región EF1- del asilado H76 y H78 pertenecientes a las especies de *F. solani* y *F. redolens* respectivamente. Los valores de bootstrap se anotan en los entrenudos. Los valores de Bootstrap se basan en 500 remuestreos.

**Tabla 1-3:** Identificación inicial de las secuencias ITS y TEF1- de hongos filamentosos en estudio mediante BLAST en el GenBank

Muestra	Código	Organismo	Fragmento	Identidad %	Nº Accesoión
1	H76	<i>Fusarium solani</i>	EF1 728F/986R	97.99	MK069603.1
2	H78	<i>Fusarium redolens</i>	EF1 728F/986R	96.03	MH315933.1
4	H80	<i>Fusarium oxysporum</i>	ITS1/ITS4	100	MH681159.1

Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

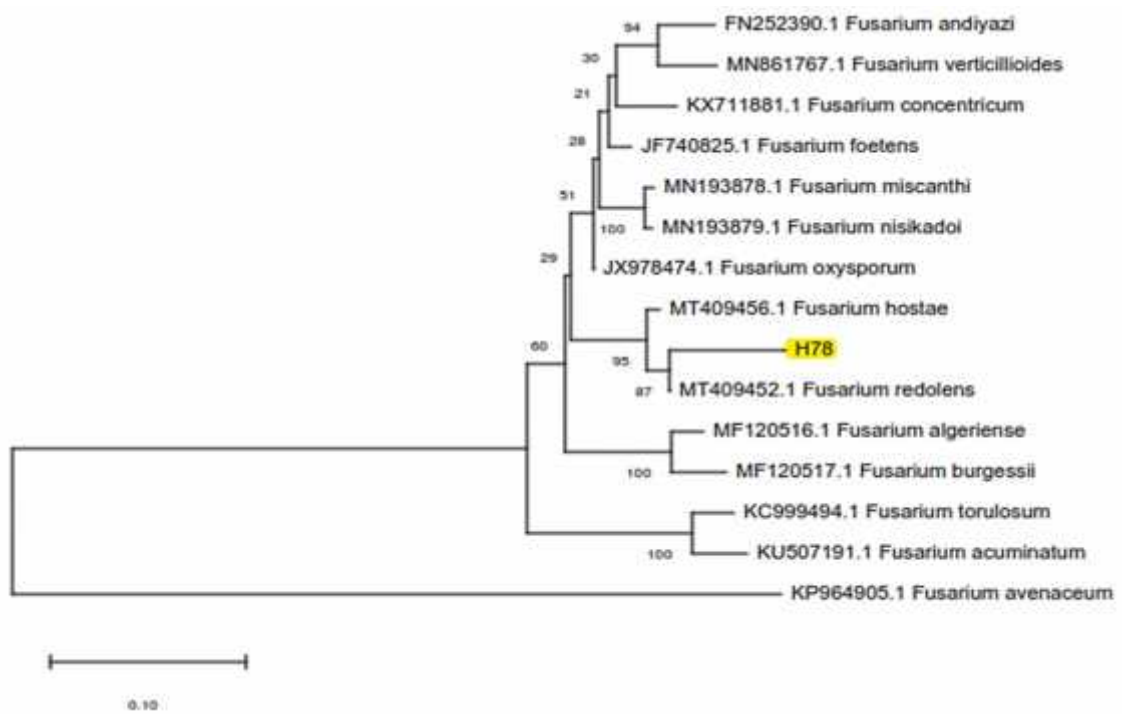
Realizado por: Guerrero, A., 2021.



**Figura 8-3:** Árbol filogenético inferido a partir del análisis Neighbor - Joining (NJ) del alineamiento de las secuencias EF1 de *Fusarium* spp.

Realizado por: Guerrero, A., 2021.

Los valores de soporte están mostrados próximos a los nudos. El árbol fue enraizado con *Fusarium avenaceum*. La barra de escala indica una diferencia de secuencia del 0,1%. La especie en estudio H76 tuvo 87% de similitud con la accesión KU738440.1 (Haas et al., 2016)

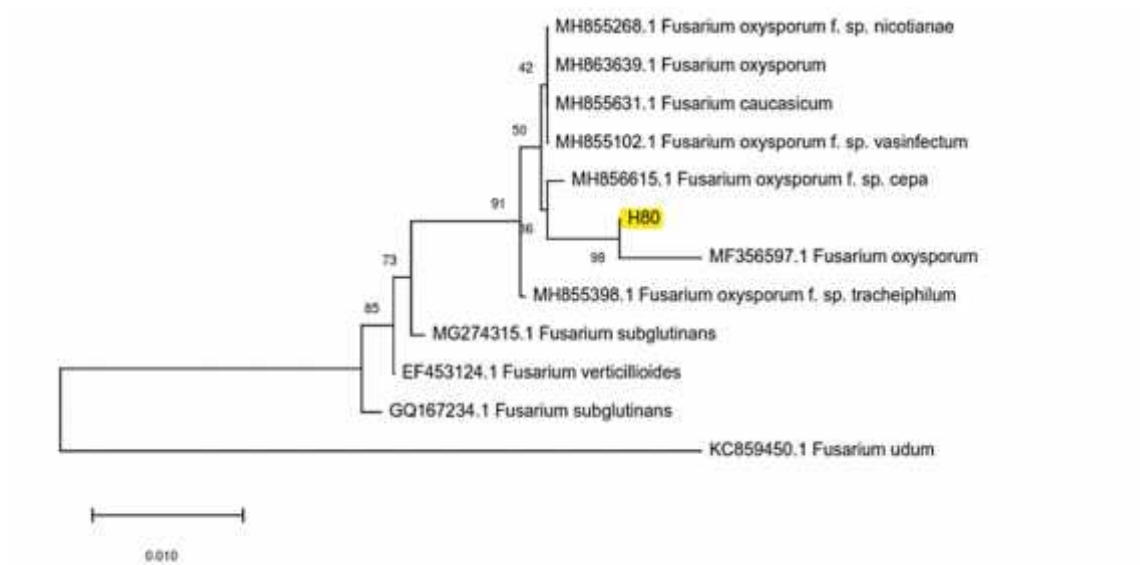


**Figura 9-3:** Árbol filogenético inferido a partir del análisis Neighbor - Joining (NJ) del alineamiento de las secuencias EF1 de *Fusarium* spp.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

Los valores de soporte están mostrados próximos a los nudos. El árbol fue enraizado con *Fusarium avenaceum*. La barra de escala indica una diferencia de secuencia del 0,1%. La especie en estudio H76 tuvo 87% de similitud con la accesión MT409452.1 (Gargouri et al., 2020)





**Figura 10-3:** Árbol filogenético inferido a partir del análisis Neighbor - Joining (NJ) del alineamiento de las secuencias ITS de *Fusarium* spp.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

Los valores de soporte están mostrados próximos a los nudos. El árbol fue enraizado con *Fusarium avenaceum*. La barra de escala indica una diferencia de secuencia del 0,01%. La especie en estudio H76 tuvo 98% de similitud con la accesión MF356597.1 (Zhao et al., 2018)

### 3.2.4. Evaluación de la patogenicidad de los aislados fúngicos inoculados.

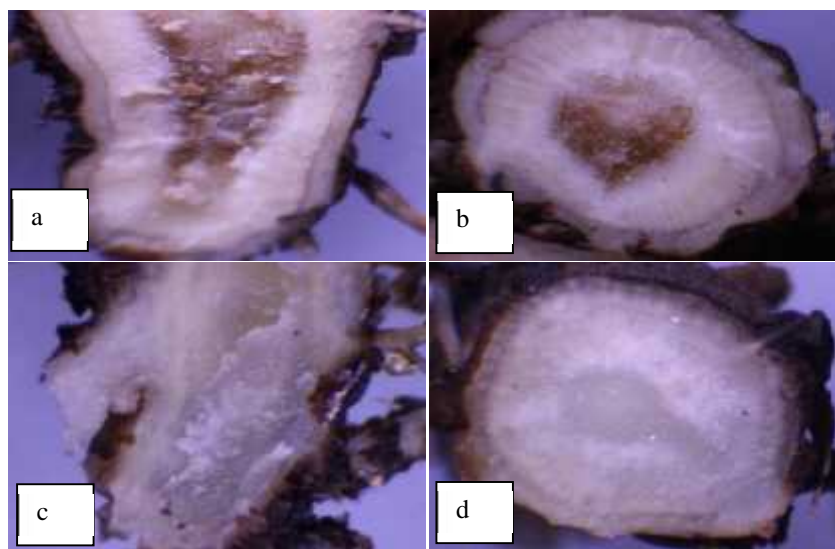
#### 3.2.4.1. Evaluación de la patogenicidad de *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. solani*

Las plantas de mora de siete meses de edad inoculadas con *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. solani* presentaron síntomas similares asociados al marchitamiento. El primer síntoma en observarse fue un amarillamiento del área foliar, se observó una necrosis en los ápices de los folíolos extendiéndose por todo el margen, la necrosis se presentó principalmente en las hojas bajas posteriormente esta necrosis fue avanzando hasta secar completamente las hojas y provocar una muerte general de la planta. En la corona se observó necrosis interna del tejido vascular de color marrón a rojizo.



**Figura 11-3:** a-) amarillamiento del área foliar, b-) necrosis de ápice del foliolo, c-) necrosis de del margen de los foliolos.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.



**Figura 12-3:** a-) necrosis vascular vista mediante un corte longitudinal, b-) necrosis vascular vista mediante un corte transversal, c-) corte longitudinal de la corona, planta control, d) corte longitudinal de la corona, planta control

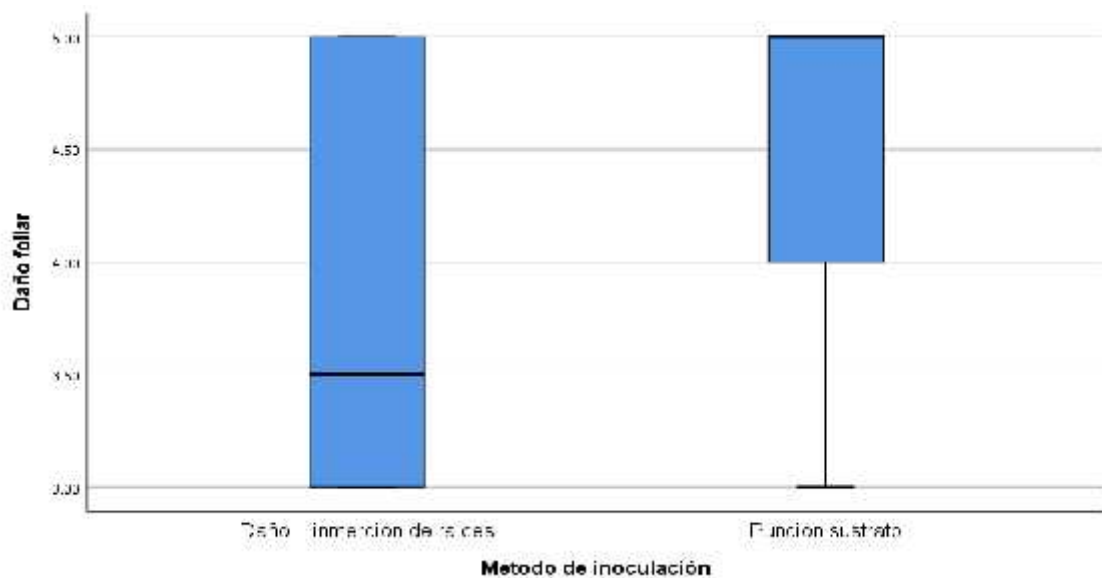
**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

En diferentes investigaciones realizadas (Gordon et al., 2016; Pastrana et al., 2017; Hernández et al., 2020) identifican a *Fusarium oxysporum* como el principal patógeno causante de la necrosis del sistema radicular presentado una coloración rojiza a nivel de la corona y marchitamiento del área foliar; síntomas que son similares a los mostrados durante el ensayo sin embargo las inoculaciones

realizadas por (Gordon et al., 2016; Pastrana et al., 2017) presentaron un ennegrecimiento ascendente del tallo que difiere con los realizados por esta investigación.

### 3.2.4.2. Evaluación de los síntomas internos y externos causados por *Fusarium oxysporum*

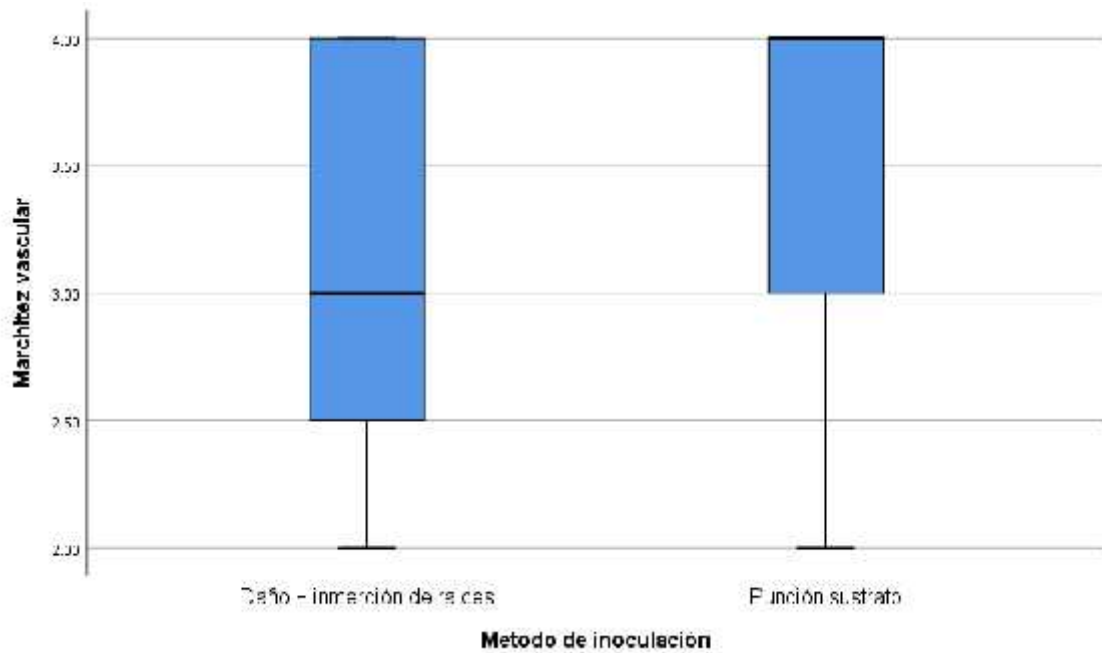
La valoración asignada en la escala de síntomas externos a nivel foliar mencionada en el cuadro 5-2, se tomó en consideración el estado sintomatológico de las hojas observando clorosis, amarillamiento y necrosis y coloración de los tallos. Las plantas utilizadas como control experimental no mostraron sintomatología similar al resto de los tratamientos realizados. Mediante la prueba T para muestras independientes, la probabilidad obtenida  $P\text{-valor} > 0.05$  no represento diferencias significativas entre los métodos de inoculación.



**Gráfico 2-3:** Evaluación de síntomas Foliare causado por *Fusarium oxysporum*

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

La valoración asignada en la escala de síntomas internos a nivel de necrosis de la corona mencionada en el cuadro 5-2, se tomó en consideración el porcentaje de marchitez a nivel de la corona mediante un corte transversal calculado mediante el programa APS Assess 2.0. Las plantas utilizadas como control experimental no mostraron sintomatología similar al resto de los tratamientos realizados. Mediante la prueba T para muestras independientes, la probabilidad obtenida  $P\text{-valor} > 0.05$  no representó diferencias significativas entre los métodos de inoculación.



**Gráfico 3-3:** Evaluación de necrosis en la corona causado por *Fusarium oxysporum*

Realizado por: Guerrero, A., 2021.

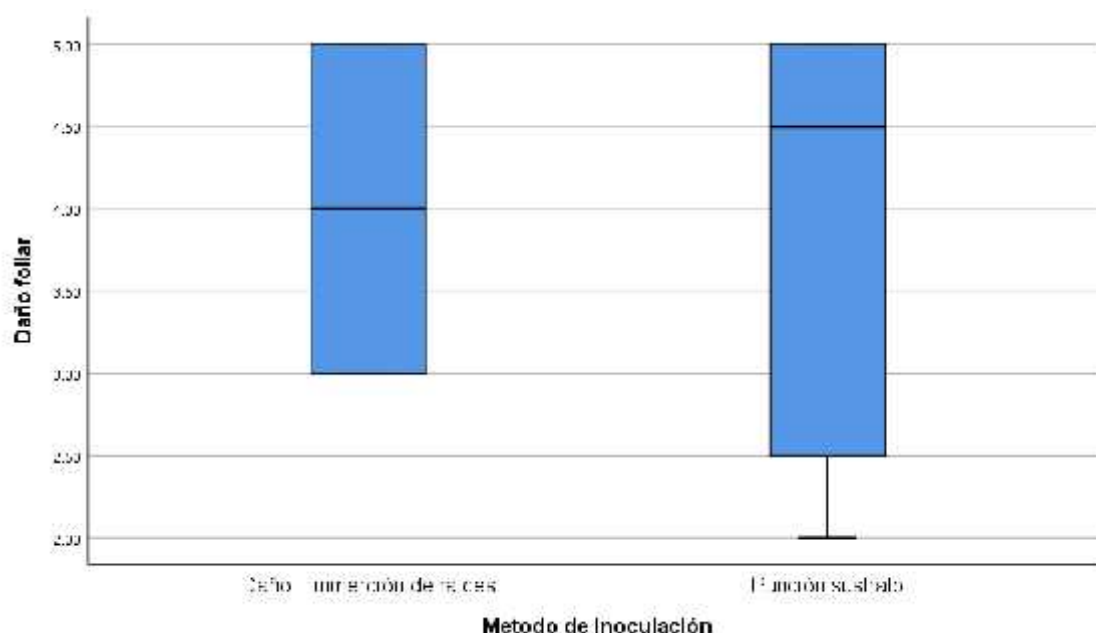
En California (Pastrana et al., 2017) realizaron pruebas de patogenicidad con *Fusarium oxysporum* en plantas de mora. Las plantas inoculadas fueron sumergidas en una suspensión de conidial de  $1 \times 10^6$  conidios  $mL^{-1}$  en agar agua al 0.1% durante 10 minutos. La temperatura varía de 15°C a 30°C y una humedad relativa de 15 a 75%. De cuatro a nueve meses de edad las plantas se calificaron con una escala semicontinua de 1 a 5; el cual tuvo un rango de 5 para las plantas de mora evaluadas. En esta investigación se propone que las cepas de *Fusarium oxysporum* causantes de la marchitez de la mora sean reconocidas como una nueva forma specialis, que designaron como *Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*.

Otras investigaciones realizadas en California y México se ha demostrado la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* en plantas de mora. Cuyas investigaciones permitieron reportar por primera vez a *Fusarium oxysporum* como agente causal del marchitamiento del cultivo de mora (Gordon et al., 2016; Meraz et al., 2018; Rebollar & Silva, 2021). Los síntomas que presentaron las plantas inoculadas del ensayo presentaron características similares en su mayoría como: un amarillamiento progresivo del área foliar y necrosis de las hojas y los tejidos internos de la corona con una coloración rojo a marrón sin embargo en la investigación citada presentó un síntoma a nivel del tallo presentando ennegrecimiento ascendente desde el suelo síntoma que no se presentó en la investigación realizada.

En Ecuador (Proaño, 2014; Martínez, 2014) se han identificado mediante microscopía óptica y PCR a *Fusarium oxysporum*, *Cylindrocarpon destructans*, *Verticillium albo-atrum* y *Verticillium dahliae* relacionados directamente con la sintomatología de marchitez.

### 3.2.4.3. Evaluación de los síntomas internos y externos causados por *Fusarium redolens*

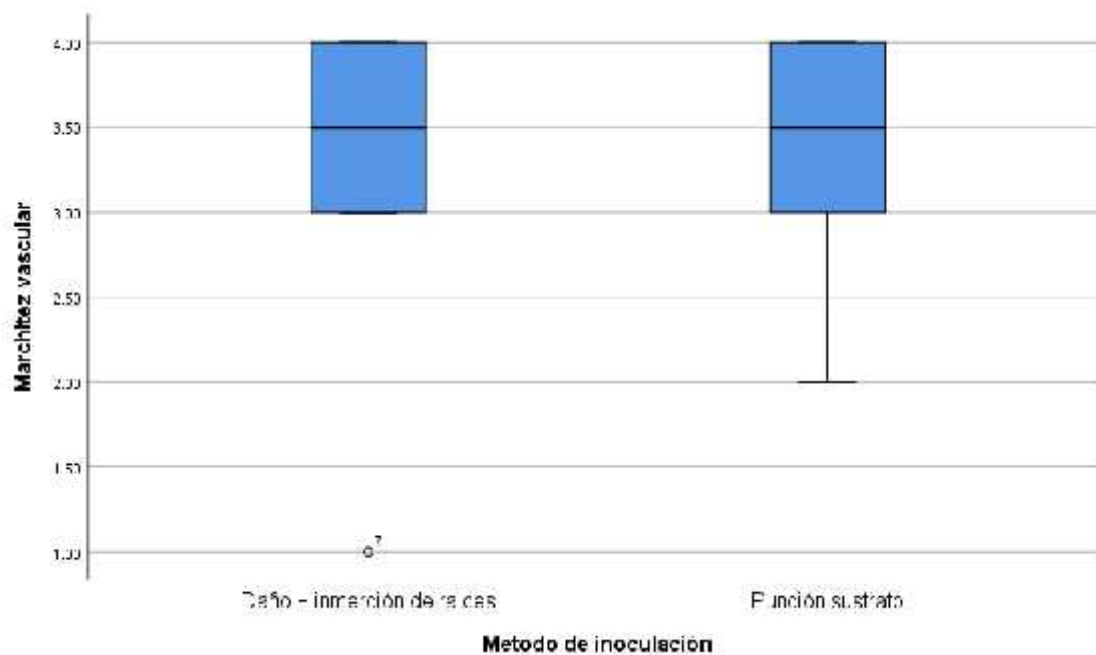
La valoración asignada en la escala de síntomas externos a nivel foliar mencionada en el cuadro 5-2, se tomó en consideración el estado sintomatológico de las hojas observando clorosis, amarillamiento y necrosis y coloración de los tallos. Las plantas utilizadas como control experimental no mostraron sintomatología similar al resto de los tratamientos realizados. Mediante la prueba T para muestras independientes, la probabilidad obtenida  $P\text{-valor} > 0.05$  no represento diferencias significativas entre los métodos de inoculación.



**Gráfico 4-3:** Evaluación de síntomas foliares causado por *Fusarium redolens*

Realizado por: Guerrero, A., 2021.

La valoración asignada en la escala de síntomas internos a nivel de necrosis de la corona mencionada en el (cuadro 6-2), se tomó en consideración el porcentaje de marchitez a nivel de la corona mediante un corte longitudinal calculado mediante el programa APS Assess 2.0. Las plantas utilizadas como control experimental no mostraron sintomatología similar al resto de los tratamientos realizados. Mediante la prueba T para muestras independientes, la probabilidad obtenida  $P\text{-valor} > 0.05$  no represento diferencias significativas entre los métodos de inoculación.



**Gráfico 5-3:** Evaluación de necrosis en la corona causado por *Fusarium redolens*

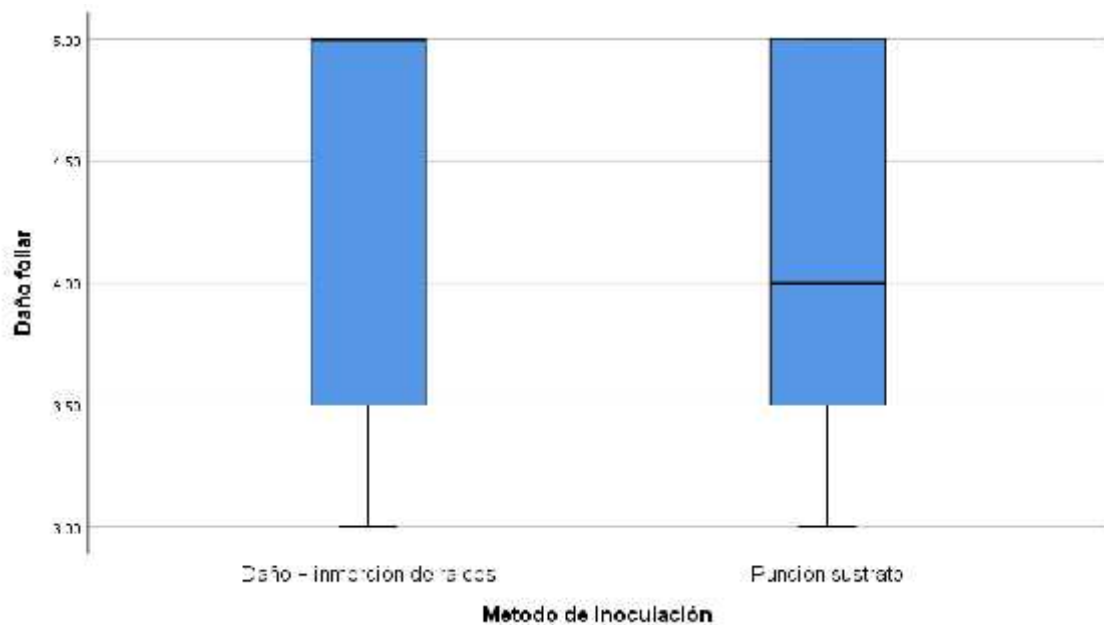
Realizado por: Guerrero, A., 2021.

En diferentes investigaciones realizadas sobre agentes fitopatógenos asociados al cultivo de mora no se ha identificado *Fusarium redolens* sin embargo en esta investigación se reporta a *Fusarium redolens* como agente causal del marchitamiento. Investigaciones realizadas en Canadá, E.E-UU, Líbano, Marruecos, Pakistán, España, Holanda y México han demostrado la patogenicidad de *F. redolens* en plantas de garbanzo, guisante, espárrago, lenteja, trigo y clavel. Cuyas investigaciones permitieron reportar por primera vez a *Fusarium redolens* como agente causal del marchitamiento y necrosis de la corona manifestada por decoloraciones y una tonalidad marrón en los haces vasculares y provocando un ahogamiento del sistema radicular (Camacho, 2012; Esmaeilli et al., 2011; Baayen et al., 2000; Jiménez et al., 2011). Los síntomas que presentaron las plantas inoculadas del ensayo presentaron características similares en su mayoría como: un amarillamiento progresivo del área foliar y necrosis de las hojas y los tejidos internos de la corona con una coloración marrón.

#### 3.2.4.4. Evaluación de los síntomas internos y externos causados por *Fusarium solani*

La valoración asignada en la escala de síntomas externos a nivel foliar mencionada en el (cuadro 5-2), se tomó en consideración el estado sintomatológico de las hojas observando clorosis, amarillamiento y necrosis y coloración de los tallos. Las plantas utilizadas como control experimental no mostraron sintomatología similar al resto de los tratamientos realizados.

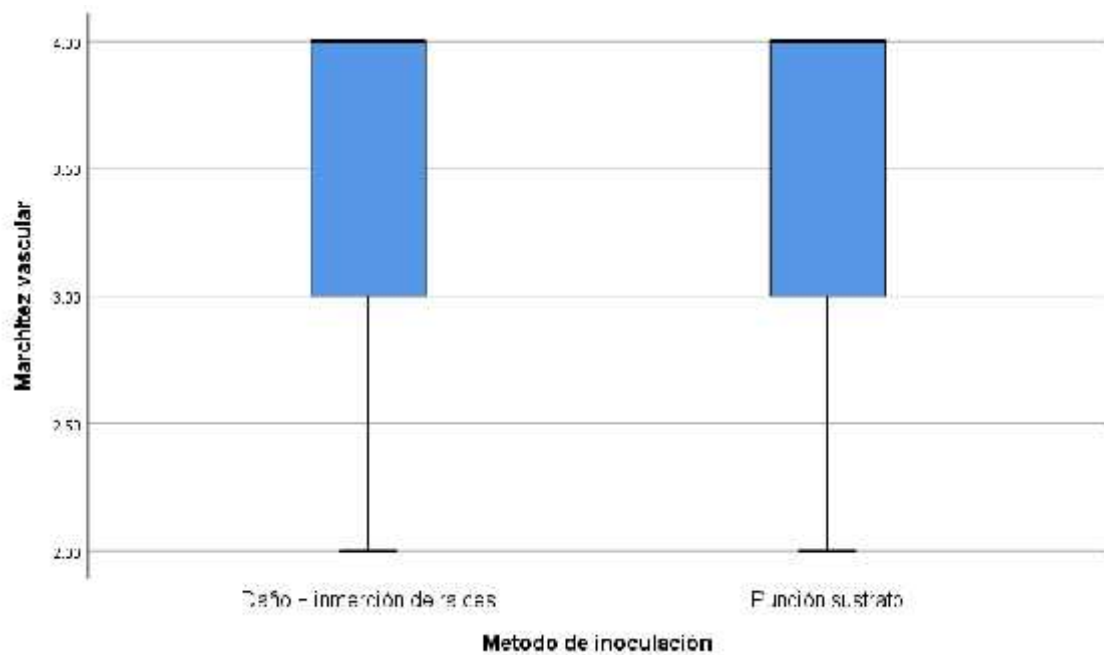
Mediante la prueba T para muestras independientes, la probabilidad obtenida  $P\text{-valor} > 0.05$  no represento diferencias significativas entre los métodos de inoculación.



**Gráfico 6-3:** Evaluación de foliares causado por *Fusarium solani*

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

La valoración asignada en la escala de síntomas internos a nivel de necrosis de la corona mencionada en el (6-2), se tomó en consideración el porcentaje de marchitez a nivel de la corona mediante un corte longitudinal calculado mediante el programa APS Assess 2.0. Las plantas utilizadas como control experimental no mostraron sintomatología similar al resto de los tratamientos realizados. Mediante la prueba T para muestras independientes, la probabilidad obtenida  $P\text{-valor} > 0.05$  no represento diferencias significativas entre los métodos de inoculación.

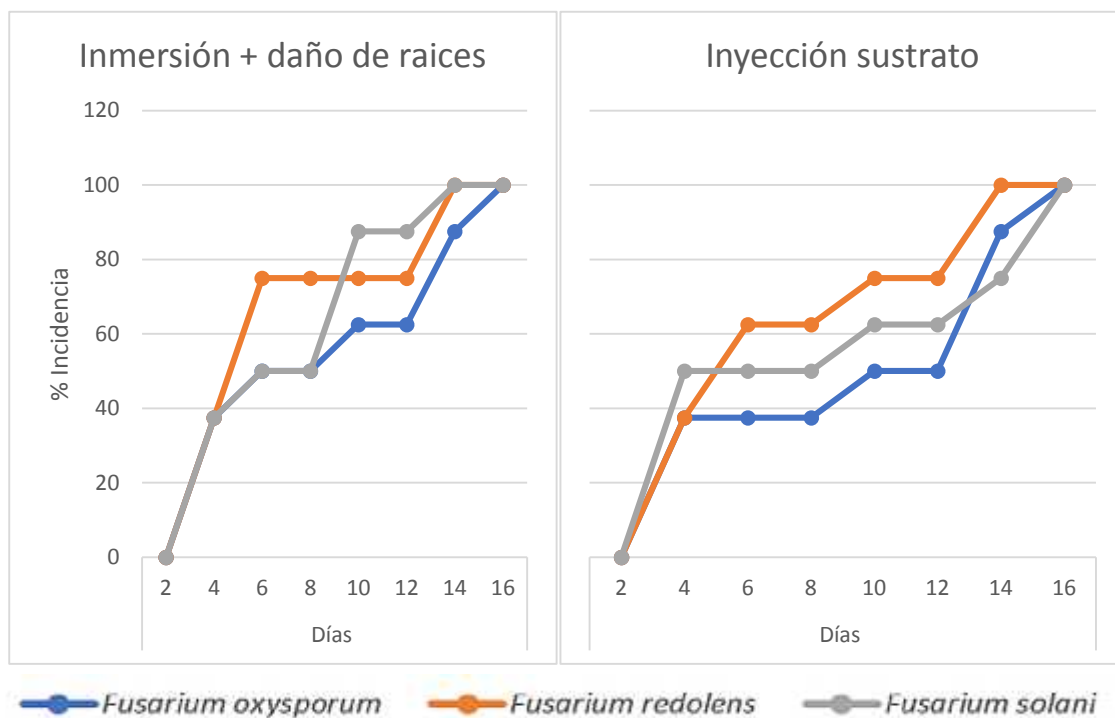


**Gráfico 7-3:** Evaluación de necrosis en la corona causado por *Fusarium solani*

Realizado por: Guerrero, A., 2021.

En diferentes investigaciones realizadas sobre agentes fitopatógenos asociados al cultivo de mora no se ha identificado *Fusarium solani* sin embargo en esta investigación se reporta a *Fusarium solani* como agente causal del marchitamiento. Investigaciones realizadas en Ecuador, Pakistán, España, Costa Rica, Cuba y México han demostrado la patogenicidad de *F. solani* en plantas de frutilla, garbanzo y clavel. Cuyas investigaciones permitieron reportar por primera vez a *Fusarium solani* como agente causal del amarillamiento y marchitamiento del follaje, también los tejidos vasculares y corticales internos de las coronas de las plantas mostraron una decoloración de naranja a marrón (Camacho, 2012; Duarte et al., 2016; Chinchilla et al., 2019; Pastrana et al., 2014; Núñez, 2017). Los síntomas que se identificaron en las plantas inoculadas del ensayo presentaron características similares en su mayoría como: un amarillamiento progresivo del área foliar y necrosis de las hojas y los tejidos internos de la corona con una coloración marrón.





**Gráfico 8-3:** Curva del progreso de la enfermedad según el método de inoculación de los agentes fúngicos obtenidos (*F. oxysporum*, *F. solani* y *F. redolens*.) de plantas de mora en invernadero.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

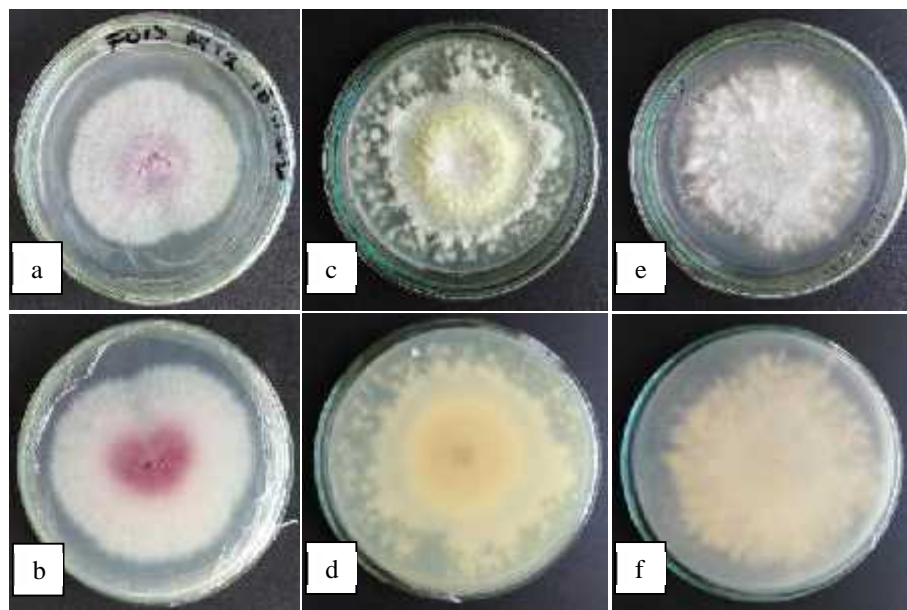
Al inocular las plantas de mora mediante el método de corte de raíz más inmersión y el método de inyección sustrato con *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*; ambos métodos causaron una necrosis de los folíolos en el 100% de las plantas inoculadas a los 16 días después de la inoculación, los primeros síntomas se observaron a los 2 días de la inoculación presentado un amarillamiento del área foliar. Las plantas inoculadas con *Fusarium redolens* por ambos métodos de inoculación causaron una necrosis de los folíolos a los 14 días después de la inoculación, los primeros síntomas en observarse fueron a los 2 días de la inoculación presentado un amarillamiento del área foliar.

Las plantas de mora inoculadas con *Fusarium oxysporum*, *Fusarium redolens* y *Fusarium solani* con distintos métodos de inoculación, no tuvieron diferencias significativas entre los dos métodos utilizados demostrando que las especies de *Fusarium* tienen la capacidad de infectar ya sea con la presencia o ausencia de daño al sistema radicular, además se observó que los daños causados al sistema foliar como clorosis y amarillamiento generalizado y necrosis de la corona no tuvieron diferencias entre las especies inoculadas. Estos resultados confirman que las plantas infectadas por *Fusarium* muestran una necrosis y marchitamiento foliar debido al daño al sistema vascular del hospedante. Según (Agris, 2005) el marchitamiento ocurre como consecuencia del bloqueo de los haces vasculares de la planta por la producción de esporas; la destrucción del sistema vascular

por acción de enzimas; la producción de toxinas, fenoles y polisacáridos por parte del hongo y el efecto de la formación de tilosas daños que se inician en el sistema radicular mediante se desarrollan nuevos pelos radiculares o bien a través de heridas realizadas durante diferentes labores culturales.

### 3.2.5 Re-aislamiento de especies fúngicas inoculadas

Las especies de *Fusarium* inoculadas en plantas de mora sanas se aisló siguiendo el protocolo establecido para el aislamiento de hongos filamentosos asociados al sistema radicular en plantas de mora con síntomas de marchitez colectadas en campo. La caracterización morfológica y cultural de los aislados obtenidos se compararon con los caracteres identificados previamente como *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. solani*, estas estructuras fueron idénticas en ambos casos. Por tal motivo, se cumplen con los postulados de Koch.



**Figura 13-3:** a, b-) anverso y reverso de *F. oxysporum* crecidas en PDA, c, d-) anverso y reverso de *F. solani* crecidas en PDA, e, f-) anverso y reverso de *F. redolens* crecidas en PDA.

**Realizado por:** Guerrero, A., 2021.

## CONCLUSIONES

- Se identificó al género *Fusarium* como hongos filamentosos asociados al marchitamiento y necrosis de la corona del cultivo de mora
- Los aislados fúngicos asociados a marchitamiento de corona de mora obtenidos se identificaron mediante caracteres culturales, morfológicos y moleculares como *F. oxysporum* y *F. solani*, y *F. redolens*.
- El agente causal del marchitamiento de corona en plantas de mora fue aislado e identificado como *F. oxysporum* y *F. solani*, y *F. redolens*. Hongos pertenecientes a especies de *F. solani* y *F. redolens* se reporta por primera vez en el Ecuador en el cultivo de mora.

## RECOMENDACIONES

- Realizar estudios para evaluar diferentes medidas de control de *F. oxysporum*, *F. redolens*, *F. solani* como control biológico y control químico.
- Utilizar regiones como ITS, TEF y IGS para la caracterización molecular cada especie de *Fusarium* spp.
- Repetir este estudio en diferentes cantones de Chimborazo y en diferentes provincias productoras de mora a nivel nacional en donde se presenten síntomas asociados a pudrición de la corona, así como a diferentes variedades de mora para determinar la presencia o ausencia de resistencia a diferentes especies de *Fusarium* spp. identificadas.

## GLOSARIO

**Aislado:** Cepa o población 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 sigue para la obtención de un hongo u otro organismo en cultivo puro (Ulloa & Hanlin, 2006: p.14).

**Algodonoso:** Con pelos largos, blancos y suaves, como es algodón (Ulloa & Hanlin, 2006, p.16).

**Ascomicetes:** El grupo más grande de hongos que se caracteriza por formar ascas (Ulloa & Hanlin, 2006, p.42).

**Ascospora:** *Ascomicetes*. Espora sexual haploide que se forma en el interior de un asca, usualmente como resultado de meiosis (Ulloa & Hanlin, 2006, p.42)

**Aseptado:** septado, dividido que posee paredes transversales o septos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.42)

**Carácter:** Rasgo o característica distintiva y variable de un taxón determinado (Ulloa & Hanlin, 2006, p.81).

**Clamidosporas:** Espora de origen asexual, recubierta por una pared celular recia y de tipo perdurable, que funciona como espora de resistencia o latencia (Ulloa & Hanlin, 2006, p.105).

**Colonia:** Grupo de individuos de la misma especie que viven conjuntamente. En los hongos, el término se refiere generalmente a la masa de hifas o células individuales que proliferan desde un punto central para formar una entidad con las características típicas de la especie (Ulloa & Hanlin, 2006, p.113).

**Conidio:** Espora asexual nucleada, inmóvil, que generalmente se forma en el ápice o a un lado de una célula esporógena (conidiógena) especializada (Ulloa & Hanlin, 2006, p.120).

**Conidióforo:** Hifa, simple o ramificada, que está morfológica y/o fisiológicamente diferenciada de una hifa somática para producir y portar conidios (Ulloa & Hanlin, 2006, p.121).

**Cultivo:** Acción y efecto de hacer crecer organismos en medios de cultivo apropiados, en el laboratorio, donde se transfieren a otros medios por inoculación o siembra (Ulloa & Hanlin, 2006, p.140).

**Elipsoide:** Se dice de un cuerpo sólido que forma una elipse en el plano longitudinal y un círculo en corte transversal (Ulloa & Hanlin, 2006, p.173).

**Esclerocio:** Estructura endurecida compuesta de tejido fúngico que resiste condiciones desfavorables del medio (Ulloa & Hanlin, 2006, p.192).

**Espora:** Pequeña unidad de propagación, unicelular o multicelular, asexual o sexual, móvil o inmóvil, que es capaz de originar a un nuevo individuo (Ulloa & Hanlin, 2006, p.202).

**Fenotipo:** Tipo de un organismo en cuanto a sus caracteres sensibles, apreciables directamente por nuestros sentidos, que son producidos por la interacción del genotipo con el medio ambiente (Ulloa & Hanlin, 2006, p.234).

**Fiálide:** Tipo de célula conidiógena, de forma de botella, que produce conidios blásticos en sucesión basípeta (Ulloa & Hanlin, 2006, p.236).

**Filamentoso:** Compuesto de filamentos, como el micelio de la mayor parte de los hongos verdaderos; con apariencia de filamento, como las hifas de los hongos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.238).

**Filiforme:** De forma de hilo, fino y delgado, como una fibrilla de lino (Ulloa & Hanlin, 2006, p.238).

**Filogenia:** Historia de un tipo de organismo; evolución a través del tiempo de un grupo de organismos relacionados genéticamente (Ulloa & Hanlin, 2006, p.240).

**Fungoso:** Perteneciente o relativo a los hongos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.255).

**Hialino:** Transparente e incoloro, como si fuera de cristal, o por lo menos diáfano (Ulloa & Hanlin, 2006, p.285).

**Hifa:** Filamento tubular que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.286).

**Hospedante:** *Biología; Micología.* Organismo (una planta, un animal o un hongo) del cual un parásito obtiene su alimento, ya sea interna o externamente (Ulloa & Hanlin, 2006, p.307).

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

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

**Macroconidio:** Conidio o espora de reproducción asexual, que se distingue del microconidio tanto por su mayor tamaño como por su multicelular (Ulloa & Hanlin, 2006, p.352).

**Medio de cultivo:** Sistema o sustrato nutritivo que se utiliza para el cultivo artificial de hongos y otros microorganismos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.357).

**Micelio:** Conjunto o masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo o talo de un hongo (Ulloa & Hanlin, 2006, p.364).

**Microconidio:** Conidio pequeño, generalmente unicelular (Ulloa & Hanlin, 2006, p.376).

**Necrosis:** Muerte parcial o total de células o tejidos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.396).

**Picnidio:** Cuerpo fructífero asexual, generalmente esférico u obpiriforme, con una cavidad interna forrada con conidióforos (Ulloa & Hanlin, 2006, p.436).

**Reniforme:** De forma de riñón, o de contorno parecido al de un riñón (Ulloa & Hanlin, 2006; p.482).

## BIBLIOGRAFÍA

**AGHIGHI, Sonia; et al.** “*Phytophthora bilorbang* sp. nov., a new species associated with the decline of *Rubus anglocandicans* (European blackberry) in Western Australia”. *European Journal of Plant Pathology* [en línea], 2012, (Australia) 133 (4), pp. 841 - 855. [Consultada: 20 enero 2021]. DOI 10.1007/s10658-012-0006-5. Disponible en: <https://link.springer.com/article/>

**AGRIOS, George N.** *Plant Pathology*. 1<sup>a</sup> ed. United States of America: Elsevier Academic Press, 2005. ISBN 0-12-044565-4.

**ALFENAS, Acelino; & MAFIA, Reginaldo.** *Métodos em fitopatología*. 2<sup>a</sup> ed. Minas Gerais-Brasil: UFV. 2016. ISBN 978-85-7269-559-6.

**BAAYEN, R.P.; et al.** “*Fusarium redolens* f.sp. *asparagi*, causal agent of asparagus root rot, crown rot and spear rot”. *European Journal of Plant Pathology* [en línea], 2000, (Holanda) 106 (9), pp. 907 - 912. [Consulta: 22 enero 2021]. ISSN 0929-1873 Disponible en: <https://link.springer.com/article/>

**BALLESTERO, Sandra; et al.** “Aspectos biológicos y taxonómicos de *Rubus ellipticus* “Mora Amarilla silvestre”, un recurso fitogenético con potencia en Costa Rica”. *Tecnología en Marcha* [en línea]. 2004, (Costa Rica) 17 (1), pp. 18 - 21. [Consulta: 22 enero 2021]. ISSN 0379-3962. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/>

**BALMAS, Virgilio; et al.** *Hints for the morphological identification of some of the most common toxigenic species of Fusarium*. Viale-Italia: Dipartimento di Agraria, Università degli Studi di Sassari.; Department of Biological & Environmental Sciences, college of Arts and Sciences, Qatar University. Doha. Qatar. NPRP grant. 2016.

**BIENAPFL, JC.; et al.** “First Report of *Fusarium redolens* Causing Root Rot of Soybean in Minnesota”. *Plant Disease* [en línea], 2010, Minnesota 98 (8), pp. 1069 - 1069. [Consulta: 30 enero 2021]. ISSN 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PDIS-94-8-1069B>

**CAMACHO LÓPEZ, María Dolores.** Identificación y variabilidad genética de *Fusarium* spp. Aisladas de clavel (*Dianthus caryophyllus*) en Baja California, México [en línea] (Trabajo de titulación) (Posgrado). Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada,

Microbiología México – Baja California 2012. p.1. [Consulta: 2021-01-28]. Disponible en: <https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/2498/1/192101.pdf>

**CARBONE, Ignazio; & KOHN, Linda.** “A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes”. *Micología* [en línea], 1999, 91 (3), pp. 553-556. [Consulta: 12 enero 2021]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/>

**CÁRDENAS CASTILLO, Yesenia Yennifer.** EVALUACIÓN AGRONÓMICA Y FENOLOGÍA DE DOS CLONES DE MORA SIN ESPINAS (*Rubus glaucus* Benth) PARA DETERMINAR SU POTENCIAL COMERCIAL. TUMBACO, ECUADOR (Trabajo de titulación) (Ingeniería). [en línea] Universidad Central del Ecuador, Ciencias Agrícolas, Ingeniería Agronómica. (Tumbaco-Ecuador). 2013. p. 15. [Consulta: 20 noviembre 2020]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1005/1/T-UCE-0004-7.pdf>

**CHANCUSIG, Edwin.** Cultivo de mora de castilla *Rubus glaucus*, S.f. [Consulta: 2 enero 2021]. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos-pdf/cultivo-mora-castilla/cultivo-mora-castilla.pdf>

**CHEHRI, Khosrow; et al.** “Morphological and Phylogenetic Analysis of *Fusarium solani* Species Complex in Malaysia”. *Microbial Ecology* [en línea], 2015, (Malaysia) 69 (3), pp. 457 – 471. [Consulta: 26 enero 2021]. DOI 10.1007/s00248-014-0494-2. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00248-014-0494-2#citeas>

**CHINCHILLA SALAZAR, Gabriela; et al.** “IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y MORFOLÓGICA DE LAS ESPECIES DE *Fusarium* spp., ASOCIADAS AL CULTIVO DE PIMIENTA NEGRA (*Piper nigrum*) EN SARAPIQUÍ Y GUATUSO EN COSTA RICA”. *Agronomía Costarricense* [en línea], 2020, (Costa Rica) 44 (2), pp. 2-30. [Consulta: 17 enero 2021]. ISSN 0377-9424. Disponible en: [http://www.mag.go.cr/rev\\_agr/v44n02\\_009.pdf](http://www.mag.go.cr/rev_agr/v44n02_009.pdf)

**CONTRERAS, Miguel; et al.** “First report of *Lasiodiplodia* on blackberry plants (*Rubus* subgenus *Eubatus*) in the Michoacan state, Mexico”. *Mexican Journal of Phytopathology* [en línea]. 2019, (México) 37 (3), pp. 479 – 485. [Consulta 17 enero 2021]. ISSN 2007-8080. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/>

**DELGADO ORELLANA, Freddy Francisco.** Manejo orgánico del cultivo de mora (*Rubus* sp.) [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniero), Universidad de Cuenca, Facultad de Ciencias



Agropecuarias, Ingeniero Agrónomo. Cuenca – Ecuador. 2012. p.1. [Consulta: 2021-01-28].  
Disponible en: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3074/1/mag129.pdf>

**DUARTE, Yanisia; et al.** “Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba”. Revista de protección vegetal [en línea], 2016, (Cuba) 31 (3), pp. 173 – 183. [Consulta: 18 enero 2021]. ISSN 2224-4697. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522016000300004](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522016000300004)

**DUCAN, J.M.; & KENNEDY, Diana.** “The efecto of waterlogging on *Phytophthora root rot* of red raspberry”. Plant Pathology [en línea], 1989, (Escocia) 38 (2), pp. 161 – 168. ISSN 1365-3059. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/>

**ESMAEILI TAHERI, Ahmad; et al.** “First report of *Fusarium redolens* from Saskatchewan and its comparative pathogenicity”. Canadian Journal of Plant Pathology [en línea], 2011, (Canadá) 33 (4), pp. 559 – 564. [Consulta: 26 enero 2021]. DOI 10.1080 / 07060661.2011.620631 . Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07060661.2011.620631>

**FORERO REYES, Consuelo M.; et al.** “Evaluación de la capacidad patogénica de *Fusarium* spp. En modelos vegetales y murino”. Revista Argentina de Microbiología [en línea], 2017, (Argentina) 50 (1), pp. 90 – 96. [Consulta: 29 enero 2021]. ISSN 0325-7541. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0325754117300962#bib0105>

**F. DE LA ROTTA, María Clemencia.** *ENFERMEDADES DE LA MORA DE CASTILLA*. 1ª. Bogotá, DC Colombia: Produmedios, 2001, pp. 5-32.

**GALARZA, D.; et al.** *EL cultivo de mora en el Ecuador*. [en línea]. Quito-Ecuador: INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Programa Nacional de Fruticultura, 2016. [Consultado: 18 enero 2021]. Disponible en: <http://repositorio.iniap.gob.ec/>

**GARGOURI, Samia.** “An endophyte of *Macrochloa tenacissima* (esparto or needle grass) from Tunisia is a novel species in the *Fusarium redolens* species complex”. Mycologia [en línea], 2020, (Túnez) 112 (4), pp. 792-807. [Consulta 30 diciembre 2020]. ISSN 1557-2536. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00275514.2020.1767493?journalCode=umyc20>

**GOBIERNO AUTÓNOMO DESENTRALIZADO DE LA PROVINCIA DE CHIMBORAZO (GADPCH).** *Plan de Desarrollo y Ordenamiento Territorial (PDOT)* [en línea]. Riobamba-Ecuador: 2015. pp. 126-127. [Consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: [http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL\\_SNI/data\\_sigad\\_plus/sigadplusdocumentofinal/0660000280001\\_PDyOT%20FINAL%20-%20160516%2013y50\\_16-05-2016\\_19-06-53.pdf](http://app.sni.gob.ec/sni-link/sni/PORTAL_SNI/data_sigad_plus/sigadplusdocumentofinal/0660000280001_PDyOT%20FINAL%20-%20160516%2013y50_16-05-2016_19-06-53.pdf)

**GORDON, T.R.; et al.** “First report of a wilt disease of blackberry caused by fusarium oxysporum in California”. *Plant Disease* [en línea], 2016, (Canada) 100(5), pp. 1018. [Consulta: 13 enero 2021]. ISSN 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-07-15-0784-PDN>

**HAAS, Doris; et al.** “Culturable fungi in potting soils and compost”. *Medical Mycology* [en línea], 2016, (Austria) 58 (8), pp. 825-34. [Consulta 23 enero 2021]. DOI 10.1093/mmy/myw047. Disponible en: <https://academic.oup.com/mmy/article/54/8/825/2579263>

**HERNÁNDEZ CRUZ, A.; et al.** “Evaluation of full-season programs for the management of Fusarium wilt of blackberry caused by a new lineage of the *Fusarium oxysporum* species complex”. *Crop Protection* [en línea], 2020, (México) 134, pp. 105167. [Consulta: 28 diciembre 2020]. ISSN 0261-2194. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0261219420301009>

**INSTITUTO COLOMBIANO AGROPECUARIO (ICA),** *Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (Rubus glaucus benth)* [en línea]. Bogotá-Colombia: Produmedios, 2011. [Consulta: 12 diciembre 2020]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/b7e061eb-ebd3-4f80-9518-c771712405eb/-nbsp3bmanejo-fitosanitario-delcultivo-de-la-mora.aspx>

**JIMÉNEZ FERNÁNDEZ, Daniel; et al.** “Molecular and pathogenic characterization of Fusarium redolens, a new causal agent of Fusarium yellows in Chickpea”. *Plant Disease* [en línea], 2011, (España) 95 (7), pp. 860-870. [Consulta: 12 diciembre 2020]. ISSN 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-12-10-0946>

**KUMAR, S.; et al.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* [en línea], 2016, 33 (7), pp. 1870 - 1874. [Consulta: 26 enero 2021]. Disponible en: <https://academic.oup.com/>

**LESLIE, John; & SUMMERELL, Brett.** *The Fusarium Laboratory Manual*. 1<sup>a</sup> ed. United States of America: Blackwell Publishing, 2006.

**LOMBARD, L.; et al.** “Epitypification of *Fusarium oxysporum* – Clearing the taxonomic chaos”. *Personia* [en línea], 2019, 43, pp. 1-47. [Consulta: 25 enero 2021]. ISSN 1878-9080. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7085860/>

**MARTÍN, RR.; et al.** *Compendium of Raspberry and Blackberry Diseases and Pests*. [en línea]. 2<sup>a</sup> ed. Minnesota-EE.UU.: The American Phytopathological Society, 2017. [Consulta: 25 diciembre 2020]. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/book/10.1094/9780890545720>

**MARTÍNEZ MINUCHE, Denisse Gabriela.** Identificación de hongos fitopatógenos relacionados con la marchitez de mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en la provincia de Tungurahua mediante microscopía óptica y PCR [en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad de las Fuerzas Armadas, Departamento de Ciencias de la vida y de la Agricultura, Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí-Ecuador. 2014. pp. 1. [Consulta: 10 diciembre 2020]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1370/1/iniapsctM385i.pdf>

**MERAZ CARRAZCO, H.; et al.** “Pathogenic variability , host range and sources of primary inoculum of *Fusarium oxysporum* causing blackberry wilting in Michoacán Mexico” División del Caribe de APS [en línea], 2018, (México), pp. 1. [Consulta: enero 2021] DOI 10.13140/RG.2.2.18970.54723. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/323748100\\_Pathogenic\\_variability\\_host\\_range\\_and\\_sources\\_of\\_primary\\_inoculum\\_of\\_Fusarium\\_oxysporum\\_causing\\_blackberry\\_wilting\\_in\\_Michoacan\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/323748100_Pathogenic_variability_host_range_and_sources_of_primary_inoculum_of_Fusarium_oxysporum_causing_blackberry_wilting_in_Michoacan_Mexico)

**MERCHÁN, Maritza Angarita; et al.** “Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura”. *Scielo* [en línea], 2017, (Cuba) 16 (5). [Consulta 10 noviembre 2020]. ISSN 1729-519X. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1729-519X2017000500012](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000500012)

**MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA (MAG).** Boletín situacional de la mora. [en línea]. Ecuador: 2019. pp. 3-4. [Consulta: 25 noviembre 2020]. Disponible en: <http://sipa.agricultura.gob.ec/index.php/frutas/mora>

**MONTOYA M., Carlos Aníbal; et al.** *Principales enfermedades y plagas en el cultivo de la mora* [en línea]. Quinchía-Colombia: 1997. pp. 7-16. [Consulta: 16 diciembre 2020]. Disponible en:

[https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/1162/39897\\_24381.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/1162/39897_24381.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

**NÚÑEZ ZAMBRANO, Andrés Mauricio.** Aislamiento e identificación molecular de agentes fúngicos de la frutilla (*Fragaria* sp.) de Pichincha-Ecuador (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad San Francisco de Quito (USFQ). Ciencias Biológicas y Ambientales, Procesos biológicos. (Quito-Ecuador). 2017. pp. 32-58 [Consulta: 12 enero 2021]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/147369921.pdf>

**PARIAUD, B.; et al.** “Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens”. *Plant Pathology* [en línea], 2009, (Canada) 58(3), pp. 409-424. [Consulta: 12 enero 2021]. DOI 10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>

**PASTRANA, Ana; et al.** “First report of *Fusarium solani* causing crown and root rot on strawberry crops in Southwestern Spain”. *Plant Disease* [en línea], 2013, (España) 98 (1), pp. 161-161. [Consta: 3 diciembre 2020]. ISSN 0191-2917. Disponible en: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-3059.2009.02039.x>

**PASTRANA, A.M.; et al.** “*Fusarium oxysporum* f. sp. *mori*, a New Forma Specialis Causing Fusarium Wilt of Blackberry”. *APS Publications* [en línea], 2017, (México) 101 (2), pp. 2066-2072. [Consulta: 12 enero 2021]. ISSN 0191-2917. Disponible en: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-03-17-0428-RE>

**PROAÑO AVELLAN, Ida Natasha.** *Identificación de hongos fitopatógenos relacionados con la marchitez de la mora de castilla (Rubus glaucus Benth) en la provincia de Bolívar mediante microscopía óptica y PCR* (Trabajo de titulación) (Ingeniería). [en línea] Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE), Ciencias de la Vida y de la Agricultura, Ingeniería en Biotecnología. Sangolquí-Ecuador. 2014. p. 1. [Consulta 30 diciembre 2020]. Disponible en: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/1390/1/iniapsctP962id.pdf>

**REBOLLAR ALTIVER, Ángel & SILVA ROJAS, Hilda V.** *La Marchitez de la Zarzamora: Diagnóstico, Epidemiología y Manejo Integrado* [en línea]. Texcoco Chapingo- México: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO, 2020. [Consulta: 10 diciembre 2020]. Disponible en:

[https://www.researchgate.net/publication/349142322\\_La\\_Marchitez\\_de\\_la\\_Zarzamora\\_Diagnostico\\_Epidemiologia\\_y\\_Manejo\\_Integrado\\_Fusarium\\_Wilt\\_of\\_Blackberry\\_Diagnosis\\_Epidemiology\\_and\\_Integrated\\_Management](https://www.researchgate.net/publication/349142322_La_Marchitez_de_la_Zarzamora_Diagnostico_Epidemiologia_y_Manejo_Integrado_Fusarium_Wilt_of_Blackberry_Diagnosis_Epidemiology_and_Integrated_Management)

**SÁNCHEZ, Jessica; et al.** “*Dactylonectria* and *Ilyonectria* species causing black foot disease of Andean Blackberry (*Rubus Glaucus* Benth) in Ecuador”. *Diversity* [en línea], 2019, (Ecuador) 11 (11), p. 218. [Consulta: 19 diciembre 2020]. ISSN 1424-2818. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1424-2818/11/11/218>

**STAMATAKIS, A.** RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics Applications* [en línea], 2014, 30 (9), pp. 1312 - 1313. [Consulta: 26 enero 2021]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

**TSUNEO, Watanabe.** *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*. 2<sup>a</sup> ed. London-New York-Washington, D.C.-Boca Raton.: CRC PRESS, 2002. [Consulta: 13 enero 2021]. Disponible en: <https://www.amazon.es/Pictorial-Atlas-Soil-Seed-Fungi/dp/0849311187>

**ULLOA, Miguel; & HANLIN, Richard.** *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología*. Minnesota-U.S.A.: The American Phytopathological Society, 2006. ISBN-13: 978-0-89054-3412, pp. 4-482.

**VAIDYA, G.; et al.** SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information . *Cladistics* [En línea], 2011, 27 (2), pp. 171-180.

[Consulta: 10 julio 2019]. Disponible en: <https://www.scirp.org/>

**WEBER, Roland & ENTROP, Alfred Peter.** “*Dactylonectria torresensis* as the Main Component of the Black Root Rot Complex of Strawberries and Raspberries in Northern Germany”. *Erwerbs-Obstbau* [en línea], 2017, (Germany) 59 (3), pp. 157-169. [Consulta: 2 diciembre 2020]. ISSN 0014-0309. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10341-017-0343-9#citeas>

**WHITE, T.; et al.** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetic. ResearchGate. 1990. [Consulta: 18 enero 2021]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/>

**ZHAO, Dong-Lin; et al.** “Anti-Phytopathogenic and Cytotoxic Activities of Crude Extracts and Secondary Metabolites of Marine-Derived Fungi”. *Marine Drugs* [en línea], 2018, (China) 16 (1), p. 36. [Consulta: 20 enero 2021]. ISSN1660-3397. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1660-3397/16/1/36>

## ANEXOS

### ANEXO A: PROTOCOLO EXTRACCIÓN DE ADN IDGEN.

- Tomar aproximadamente 50 mg de muestras en un tubo de 1,5 mL con tres perlas de vidrio, estériles, adicional 500  $\mu$ L de buffer de extracción (2,5 % w/v CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 100 mM Tris HCl (pH 8,0))y 2  $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol.
- Agitar / macerar muestra vigorosamente usando BeadBeater a velocidad máxima, 2 veces hasta que el tejido quede pulverizado.
- Incubar en baño María a 60 °C por 30 min, mezclar invirtiendo cada 10 min.
- Añadir 500  $\mu$ L de cloroformo, congelado y homogenizar en Vortex por 30 segundos. Dejar reposar unos minutos.
- Centrifugación a 14 500 xg 5 – 10 min.
- Tomar el sobrenadante cuidando no mezclar las fases, aproximadamente 400  $\mu$ L, y colocarlos en un nuevo tubo estéril de 1,5 mL.
- Añadir el sobrenadante un volumen igual al etanol absoluto frio, 150  $\mu$ L Acetato de sodio 3M y 300  $\mu$ L de etanol 70 % filtrado, para precipitar el ADN. Dejar -20 °C toda la noche.
- Centrifugación a 14 500 xg 14 – 17min y eliminar el sobrenadante.
- Realizar 2 lavados con etanol 70 %, usar aproximadamente 200  $\mu$ L. Pipetear y descartar el etanol por inversión.
- Secar el pellet durante 15 a 20 min, se puede usar la cámara de flujo laminar.
- Resuspender el pellet de ADN con 25  $\mu$ L de agua DEPC, añadir 1  $\mu$ L de RNAsa y dejar incubar 30 min a 37 °C.
- Almacenar las muestras a -20 °C hasta su posterior uso.
- Visualizar el ADN en un gel de agarosa al 1%, 90 V x 35 min o 100 V x 30 min (TBE)

**ANEXO B: VELOCIDAD DE CRECIMIENTO MICELIAL RADIAL (mm/hora) DE *F. oxysporum*, *F. redolens* y *F. solani* EN MEDIO DE CULTIVO PDA A 28°C.**

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
<i>F. oxysporum</i>	0	3.5	7.8	14	19.5	23.35	28.6	33.5
<i>F. redolens</i>	0	2.5	6.15	10.25	14.4	17.25	22.25	22.25
<i>F. solani</i>	0	3.2	7.72	12.15	16	19.3	23.42	25.8

Realizado por: Guerrero, A., 2021.

**ANEXO C: INSTALACIÓN DE PLANTAS EN INVERNADERO**



Realizado por: Guerrero, A., 2021.

**ANEXO D: PREPARACIÓN DE INOCULO**



Realizado por: Guerrero, A., 2021.



## ANEXO E: INOCULACIÓN DE AISLADOS FÚNGICOS

### 1. Inyección sustrato



Realizado por: Guerrero, A., 2021.

### 2. Inmersión más daño al sistema radicular



Realizado por: Guerrero, A., 2021.

## ANEXO F: PLANTAS DE MORA INOCULADAS



Realizado por: Guerrero, A., 2021.