



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN
DE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS CON SÍNTOMAS
DECÁNCER EN PLANTACIONES DE PITAHAYA (*Hylocereus*
spp.)”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR:

JOHANNA BEATRIZ YUMBLA CRESPO

Riobamba – Ecuador

2022



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

**“AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN
DE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS CON SÍNTOMAS
DECÁNCER EN PLANTACIONES DE PITAHAYA (*Hylocereus*
spp.)”**

Trabajo de Integración Curricular

Tipo: Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERO AGRÓNOMO

AUTOR: JOHANNA BEATRIZ YUMBLA CRESPO

DIRECTOR: Ing. FERNANDO JOSÉ RIVAS FIGUEROA PhD.

Riobamba – Ecuador

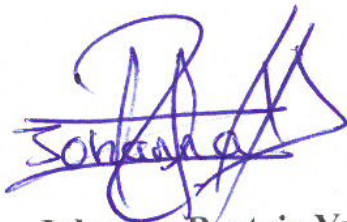
2022

© 2022, Johanna Beatriz Yumbla Crespo

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 de Autor.

Yo, JOHANNA BEATRIZ YUMBLA CRESPO, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular 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 autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este Trabajo de Integración Curricular; el patrimonio intelectual pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

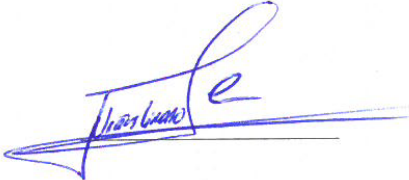

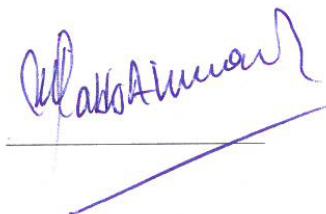


Johanna Beatriz Yumbla Crespo

030231032-1

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO
FACULTAD DE RECURSOS NATURALES
CARRERA AGRONOMÍA

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FILAMENTOSOS ASOCIADOS CON SÍNTOMAS DE CÁNCER EN PLANTACIONES DE PITAHAYA (*Hylocereus spp.*)**, realizado por la señorita: **JOHANNA BEATRIZ YUMBLA CRESPO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	FIRMA	FECHA
Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova PhD. PRESIDENTE DEL TRIBUNAL		2022-06-01
Ing. Fernando José Rivas Figueroa PhD. DIRECTOR DE TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR		2022-06-01
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero PhD. MIEMBRO DEL TRIBUNAL		2022-06-01

DEDICATORIA

Este trabajo va dedicado a la memoria de mis padres, IRENE BEATRIZ CRESPO ESPOINOZA y SEGUNDO ALFONSO YUMBLA JACHERO, quienes me formaron con buenos hábitos y valores, y que desde el cielo me iluminan para seguir adelante y no desmayar, a mí hijo DAMIAN ALEXANDER NAULA YUMBLA, que ha estado a mi lado en todo este proceso siendo mi fuente de motivación y superación, a mis hermanos IRENE, IVAN, CRISTIAN, VALERIA y STALYN YUMBLA CRESPO, quienes se mostraron fuertes junto a mí para poder culminar esta etapa.

Johanna

AGRADECIMIENTO

Al concluir con esta etapa quiero extender un profundo agradecimiento a quienes me ayudaron para poder llegar hasta aquí, aquellos que caminaron junto a mi y fueron fuente de apoyo, inspiración y fortaleza. Esta mención en especial para Dios, mis padres en el cielo, mis hermanos, y mi hijo. Mi gratitud también a la Escuela de Ingeniería Agronómica de la ESPOCH, a los docentes, a mi asesor Dr. Pablo Álvarez PhD., quienes con sus enseñanzas constituyen la base de mi vida profesional. Gracias infinitas a todos.

Johanna

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
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 la pitahaya	4
<i>1.1.1. Origen de la Pitahaya</i>	<i>4</i>
<i>1.1.2. La pitahaya en Ecuador</i>	<i>4</i>
<i>1.1.3. Taxonomía de la Pitahaya.....</i>	<i>4</i>
1.2. Requerimientos edafoclimáticos.....	5
1.3. Morfología de la Pitahaya.....	5
1.4. Producción de la pitahaya.....	6
<i>1.4.1. Cultivo de la Pitahaya.....</i>	<i>6</i>
<i>1.4.1.1. Propagación</i>	<i>6</i>
<i>1.4.1.2. Plantación.....</i>	<i>6</i>
<i>1.4.1.3. Control de crecimiento y desarrollo.....</i>	<i>6</i>
<i>1.4.1.4. Fertilización y técnica de riego</i>	<i>7</i>
1.5. Principales plagas y enfermedades.....	7
<i>1.5.1. Las plagas que puede afectar a la pitahaya</i>	<i>8</i>
<i>1.5.2. Las enfermedades que puede afectar a la pitahaya.....</i>	<i>8</i>
<i>1.5.3. Manejo integrado de plagas y enfermedades.....</i>	<i>10</i>
CAPÍTULO II	
2. MARCO METODOLÓGICO	11
2.1. Descripción Geográfica.	11
<i>2.1.1. Localidad.....</i>	<i>11</i>

2.1.2.	<i>Ubicación geográfica</i>	11
2.2.	Materiales y equipos	11
2.2.1.	<i>Material biológico</i>	11
2.2.2.	<i>Medios de cultivo</i>	12
2.2.3.	<i>Reactivos</i>	12
2.2.4.	<i>Equipos de laboratorio</i>	12
2.2.5.	<i>Materiales de laboratorio</i>	12
2.2.6.	<i>Insumos de laboratorio</i>	13
2.2.7.	<i>Materiales y equipos de campo</i>	13
2.2.8.	<i>Materiales y equipos de escritorio</i>	13
2.3.	Métodos	13
2.3.1.	<i>Colecta del material vegetal</i>	13
2.3.2.	<i>Aislamiento del patógeno</i>	14
2.3.3.	<i>Caracterización cultural y morfológica</i>	14
2.3.3.1.	<i>Caracterización cultural</i>	14
2.3.3.2.	<i>Caracterización morfológica</i>	14
2.3.4.	<i>Caracterización molecular</i>	15
2.3.4.1.	<i>Extracción del micelio</i>	15
2.3.4.2.	<i>Maceración del micelio</i>	15
2.3.4.3.	<i>Extracción de ADN</i>	15
2.3.4.4.	<i>PCR</i>	16
2.3.4.5.	<i>Electroforesis</i>	17
2.3.5.	<i>Caracterización de la patogenicidad</i>	17
2.3.5.1.	<i>Diseño del ensayo</i>	18
2.3.5.2.	<i>Reaislamiento de agentes fúngicos</i>	19
CAPÍTULO III		
3.	MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS	20
3.1.	Aislamiento de hongos fitopatógenos asociados al cáncer de pitahaya	20
3.1.1.	<i>Localidades de las muestras colectadas</i>	20
3.1.2.	<i>Síntomas observados en las muestras colectadas</i>	21
3.2.	Caracterización morfológica y cultural de los agentes fúngicos obtenidos de los cultivos de pitahaya	27
3.2.1.	<i>Lasiodiplodia sp.</i>	27
3.2.2.	<i>Fusarium sp.</i>	29
3.2.3.	<i>Diaporthe sp.</i>	30

3.2.4.	<i>Daldinia sp.</i>	31
3.3.	Caracterización molecular de los aislados fúngicos obtenidos.	33
3.4.	Caracterización de la patogenicidad de los aislados fúngicos obtenidos.	37
3.4.1.	<i>Sintomatología obtenida con cada una de las cepas inoculadas.</i>	38
	CONCLUSIONES.....	46
	RECOMENDACIONES.....	48
	GLOSARIO DE TÉRMINOS	
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1:	Taxonomía de la Pitahaya	4
Tabla 2-1:	Plagas de la Pitahaya	8
Tabla 3-1:	Enfermedades de la Pitahaya.....	8
Tabla 4-1:	Manejo Integrado de enfermedades y plagas.	10
Tabla 5-2:	Primes para las reacciones de PCR.	16
Tabla 6-2:	Tratamientos establecidos para las pruebas de patogenicidad en plantas de pitahaya.	18
Tabla 7-3:	Ubicación geográfica.....	20
Tabla 8-3:	Características culturales de los aislados del cultivo de pitahaya.	32
Tabla 9-3:	Identificación morfológica de los aislados obtenidos del cultivo de pitahaya de acuerdo con las medidas de largo y ancho de los conidios.	33
Tabla 10-3:	Identificación molecular de los aislados obtenidos, alineados con las especies mantenidas en la base de datos BLAST.	35
Tabla 11-3:	Caracterización de la patogenicidad de los aislados inoculados.	37
Tabla 12-3:	Test de Tukey al 0,05 del crecimiento de las lesiones de los diferentes aislados inoculados con herida.....	45

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1:	Estructura Pitahaya.....	5
Figura 2-3:	Muestra PLYPaI.1. Sintomatología en cladodios, (a) manchas blanquecinas, (b) manchas blanquecinas con puntuaciones negras.	21
Figura 3-3:	Muestra MX2.5, (a) Manchas circulares anaranjadas con oscurecimiento en el centro y desprendimiento del tejido.	21
Figura 4-3:	Muestra MX1.11. (a) Manchas alargadas anaranjadas con los bordes blancos, (b) manchas blancas con los bordes anaranjados y puntuaciones negras.	22
Figura 5-3:	Muestra PJNa.6, (a) Pequeñas lesiones color naranja. (b) Bordes del cladodio de color blanquecino con puntuaciones negras.	22
Figura 6-3:	Muestra PGL2.1,(a) Coloraciones blanquecinas con oscurecimiento en el centro. (b) manchas blancas con bordes anaranjados y puntuaciones negras....	23
Figura 7-3:	Muestra GR.16, (a) Coloraciones blanquecinas al borde del cladodio. (b) lesiones blancas con bordes anaranjados y puntuaciones negras.	23
Figura 8-3:	Muestra HL.11, (a) Manchas circulares de color blanco con bordes necróticos. (b) manchas blanquecinas con puntuaciones negras.	24
Figura 9-3:	Muestra MX1.2 R3, (a) Pequeñas lesiones de color naranja, gris y blancas. (b) manchas anaranjadas, y blancas con puntuaciones negras.	24
Figura 10-3:	Muestra CS9, (a) Manchas alargadas blancas con bordes anaranjados. (b) manchas blanquecinas con bordes anaranjados y ligeras puntuaciones negras.	25
Figura 11-3:	Muestra KC3, (a) Manchas circulares de color marrón. (b) Manchas circulares de color marrón con un halo clorótico	25
Figura 12-3:	Muestra M3R2, (a) Manchas grises con bordes blancos. (b) Manchas oscuras.	26
Figura 13-3:	Características culturales de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> crecido en medio de cultivo PDA a 25 °C ± 1 e incubados durante 5 días (a-b).....	27
Figura 14-3:	Características culturales de <i>Fusarium oxysporum</i> en medio de cultivo PDA incubados a 25 oC ± 1 durante 8 días (a, b)..	29
Figura 15-3:	Características morfológicas de <i>Diaporthe</i> sp. Crecido en medio de cultivo PDA a 25 °C ± 1 e incubados durante 8 días (a, b).	30
Figura 16-3:	Características culturales de <i>Daldinia</i> sp. Crecido en medio PDA a 25 °C ± 1 e incubados durante 8 días. (a, b).	31
Figura 17-3:	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (PLYPaI.1). Cladodio inoculado por el método con herida.	39

Figura 18-3: <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MX2.5) Cladodio inoculado por el método con herida.	39
Figura 19-3: <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (MX1.11) Cladodio inoculado por el método con herida.....	40
Figura 20-3: <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (PJNa.6). Cladodio inoculado por el método con herida.....	40
Figura 21-3: <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (PGL2.1). Cladodio inoculado por el método con herida.....	41
Figura 22-3: <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (GR.16). Cladodio inoculado por el método con herida. -.....	41
Figura 23-3: <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (HL.11). Cladodio inoculado por el método con herida.....	42
Figura 24-3: <i>Fusarium oxysporum</i> (MX1.2 R3). Cladodio inoculado por el método con herida.....	42
Figura 25-3: <i>Diaporthe</i> sp. (KC3). Cladodio inoculado por el método con herida.....	43
Figura 26-3: <i>Diaporthe</i> sp. (M3R2). Cladodio inoculado por el método con herida. (a, b) Manchas de color café claro.....	43
Figura 27-3: <i>Daldinia</i> . (CS9). Cladodio inoculado por el método con herida. (a) Manchas de color café claro, (b) Manchas de color café con un borde blanquecino.	44

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Diámetro (mm/ semana) de las lesiones de los diferentes aislados inoculados con herida.	45
--	----

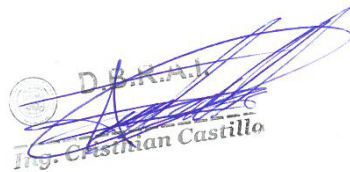
ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** RECOLECCION DE MUESTRAS EN LAS DIFERENTES LOCALIDADES DEL CANTON PEDRO VICENTE MALDONADO DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA.
- ANEXO B:** NÚMERO DE FINCAS MUESTREADAS Y SU UBICACIÓN GEOGRÁFICA.
- ANEXO C:** PREPARACIÓN DE CLADODIOS PARA LA INOCULACIÓN.
- ANEXO D:** INOCULACION DE DIFERENTES AISLADOS FUNGICOS EN PLANTAS DE PITAHYA.
- ANEXO E:** REGISTRO DE DATOS SEMANALES DE LAS HERIDAS DE LOS CLADODIOS EN EL INVERNADERO
- ANEXO F:** GELES REVELADOS DE LAS DIFERENTES MUESTRAS IDENTIFICADAS MOLECULARMENTE.

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue aislar, caracterizar e identificar hongos filamentosos asociados con síntomas de cáncer en cladodios de pitahaya (*Hylocereus* spp.) en el cantón Pedro Vicente Maldonado en la provincia de Pichincha. Las muestras fueron receptadas en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales (FRN) para su desinfección, siembra, aislamiento y obtención de cultivos puros de los microorganismos fúngicos aislados. En la caracterización morfológica y cultural se registraron caracteres como: color, anverso y reverso de la colonia, elevación del medio, forma del margen y tasa de crecimiento micelial (TCM). En la caracterización microscópica se registró el número de esporas y tamaño de las esporas. Para la caracterización molecular se realizó la extracción y maceración de micelio, extracción de Ácido desoxirribonucleico (ADN), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), electroforesis y secuenciación. La caracterización de la patogenicidad de los aislados fúngicos se realizó en el invernadero de la FRN en donde se inocularon cladodios sanos de pitahaya usando dos métodos: con herida y sin herida. Los hongos filamentosos identificados fueron: *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Daldinia* sp., y *Diaporthe* sp., mismos que fueron identificadas y caracterizadas cultural, morfológica y culturalmente. De las cepas inoculadas las que se pudieron recuperar en el reaslamiento fueron *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* y *Diaporthe* sp. cumpliendo así las pruebas de patogenicidad y demostrando el potencial de daño a nivel de cladodios en pitahaya. Este es el primer estudio sobre enfermedades a nivel del filoplano de la pitahaya en el Ecuador que reporta a *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum* y *Diaporthe* sp. como causantes de síntomas asociados al cáncer en este cultivo de creciente importancia en nuestro país.

Palabras clave: <CÁNCER>, <PITAHAYA (*Hylocereus* spp.)>, <*Lasiodiplodia theobromae*>, <*Diaporthe* sp. >, <*Fusarium* sp.>.


Ing. Cristian Castillo



1255-DBRA-UTP-202

ABSTRACT

The objective of this research work was to isolate, characterize, and identify filamentous fungi associated with cancer symptoms in pitahaya cladodes (*Hylocereus* spp.) in Pedro Vicente Maldonado canton, in Pichincha province. The samples were received at the Phytopathology laboratory of the Faculty of Natural Resources (*FRN*) for disinfection, seeding, isolation, and obtaining pure cultures of the isolated fungal microorganisms. In the morphological and cultural characterization, characters such as color, colony front and back, medium elevation, margin shape, and mycelial growth rate (MGR) were registered. Microscopic characterization registered the number of spores and spore size. For molecular characterization, mycelium extraction and maceration, deoxyribonucleic acid (DNA) extraction, polymerase chain reaction (PCR), electrophoresis, and sequencing were performed. Characterization of the pathogenicity of fungal isolates was carried out in the *FRN* greenhouse, where healthy pitahaya cladodes were inoculated using two methods: wounded and unwounded. The filamentous fungi identified were *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, *Daldinia* sp., and *Diaporthe* sp., which were identified and characterized culturally, morphologically, and culturally. Of the inoculated strains, those that could be recovered in the re-isolation were *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, and *Diaporthe* sp., thus fulfilling the pathogenicity tests and demonstrating the potential for damage at the cladode level in pitahaya. This is the first study on diseases at the level of the pitahaya phylloplane in Ecuador that reports *Lasiodiplodia theobromae*, *Fusarium oxysporum*, and *Diaporthe* sp. as causes of symptoms associated with cancer in this crop of growing importance in our country.

Keywords: <CANCER>, <PITAHAYA (*Hylocereus* spp.)>, <*Lasiodiplodia theobromae*>, <*Diaporthe* sp. >, <*Fusarium* sp.>.



.....

Silvana Patricia Céleri Quinde

C.C. 0602669830

INTRODUCCIÓN

Desde el año 2005 la pitahaya ha entrado al mercado mundial con gran aceptación. Actualmente esta fruta es uno de los productos exóticos con mayor participación dentro de las exportaciones no tradicionales del Ecuador. En 2019, Estados Unidos importó 3.267,83 Tm de pitahaya siendo así el primordial importador de pitahaya en apenas tres años y superando a Hong Kong quien era hasta el 2018, el principal comprador de esta fruta. Asia, Estados Unidos y Europa son los principales clientes de esta exótica fruta, con 42%, 50,6% y 4,1% de importaciones, respectivamente; mientras tanto que en la región son Perú, Colombia y Chile. Los productores sienten que este mercado puede expandirse todavía más ya que al ser una fruta exótica se espera que ingrese con más fuerza a China y Rusia. El MAGAP, actualmente MAG, junto con la Asociación de Productores de Pitahaya del Ecuador (APPE) y otras multinacionales siguen en busca de una mayor expansión (Verona, 2017, p. 12).

El incremento de demanda de la pitahaya en los mercados locales y universales ha creado un proceso de extensión del cultivo en el país; en la actualidad se poseen cultivos en la zona Costa, Sierra y Oriente, no obstante, dicha expansión y el impacto de la variación en las condiciones climáticas gracias a la reciente ola invernal representa una amenaza para las plantaciones establecidas pues el crecimiento y la frecuencia de las precipitaciones fluviales incrementan la humedad en el ambiente, lo cual beneficia la existencia de plagas y el desarrollo de patologías que limitan la producción (Mora, 2012, p.8). Una de las problemáticas que se muestran en este cultivo son las diferentes enfermedades que están afectando tanto a nivel de cladodios, tallos y frutos. Los principales patógenos que se reportan son: *Fusarium oxysporum*, *Fusicoccum* sp., *Dothierella* sp., *Curvularia* sp., *Colletotrichum* spp. y *Alternaria* spp. (Mora, 2012, p.10).

En los últimos años en Malasia y en Estados Unidos se encontró al hongo *Neoscytalidium dimidiatum* como patógeno de los tallos y frutos de pitahaya. Este patógeno causa síntomas semejantes al cáncer del tallo que se ha visto en plantaciones de pitahaya en Costa Rica, el daño que causa *Neoscytalidium dimidiatum* se incrementa una vez que la planta está bajo estrés por escases de agua, condiciones secas y altas temperaturas, ocasionando un enorme efecto sobre la calidad del fruto, y disminuyendo significativamente la producción de pitahaya (Rodríguez, 2000, p.2).

Problema

La producción de pitahaya en el Ecuador se ha desarrollado de forma exitosa a lo largo de los últimos 20 años, logrando un crecimiento del área dedicada a su producción. A medida que este cultivo crece de manera intensiva es inevitable que problemas fitosanitarios emerjan con mayor frecuencia. La enfermedad conocida como cáncer ha comenzado a mermar el rendimiento de este cultivo, no existe información e investigación en el país, particularmente en cultivos de la provincia de Pichincha sobre el agente o agentes fúngicos asociados a el cáncer en cladodios de pitahaya.

Justificación

La demanda internacional tanto en los mercados de Europa, Asia y América cada vez abre más oportunidades a la comercialización de pitahaya amarilla y pitahaya roja producidas en Ecuador, donde se han incrementado paulatinamente las superficies dedicadas al cultivo de esta fruta. Las dos especies de pitahaya poseen la capacidad de colocarse como uno de los cultivos con mayor potencial internacional para el Ecuador, no obstante, esta industria necesita apoyo técnico basado en conocimiento científico para manejo de plagas y enfermedades emergentes que se desarrollan de manera local y que pueden ser subjetivamente novedosas o diagnosticadas erróneamente. En este sentido, se conoce el caso del hongo patógeno *Neoscytalidium dimidiatum* responsable de cáncer en plantaciones de pitahaya a nivel mundial y del cual no se tiene registro alguno a nivel nacional, pero se ha evidenciado su prevalencia en indagaciones preliminares de plantaciones de pitahaya en la Costa Ecuatoriana. Consecuentemente, con este estudio se pretende profundizar los conocimientos que orienten un mejor manejo de los cultivos en las diferentes zonas de importancia productiva de pitahaya amarilla en la provincia de Pichincha.

Objetivos

General

Aislar, caracterizar e identificar hongos filamentosos asociados con síntomas de cáncer en pitahaya (*Hylocereus* spp.) en el cantón Pedro Vicente Maldonado. en la provincia de Pichincha.

Específicos

- Caracterizar morfológica y culturalmente los aislados fúngicos obtenidos.

- Identificar molecularmente los aislados fúngicos obtenidos.
- Caracterizar la patogenicidad de los aislados fúngicos obtenidos.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Generalidades agronómicas del cultivo de la pitahaya

1.1.1. Origen de la Pitahaya

La pitahaya es cultivada en algunos países tropicales y subtropicales. Este fruto fue domesticado por las culturas precolombianas, mismas que recolectaban silvestremente para uso medicinal y alimentación, pero a pesar de su consumo este era desconocido para la población. En 1990 este fruto dio lugar a tema de conversación por sus propiedades y beneficios, actualmente la fruta es muy conocida siendo una de las frutas exóticas, por su forma y color, también capta la atención por sus propiedades nutricionales captando así a los comerciantes (Verona, 2020, p.14).

Por otra parte, el autor Medina (2015) indica que la pitahaya es una fruta que se originó en Perú, Ecuador, Colombia, también menciona su tallo segmentado y su característica trepadora. La especie a sufrido cambios por selección humana de tal forma que existen variedad de especies de pitahaya en diferentes puntos, también es conocida como pitaya en otros países (Verona, 2020, p.15).

1.1.2. La pitahaya en Ecuador

En Ecuador se cultiva la pitahaya siendo este una tendencia de consumo, este producto es atractivo por su sabor en el mercado estadounidense. Cada vez existen mayores cultivos de pitahaya por la demanda en mercados del exterior. Las empresas ecuatorianas indican que las ventas se están elevando constantemente y más aún la pitahaya amarilla (Rodríguez, 2000, p.5).

1.1.3. Taxonomía de la Pitahaya

Tabla 1-1: Taxonomía de la Pitahaya

Clase	Angiospermae
Subclase	Dicotyledoneae
Orden	Opuntiales
Familia	Cactaceae
Género	<i>Hylocereus</i>

Fuente: (INIAP, 2001, p. 77)

Elaborado por: Yumbla, Johanna, 2021.

El *Hylocereus* es la especie que se ha introducido en muchos puntos del mundo por su aporte y propiedades nutricionales además de ser una fruta económica siendo adaptable a lugares áridos y semiáridos. Son plantas que crecen sobre árboles de bosques o son sembradas en zonas naturales o en huertos familiares (INIAP, 2001, p.77).

1.2. Requerimientos edafoclimáticos

Temperatura: La pitahaya requiere de climas cálidos y subhúmedos además de desarrollarse muy bien en climas secos. (Infoagro, 2012, p.3).

Luz: La pitahaya requiere mucha iluminación para que la planta florezca y desarrolle los posteriores procesos. Pero tampoco radiación directa ya que eso afectaría a la planta. (Infoagro, 2012, p-4).

Sustrato: Se caracteriza un fruto rustico por lo cual se adapta a suelos secos y pedregosos, es sensible a encharcamientos (Infoagro, 2012, p.4).

1.3. Morfología de la Pitahaya

Raíz	Tallo	Flor	Fruto
<ul style="list-style-type: none"> •Posee dos tipos de raíces, el primer tipo está constituido por una raíz principal poca profunda y por raíces secundarias muy ramificadas •El otro tipo de raíces son las adventicias, que se producen sobre lados planos de los tallos; éstas al crecer se introducen en la tierra y adquieren las características de raíces normales. 	<ul style="list-style-type: none"> •Es de color verde, tienen tres aristas o costillas con areolas en sus bordes, las cuales tiene grupos de espinas de 2 a 4 mm, consideradas ramas u hojas modificadas. •Las pitahayas abren sus estomas solo por las noches, misma que constituye una adaptación fisiológica para evitar perdida de agua. 	<ul style="list-style-type: none"> •Es tubular, hermafrodita, con ovario en la parte inferior cubierta de espinas en el caso de <i>Selenicereus</i>, un sólo lóbulo, cámara nectarial, con numerosos estambres, su tamaño es de 20 a 40 cm de longitud y hasta 25 cm en su diámetro mayor y muy vistosa. •Pueden darse de 7 a 9 ciclos de floración, pero en la práctica solo se dan de 5 a 6, ya que algunos no llegan a darse o son muy débiles, por causas nutricionales o climáticas. 	<ul style="list-style-type: none"> •Es como una baya globosa, mide de 8 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de diámetro, de pulpa dulce y abundante, su cáscara es de color rojo o amarillo, en variados matices, cubierta con escamas foliáceas o brácteas distribuidas helicoidalmente.

Figura 1-1. Estructura Pitahaya

Fuente: (García, 2003, p.9)

Elaborado por: Yumbla, Johanna, 2021.

La raíz, tallo, flores, y fruto son distintos de otras plantas ya que cada fruto es distinto así también la pitahaya puede notarse que proviene de una planta trepadora que necesita de cuidados distintos a las demás además de estar en un suelo húmedo y tropical es más propensa a contraer plagas o enfermedades. Es necesario conocer la planta de este fruto para tomar medidas al respecto en caso de observar alguna anomalía en su estructura (García, 2003, p.9).

1.4. Producción de la pitahaya

Se adapta en zonas calurosas. Por ser una cactácea presenta tolerancia a elevadas grados de temperatura por ejemplo como máximo de 38-40 °C y así también soporta sequías, pero no en caso de acumulaciones de agua (García, 2003, p.10).

En la etapa de floración requiere de lluvias considerando que las altas precipitaciones causan la caída de las flores. Este fruto se desarrolla mejor en climas cálidos subhúmedos y también se adapta a los climas secos; no soportan aquellos climas de bajas temperaturas (García, 2003, p.10).

1.4.1. Cultivo de la Pitahaya

1.4.1.1. Propagación

Se realiza por esqueje a partir de plantas madres seccionadas. Puede propagarse por semillas, lo que proporciona plantas poco homogéneas (Box, 2005, p.16).

1.4.1.2. Plantación

La pitajaya amarilla puede plantarse a lo largo de todo el año en Canarias sin problemas especiales. La densidad de plantación es del orden de 450 plantas/ ha (4x3m), siendo necesario la instalación de tutores de soporte para las plantas. Es preferible sembrar varios pies por tutor (Box, 2005, p.16).

1.4.1.3. Control de crecimiento y desarrollo

La planta se conduce por medio de sistemas de parral, requiriendo podas de limpieza mensuales en época productiva (Box, 2005, p.16).

1.4.1.4. Fertilización y técnica de riego

No existe fertilización exacta para la pitahaya no hay indicios de estudios a nivel mundial, pero se conoce que en Canarias la planta responde bien a los aportes de abono nitrogenado, especialmente en forma amoniacal, por lo tanto es esencial brindarle los fertilizantes recomendados para lograr el rendimiento requerido en la pitahaya, estos llevan lo que es fosforo y potasio, sobre el tema de riego empleado es de goteo, con fertiirrigación del orden de 3-4 litros y 3-5 gramos de abono (planta y día). El riego es recomendable en verano y otoño. La fertilización es importante considerarla por el hecho que son necesario para obtener rendimiento en los cultivos. Los fertilizantes están compuestos por nutrientes que aportan al suelo para obtener calidad en los cultivos, dentro de estos podemos obtener aquellos fertilizantes, químicos, orgánicos, inorgánicos (Box, 2005, p.17).

1.5. Principales plagas y enfermedades

Existen muchas enfermedades y plagas dentro de la agronomía, pero todo depende también del entorno en el cual se encuentre el fruto y pues también de la estructura de la planta, en este caso conoceremos las principales enfermedades y plagas de la pitahaya (INIAP, 2001, p.77).

La diferencia entre plagas y enfermedades es la siguiente, en el caso de las plagas se podría decir que son seres vivos que compiten con el hombre en la búsqueda de agua y alimento causando daños en los espacios agrícolas es decir en actividades humanas. Mientras que por otro lado las enfermedades son aquellas que ya son conocidas desde la antigüedad caracterizadas por ser infecciosas y también no infecciosas misma que infectan a cierta parte o estructura específica de la planta (INIAP, 2001, p.78).

1.5.1. Las plagas que puede afectar a la pitahaya

Tabla 2-1: Plagas de la Pitahaya

NOMBRES	DAÑO	CONTROL
Nemátodos	Atrofian las raíces	Carbofurán
Hormigas	Ocasionan daños en brotes tiernos	Destruir casas y Malathión
Avispas	Dañan los brotes tiernos	Decis
Afidos	Deforman los frutos y brotes tiernos	Evisect
Ácaros	Manchan y deforman los frutos	Omite

Fuente:(INIAP, 2001, p. 78)

Realizado por: Yumbla, Johanna., 2021.

Finalmente cabe mencionar que la abundancia de insectos encontrados mediante el estudio desarrollado en el cultivo de pitahaya en las fincas Palo Solo y Panamá fueron en total de 2438 insectos (Jiménez., 2020, p.192).

1.5.2. Las enfermedades que puede afectar a la pitahaya

Tabla 3-1: Enfermedades de la Pitahaya.

NOMBRES	CONTROL
Antracnosis (<i>Collectotrichum</i> sp.)	Productos a base de cobre
Fusariosis (<i>Fusarium</i> sp.)	Plantas sanas y resistentes
Pudrición Bacteriana (<i>Erwinia</i> sp.)	Reducir el exceso de humedad y aplicar estreptomicina (INIAP, 2001, p. 83).
<i>Fusarium</i> sp.	Es un hongo muy frecuente en los frutos de pitahaya con síntomas que causan la pudrición basal (Salazar, 2016, p. 7).
<i>Colletotrichum</i> sp.	Las lesiones que causa esta enfermedad inicialmente son superficiales, de color rojizo o café claro con una apariencia acuosa y de forma circular, creciendo hasta 2.5 cm o más en diámetro. Es una enfermedad que puede afectar hojas,

	ramas y frutos, ocasionando el mayor daño, repercute directamente en la calidad de los mismos (Infoagro, 2012, p. 4)
<i>Neoscytalidium</i> sp.	Este hongo es reconocido como patógeno en frutos como la pitahaya. El mecanismo de ingreso en la planta es a través de heridas en tallos sanos, ya que es un organismo oportunista (Salazar, 2016, p. 7).
<i>Lasiodiplodia</i> sp.	Los hongos <i>Lasiodiplodia</i> son hongos ascomicetos que causa serios problemas cuya sintomatología se denomina “muerte regresiva”, canchosis de tallos y ramas, pudrición del cuello de planta, amarillamiento, afectan severamente llegando a bajar los rendimientos e incluso la muerte de plantas (Jiménez, 2017, p. 202).
<i>Daldinia</i> sp.	Son consideradas como colonizadores tempranos, debido a que los estromas a menudo se forman inmediatamente después de que sus hospederos han sido estresados o dañados. Estos hongos se hospedan en tejidos sanos, llevan a cabo su ciclo y fructifican cuando la planta huésped es sometida a un disturbio (Barbosa, 2020, p. 1).
<i>Diaporthe</i> sp.	Bajo condiciones climáticas normales, los síntomas no se observan sino hasta el fin del ciclo del cultivo. Cuando comienza la senescencia de las plantas, se observa la aparición de hileras de picnidios negros en los tallos, y en forma dispersa en las vainas. A partir de la vaina, la infección pasa a la semilla, la cual a veces no presenta síntomas (a pesar de estar infectada) y a veces se encuentra agrietada, arrugada, y en ocasiones cubierta por una eflorescencia blanquecina (Jiménez, 2017, p. 203).

Realizado por: Yumbra, Johanna, 2021.

1.5.3. Manejo integrado de plagas y enfermedades

Tabla 4-1: Manejo Integrado de enfermedades y plagas.

<i>Fusarium oxysporum.</i>	Cultural: realizar un control oportuno de malezas, ajustar los planes de fertilización, hacer solarizaciones por sitio de siembra, drenar el terreno, sembrar en montículos, obtener material de propagación libre del patógeno, realizar podas sanitarias y erradicar las plantas afectadas (Mora, 2012, p. 10)
Manejo de antracnosis	Métodos culturales: sembrar material de propagación sano, realizar podas fitosanitarias, recoger los residuos de vegetales de las podas y las flores, desinfectar las herramientas frecuentemente, hacer un control oportuno de malezas (Mora, 2012, p. 10)
Manejo de la pudrición suave	Métodos culturales: establecer material de propagación sano, desinfectar las herramientas, evitar causar heridas en las plantas y evitar los excesos de humedad en el suelo, realizar continuamente podas sanitarias para disminuir la cantidad de inóculo, hacer un control oportuno de malezas e instalar a la entrada del lote una zona de desinfección del calzado (Mora, 2012, p. 10)
Manejo de la mosca del botón floral de la pitahaya	Control cultural: realizar control de malezas oportuno, recoger los botones afectados, además se puede instalar trampas en forma de cintas con pegamento agrícola (Mora, 2012, p. 10)

Realizado por: Yumbra, Johanna, 2021.

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO

2.1. Descripción Geográfica.

2.1.1. Localidad.

El trabajo de investigación se realizó en tres etapas: la primera etapa fue la recolección de muestras en la provincia de Pichincha en el cantón Pedro Vicente Maldonado, la segunda etapa consistió en el procesamiento, aislamiento y purificación de hongos en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales (FRN) de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mientras que la tercera etapa consistió en la realización de pruebas de patogenicidad en el invernadero de la FRN.

2.1.2. Ubicación geográfica

Coordenadas de la provincia de Pichincha, zona de Pedro Vicente Maldonado.

Latitud: -0.225219, 0° 13' 31" Sur

Longitud: -78.5248, 78° 31' 29" Oeste

Altitud sobre el nivel del mar: 800 m (Gobierno Provincial de Pichincha).

Coordenadas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Latitud: 1°39'28,57" S

Longitud: 78°40'34,83" O

Altitud sobre el nivel del mar: 2812 m (Ubica Ecuador).

2.2. Materiales y equipos

2.2.1. Material biológico

- Muestras de cladodios de pitahaya con síntomas de cáncer.
- Aislados fúngicos asociados al cáncer de pitahaya.

2.2.2. Medios de cultivo

- Papa Dextrosa Agar (PDA Difco™)
- Spezieller Nährstoffarmer Agar (SNA)
- Agar Avena al 2% .
- Agar-Agar (AA BIOCEKLN).

2.2.3. Reactivos

- Antibiótico (Streptomycin)
- Antibiótico (Cloranfenicol)
- Hipóclorito de sodio 1%
- Alcohol 70%
- Agua destilada
- Lactofenol

2.2.4. Equipos de laboratorio

- Cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC-1500IIA2-X)
- Autoclave (BKQ-B100II)
- Microscopio óptico (LEICA DM 150)
- Baño María (CENCO 97013-16)
- Destilador de agua (BOECO WS 8000)
- Ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450)
- Incubadora (J.P.SELECTA 2001249)
- Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2)
- Secador de vidrio (SELECTA 2000381)
- Cámara Neubauer-improved (8100204)

2.2.5. Materiales de laboratorio

- Puntas de micro pipetas (1000 µL)
- Cajas de Petri de vidrio 90 mm de diámetro
- Recipientes plásticos perforados (1000 mL)
- Microtubos (1,8 mL)

- Pinzas de laboratorio (longitud 200 mm)
- Vaso de precipitación (100 mL)
- Probeta graduada (500 mL)
- Tubos de ensayo (35 mL)

2.2.6. *Insumos de laboratorio*

- Alcohol al 70 %
- Agua destilada estéril

2.2.7. *Materiales y equipos de campo*

- Libreta
- Formatos
- Registrador de temperatura y humedad relativa
- Sustrato
- Macetas
- Soporte de madera
- Fundas plásticas
- Baldes plásticos

2.2.8. *Materiales y equipos de escritorio*

- Computadora
- Impresora
- Flash memory
- Papelería y útiles de oficina

2.3. Métodos

2.3.1. *Colecta del material vegetal*

Para el muestreo, en la localidad de la provincia de Pichincha se evaluó el estatus fitosanitario de las fincas y mediante un muestreo exploratorio se recolectó 5 muestras de cladodios de pitahayas sintomáticas y una asintomática como muestra control. El material vegetal fue transportado a 4°C para su almacenamiento y posterior tratamiento a los laboratorios de

Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la ESPOCH.

2.3.2. *Aislamiento del patógeno*

Una vez en el laboratorio, se seleccionó los segmentos que presentaron síntoma, pero que no se encontraron necróticas, estos fueron cortados en cubos de aproximadamente 1 cm por 1 cm, posteriormente en el protocolo de desinfección las muestras fueron desinfectadas en una solución de alcohol al 70 % durante 30 segundos, seguido de hipoclorito de sodio al 2 % por un minuto, y posteriormente se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril. Cada segmento fue colocado en medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) con antibiótico, y se introdujo a la incubadora por un lapso de 7 días a una temperatura de 27°C y se repitió de manera continua repiques hasta la obtención de colonias puras.

2.3.3. *Caracterización cultural y morfológica*

2.3.3.1. *Caracterización cultural*

En la caracterización cultural se procedió a realizar repique a partir de cultivos monospóricos con discos de 5,75 mm de diámetro a cajas con medio de cultivo PDA más antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% más Cloranfenicol al 5%), se incubaron a 25 °C ± 1 para la evaluación de la tasa de crecimiento micelial (mm/día) donde se registrarán datos cada 24 horas, también se observó textura del micelio, borde, y el color anverso y reverso de la colonia.

2.3.3.2. *Caracterización morfológica*

Para la caracterización morfológica se partió de los cultivos monospóricos haciendo cortes de disco de 5,75 mm de diámetro y se transfirió a medio de cultivo Agar -Agar más antibiótico (Sulfato de estreptomicina 100 ppm más Cloranfenicol 100 ppm), con acículas de pino y se incubaron a 25 °C ± 1. durante dos días y luego fueron llevados a la cámara de esporulación durante 8 días. En condiciones estériles se utilizó agujas y cinta adhesiva transparente se realizó una impronta en el medio de cultivo, se transfirió a un porta objetos que contenía una gota de lactoglicerol y observó al microscopio (CARL ZEISS) lente 100X, se caracterizó la forma de los conidios, posteriormente se midieron el ancho y longitud de 25 esporas con el ocular micrométrico.

2.3.4. Caracterización molecular

2.3.4.1. Extracción del micelio.

En pedazos de papel bond (6x5), se colocó todo el micelio que se pudo extraer de los cultivos puros de las cajas Petri, el mismo que se dejó secar por un tiempo aproximando de 20 minutos sobre una bandeja metálica, luego de haber pasado el tiempo establecido se cubrió el micelio con papel aluminio y se introdujo en sobres de manila y una funda ziploc con su etiqueta respectiva, se guardó en el ultracongelador a - 40 °C, hasta realizar la maceración.

2.3.4.2. Maceración del micelio

Para la maceración el micelio que se refrigeró a menos 40°C, se colocó en un mortero previamente esterilizado para posterior a eso agregar el Nitrógeno líquido (30 -40 mL) y empezar a macerar hasta que el micelio presentó una textura polvosa, posterior a eso se introdujo en microtubos estériles de 1.5 mL previamente etiquetados para conservarlos en el ultracongelador a - 40 °C.

2.3.4.3. Extracción de ADN

Se realizó una lisis química donde se adicionó 600 µL de solución de lisis nuclear (PROMEGA ©), vórtex por 3 s, se incubó a 65 °C por 15 min en baño María, se invirtió los tubos cada 5 min. Se adicionó 200 µL de solución de precipitación de proteínas (PROMEGA ©), vórtex por 20 s. Se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm. El precipitado de proteínas formó un pellet. Se transfirió el sobrenadante (600 µL) conteniendo el ADN a un nuevo tubo (1,5 mL). Se adicionó 600 µL de clorofórmol-alcohol-isoamílico. Vórtex por 20 s. Se centrifugó por 10 min a 14.000 rpm. Se transfirió el sobrenadante (+/- 600 µL) conteniendo el ADN. Se adicionó 600 µL de 25 isopropanol frío, cuidadosamente se mezcló la solución invirtiendo los tubos hasta observar una masa vesível de ADN (hilos pequeños). Se dejó la solución en el ultracongelador por 10 min y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. Se observó la formación del pellet en el fondo de los tubos. Cuidadosamente se descartó el sobrenadante. Se precedió a dos lavados con etanol, para esto, en cada lavado, se adicionó 600 µL de etanol 70% frío y se centrifugó a 14.000 rpm por 5 min. Cuidadosamente se descartó el etanol, se colocó en ambiente estéril los tubos en posición horizontal con la tapa abierta sobre papel toalla para el secado del pellet durante 24 h. Después de aproximadamente 24 h se suspendió el pellet con solución buffer (TE). Finalmente se adicionó 50 µL de solución de rehidratación de ADN y 2 µL de RNasa (PROMEGA ©) en cada

tubo. Se incubó a 37 °C en Baño María por aproximadamente 3 h. Se almacenó el ADN en el ultracongelador a -40 °C.

2.3.4.4. PCR

En el proceso de PCR se utilizó los siguientes primers:

Tabla 5-2: Primes para las reacciones de PCR.

Nombre	Gen Amplificado
Forward 10 μ M ITS 1F	Espacios Internos Transcritos
Reverse 10 μ M ITS 4R-	
Forward 10 μ M EF1 – 728F	Factor de Elongación y Traducción
Reverse 10 μ M EF2	
Forward 10 μ M BT1	β - Tubulina
Reverse 10 μ M BT2	

Realizado por: Yumbla, Johanna, 2022.

En donde se preparó un mix con los siguientes reactivos:

6,25 μ L Enzima GoTaq Colorless Mater Mix, 2x,

1 μ L Forward 10 μ M ITS 1F

1 μ L Reverse 10 μ M ITS 4R-

3,25 μ L Agua libre de nucleasas.

Luego se colocó en tubos de 0,2 mL un volumen del mix de 11,5 μ L más 1 μ L de ADN para obtener un volumen de reacción de 12,5 mL. Para el control se preparó el mismo mix reemplazando el AND, con agua ultra pura estéril.

Para la amplificación se colocó las muestras en un termociclador (EPPENDORF) para el siguiente proceso:

1. Desnaturalización inicial a 96 °C por 5 min
2. 40 ciclos
3. Desnaturalización 96 °C por 1:15 min.
4. Alineación 50 °C a 55 °C por 1:15 min.

5. Extensión 72 °C por 1 min.
6. Extensión final 72 °C por 5 min

2.3.4.5. *Electroforesis*

Para la preparación se diluyó Tris-Borate-EDTA buffer (TBE) a una concentración de 1X en agua destilada estéril, luego se procedió a la preparación del gel agarosa a una concentración del 1 %, posterior a eso se colocó 3 µL el agente intercalante (UniSafe) en 60 mL de solución de agarosa, esto se vertió en la cuba, se colocó el peine para formar los pocillos, y se cubrió de la luz para evitar la degradación del agente intercalante hasta que la solución se gelifique, seguido de eso se retiraron los peines y se cubrió la superficie del gel con la solución buffer TBE 1X.

Para colocar las muestras en los pocillos se utilizó:

2 µL de Blue Juice

2 µL de ADN

3 µL Bench Top Lander (marcador molecular de 100bp)

Luego se corrió las muestras a 80 V por un tiempo de 80 min, finalmente se colocó en un transiluminador (FISHER SCIENTIFIC) para verificar las amplificaciones de los productos de PCR. Para la secuenciación de los productos de PCR fueron enviados al laboratorio MACROGEN COREA, utilizando el programa Cromas se obtuvieron las secuencias de nucleótidos y estas fueron alineados con la base de datos BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica para la identificación inicial de las especies mediante bacoding.

2.3.5. *Caracterización de la patogenicidad.*

La inoculación de agentes fúngicos se realizó en las plantas de pitahaya de 80 días de edad ubicadas bajo invernadero en la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, mismas que se encontraban sembradas en sustrato, el manejo se dio mediante fertirriego de acuerdo al requerimiento nutricional de las plantas. El ensayo se instaló en el invernadero en el mes de mayo del año 2021.

2.3.5.1. *Diseño del ensayo*

Tabla 6-2: Tratamientos establecidos para las pruebas de patogenicidad en plantas de pitahaya.

Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
Código	Método de inoculación	Código	Método de inoculación	Código	Método de inoculación
PLYPa I.1	CH	PLYPa I.1	CH	PLYPa I.1	CH
	SH		SH		SH
MX2.5	CH	MX2.5	CH	MX2.5	CH
	SH		SH		SH
MX1.11	CH	MX1.11	CH	MX1.11	CH
	SH		SH		SH
PJNa.6	CH	PJNa.6	CH	PJNa.6	CH
	SH		SH		SH
PGL2.1	CH	PGL2.1	CH	PGL2.1	CH
	SH		SH		SH
GR.16	CH	GR.16	CH	GR.16	CH
	SH		SH		SH
HL.11	CH	HL.11	CH	HL.11	CH
	SH		SH		SH
MX1.2R3	CH	MX1.2R3	CH	MX1.2R3	CH
	SH		SH		SH
CS9	CH	CS9	CH	CS9	CH
	SH		SH		SH
MX1.2 R1	CH	MX1.2 R1	CH	MX1.2 R1	CH
	SH		SH		SH
KC3	CH	KC3	CH	KC3	CH
	SH		SH		SH
M3R2	CH	M3R2	CH	M3R2	CH
	SH		SH		SH

Realizado por: Yumbra, Johanna, 2022.

Se inocularon 12 cepas diferentes, más un control, repartidos en tres tratamientos con dos repeticiones cada uno, en total se utilizaron 39 plantas de pitahaya.

Para la inoculación de los aislados fúngicos en las plantas se tomó en cuenta que los cladodios sean jóvenes y sanos. Esto se realizó mediante dos métodos:

- Inoculación con herida

En este método se realizó heridas con palillos de madera estériles a los cladodios, para luego colocar un disco de la colonia pura encima de la herida, se cubrió con algodón húmedo estéril, y plástico transparente.

- Inoculación sin herida.

Se colocó un disco del aislado fúngico sobre el cladodio, se cubrió con algodón húmedo estéril y plástico transparente.

Cada semana se registró el crecimiento de la herida largo y ancho (mm. semana) y se tomó fotografías de los síntomas que se empezaron a observar, finalmente, aquellos cladodios sintomáticos se colectaron y se llevaron nuevamente a laboratorio para su reaislamiento.

2.3.5.2. Reaislamiento de agentes fúngicos

Las plantas de pitahaya de cada tratamiento que presentaron síntomas, se recolectaron los cladodios afectados, posteriormente en el laboratorio fueron fotografiados y se realizaron cortes del tejido afectado, pero no necrosado aproximadamente de 1cm x 1cm, para luego seguir con el protocolo de desinfección y siembra de las muestras en medio PDA más antibiótico (Sulfato de estreptomicina al 1% más Cloranfenicol al 5%), mismo que se colocó en cajas Petri de 12 a 15 mL, para luego proceder a sembrar 4 cortes del tejido afectado por caja, incubar por 72 horas a una temperatura de 24 °C.

Al observar crecimiento de micelio, en el medio de cultivo, se realizaron cortes de discos de 5,75mm de diámetro, para luego proceder a sembrar un disco por cada aislado fúngicos diferentes en una nueva caja petri con medio PDA para finalmente ser identificados.

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS Y DISCUSION DE LOS RESULTADOS

3.1. Aislamiento de hongos fitopatógenos asociados al cáncer de pitahaya.

3.1.1. Localidades de las muestras colectadas.

Se recolectaron muestras de 15 fincas de diferentes localidades del cantón Pedro Vicente Maldonado (Tabla 7-3).

Tabla 7-3: Ubicación geográfica.

Finca	Propietario	Código	Localidad	Coordenadas Geográficas
1	Sr. Luis Yépez	PLYPa.I	15 de mayo/La Célica, cantón Pedro Vicente Maldonado	00°13'08.3"N 79°06'43.7"O
2	Ing. Mario Moscoso	MX1.2 R3	Pedro Vicente Maldonado / Bonanza	00°08'02.9"N 79°06'13.5"O
		MX1.2R1		
		MX2.5		
		MX1.11		
3	Sr. Marcelo Jumbo	PJNa.6	Pedro Vicente Maldonado	00°04' 55.3"N 79°03'21.7"O
4	Sr. Gabino Góngora	PGL2.1	15 de mayo/La Célica, cantón Pedro Vicente Maldonado	00°13'36.8"N 79°08'07.0"O
5	Sr. Guillermo Rojas	GR16	Pedro Vicente Maldonado / La Célica / 15 de mayo	00°13'51.0"N 79°08'03.9"O
6	Sr. Héctor Lozano	HL11	Pedro Vicente Maldonado / La Célica / 15 de mayo	00°13'11.8"N 79°08'13.2"O
7	Sr. Cesar Augusto Silva Quinde	CS9	Pedro Vicente Maldonado / La Célica / El Cisne	00°08'56.0"N 79°01'57.3"O
8	Sr. Cristian Merino	M3R2	Pedro Vicente Maldonado / La Célica / 15 de mayo	00°13'11.8"N 79°08'13.2"O
9	Sr. Klever Chela	KC3	Pedro Vicente Maldonado	00°05'52.1"N 79°03'26.5"O

Realizado por: Yumbla, Johanna, 2022.

3.1.2. Síntomas observados en las muestras colectadas

Los síntomas asociados con el cáncer de pitahaya que se observaron en los cladodios recolectados fueron muy similares en su totalidad. Se identificaron pequeñas manchas circulares anaranjadas con oscurecimiento en el centro, manchas blanquecinas con puntuaciones negras, y desprendimiento del tejido vegetal.

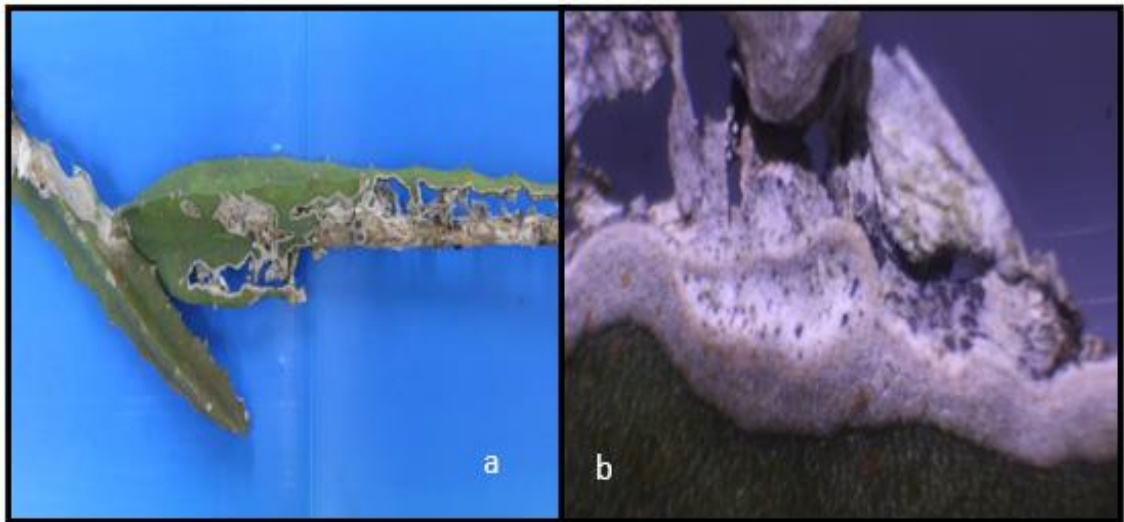


Figura 2-3. Muestra PLYPaI.1. Sintomatología en cladodios, (a) manchas blanquecinas, (b) manchas blanquecinas con puntuaciones negras.

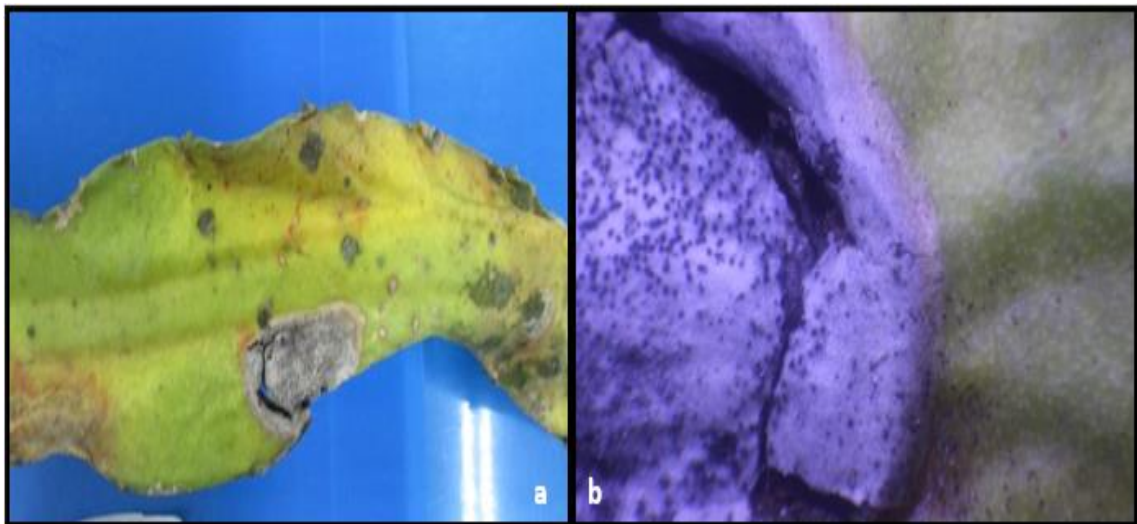


Figura 3-3. Muestra MX2.5, (a) Manchas anaranjadas con oscurecimiento en el centro y desprendimiento del tejido. (b) coloración blanquecina con puntuaciones negras.

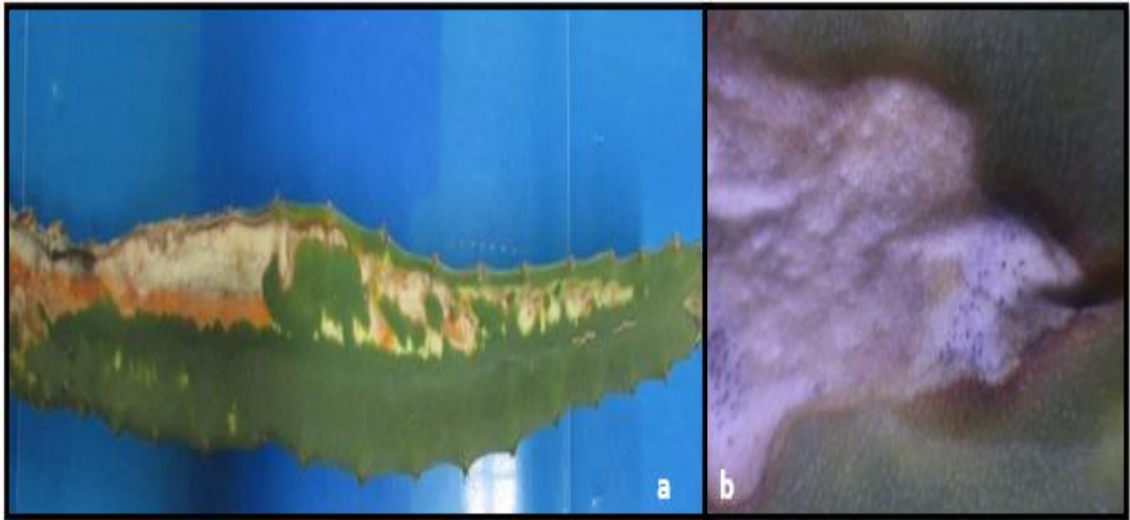


Figura 4-3. Muestra MX1.11. (a) Manchas alargadas anaranjadas con los bordes blancos, (b) manchas blancas con los bordes anaranjados y puntuaciones negras.

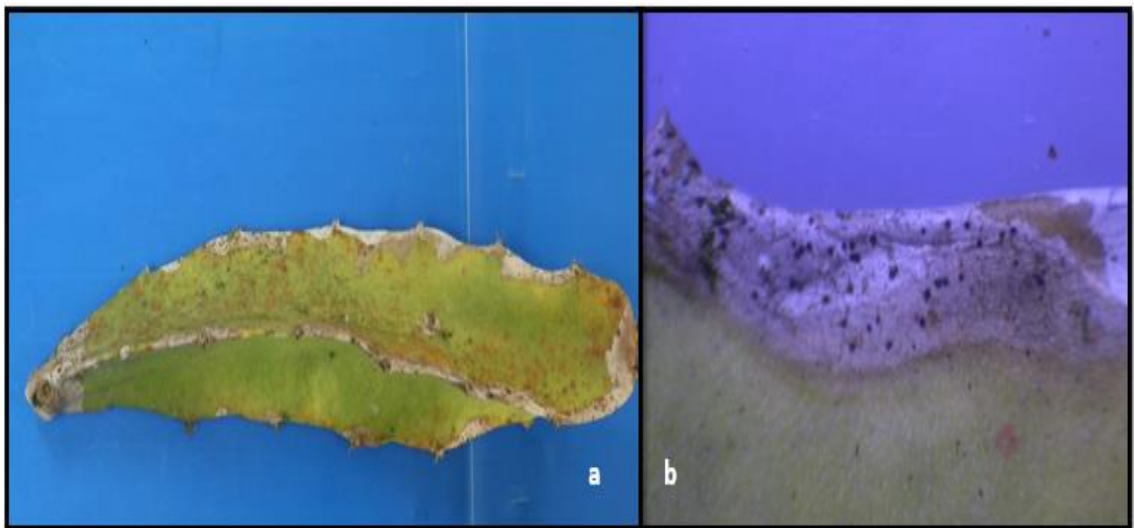


Figura 5-3. Muestra PJNa.6, (a) Pequeñas lesiones color naranja. (b) Bordos del cladodio de color blanquecino con puntuaciones negras.

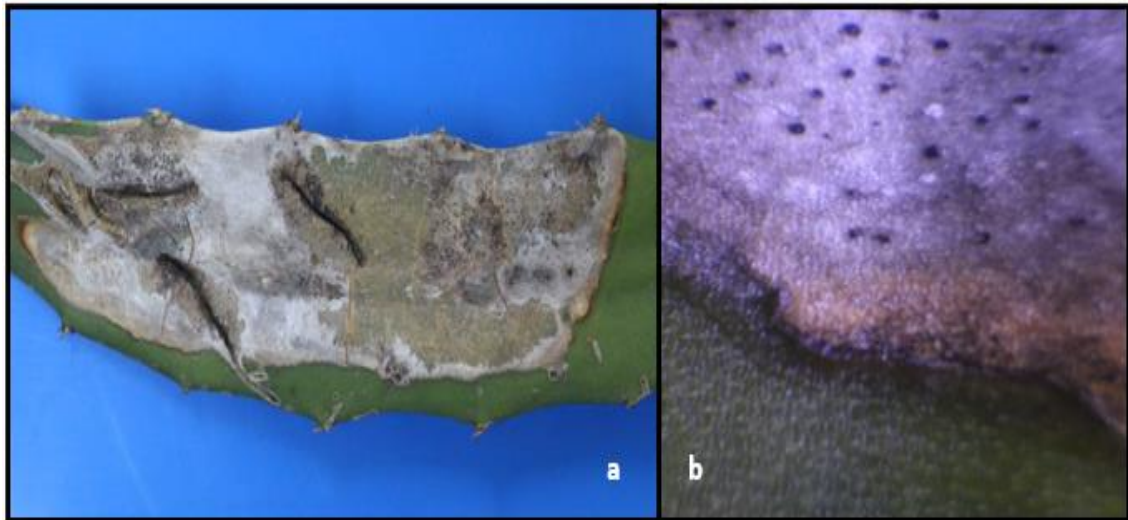


Figura 6-3. Muestra PGL2.1.(a) Coloraciones blanquecinas con oscurecimiento en el centro. (b) manchas blancas con bordes anaranjados y puntuaciones negras.

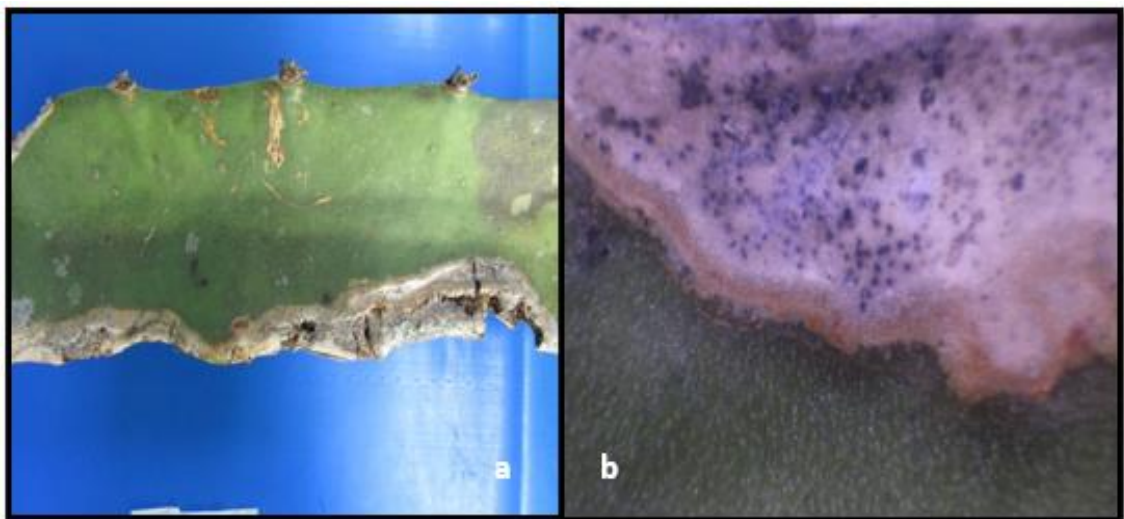


Figura 7-3. Muestra GR.16, (a) Coloraciones blanquecinas al borde del cladodio. (b) lesiones blancas con bordes anaranjados y puntuaciones negras.

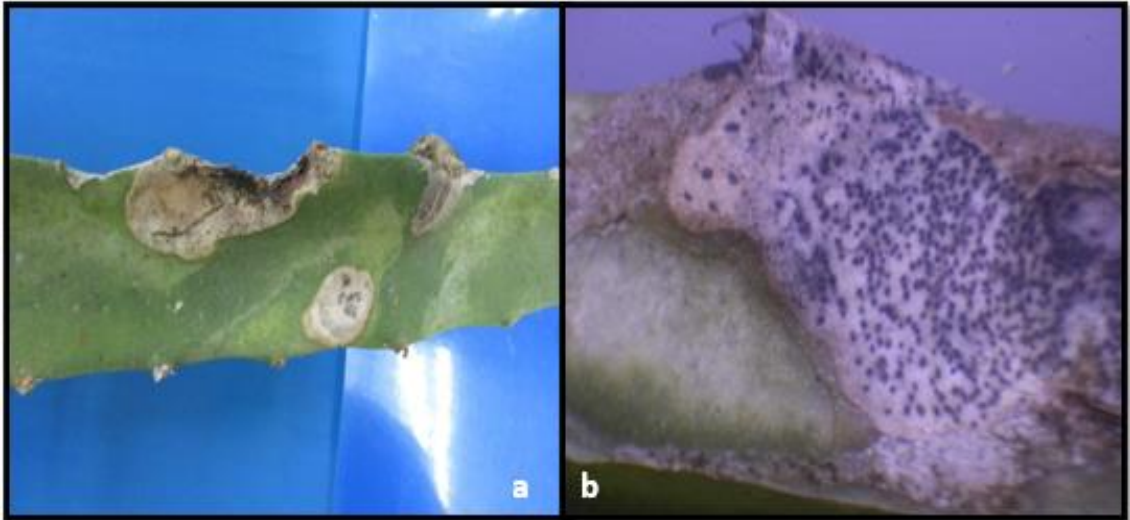


Figura 8-3. Muestra HL.11, (a) Manchas circulares de color blanco con bordes necróticos. (b) manchas blanquecinas con puntuaciones negras.

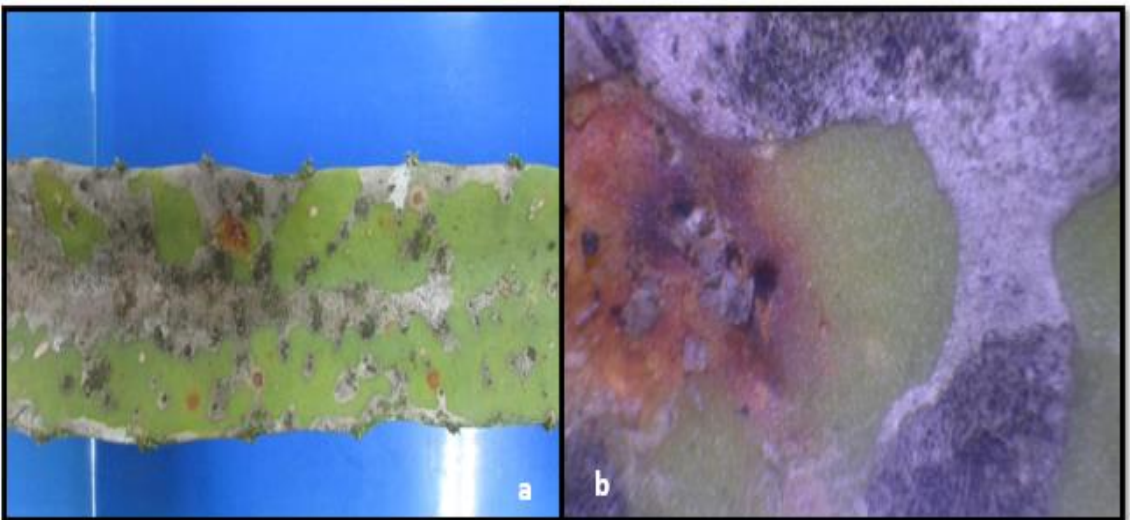


Figura 9-3. Muestra MX1.2 R3, (a) Pequeñas lesiones de color naranja, gris y blancas. (b) manchas anaranjadas, y blancas con puntuaciones negras.

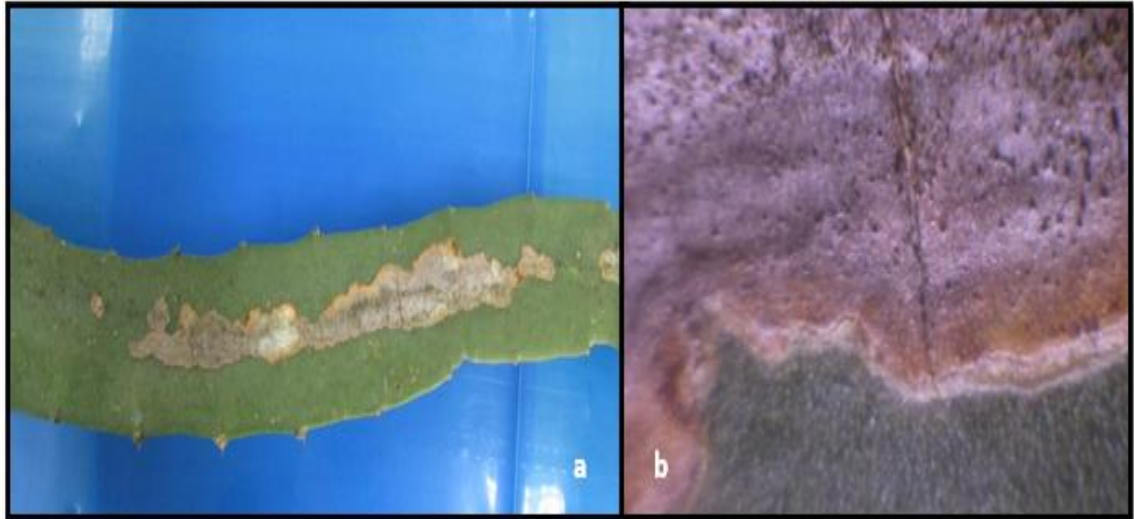


Figura 10-3. Muestra CS9, (a) Manchas alargadas blancas con bordes anaranjados. (b) manchas blanquecinas con bordes anaranjados y ligeras puntuaciones negras.

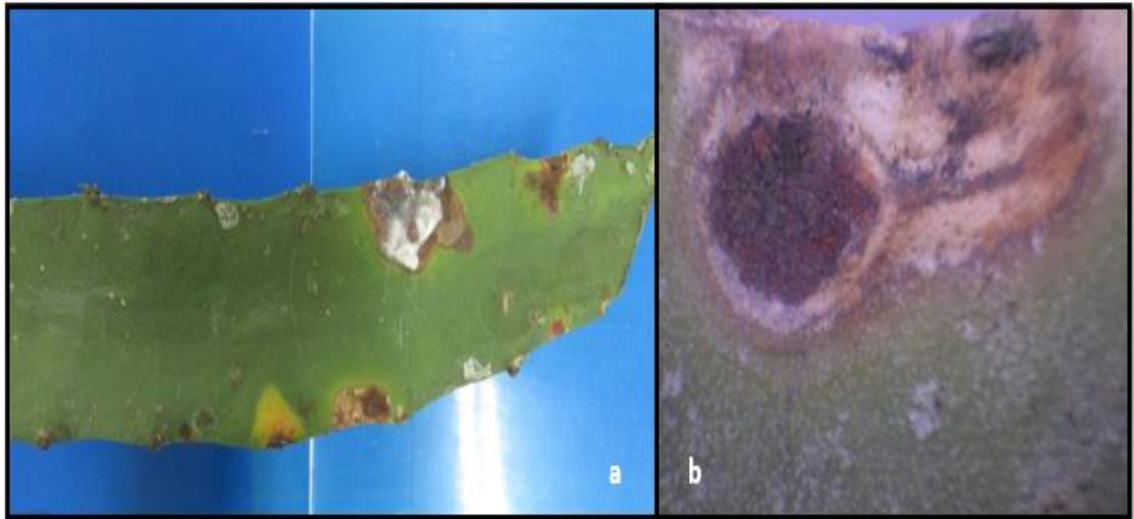


Figura 11-3. Muestra KC3, (a) Manchas circulares de color marrón. (b) Manchas circulares de color marrón con un halo clorótico.

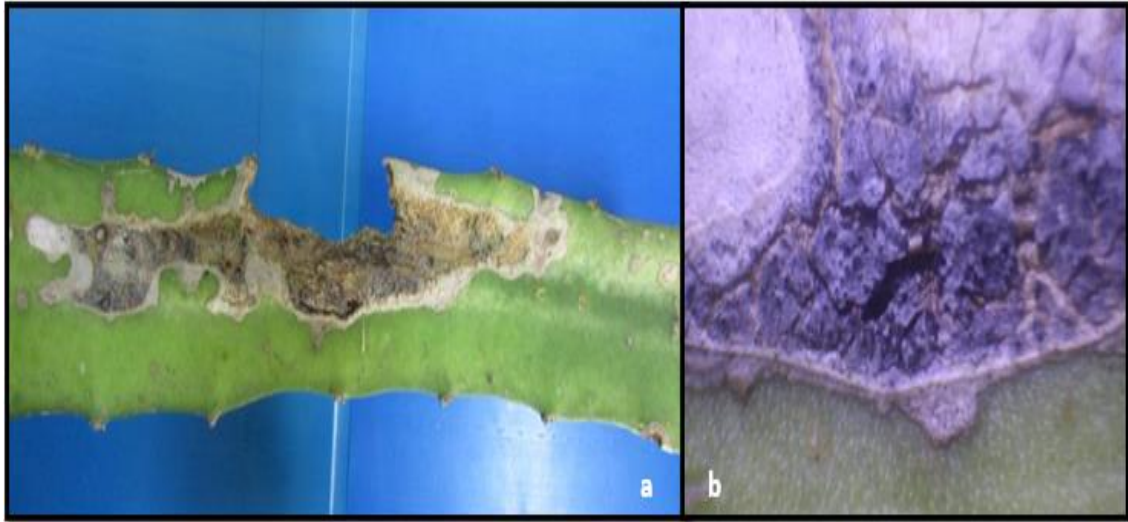


Figura 12-3. Muestra M3R2, (a) Manchas grises con bordes blancos. (b) Manchas oscuras.

3.2. Caracterización morfológica y cultural de los agentes fúngicos obtenidos de los cultivos de pitahaya.

Se obtuvieron 12 aislados de las diferentes localidades (**Tabla 7-3**), pertenecientes a 4 fenotipos con características diferentes los cuales se describen a continuación:

3.2.1. *Lasiodiplodia* sp.

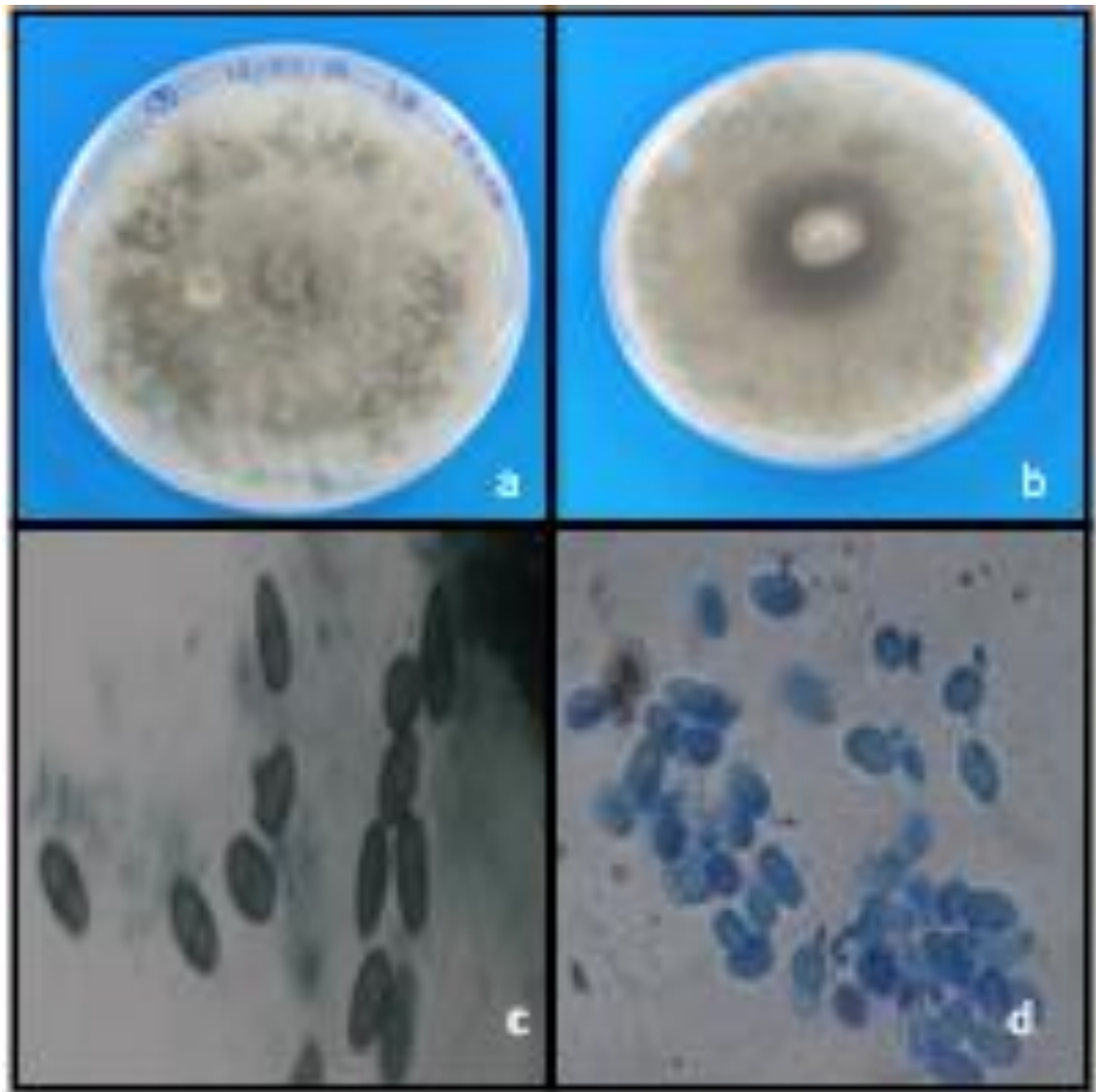


Figura 13-3. Características culturales de *Lasiodiplodia theobromae* crecido en medio de cultivo PDA a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e incubados durante 5 días (a-b).

Las características culturales y morfológicas de los aislados con los códigos (PLYPaI.1; MX2.5; MX1.11; PJNa.6; PGL2.1; GR.16; HL.11) corresponden a *Lasiodiplodia* sp. crecido en medio PDA a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$, presentó una tasa de crecimiento micelial de 20,7 mm/día (**Tabla 8-3**), Donde se observó una coloración blanca grisácea en el anverso y reverso de la colonia con un margen

irregular y presencia de elevación del micelio. (**Tabla 8-3**). Formaron conidios maduros de color café y conidios inmaduros de apariencia transparente con una longitud promedio de 9,92 μm largo x 5,96 μm de ancho (**Tabla 9-3**).

Las características obtenidas fueron similares a las características expuestas por Ravello (2019), que menciona que *Lasiodiplodia theobromae* en medio PDA, presenta un crecimiento rápido con un color de la colonia en tonalidad blanco grisáceo, y se pueden observar conidios inmaduros que presentan paredes gruesas y conidios maduros de color café oscuro con estrías en la superficie.

3.2.2. *Fusarium* sp.

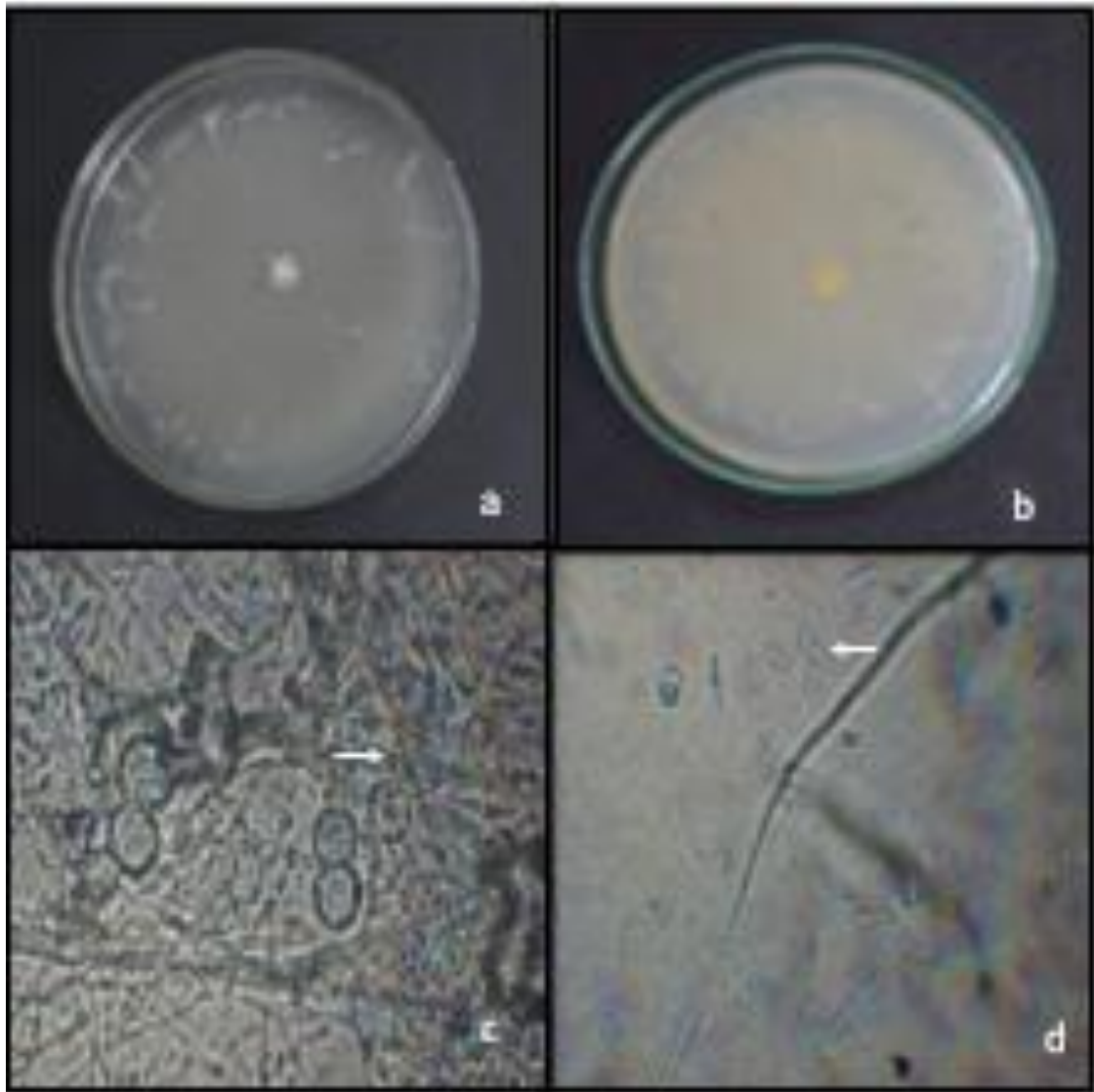


Figura 14-3. Características culturales de *Fusarium oxysporum* en medio de cultivo PDA incubados a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ durante 8 días (a, b).

La cepa con el código (MX1.2 R3) corresponde a *Fusarium* sp. creció en medio de cultivo PDA incubados a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, con una tasa de crecimiento micelial de $9,7\text{ mm. día}$. La coloración que se observó tanto en el anverso como en el reverso de la colonia fue de color blanco con un borde regular (**Tabla 8-3**).

Presentó conidios un poco alargados con una medida de $2,5\text{ }\mu\text{m}$ de largo x $1,5\text{ }\mu\text{m}$ de ancho. (**Tabla 9-3**).

Según Retana et al., (2018), menciona que *Fusarium oxysporum* presenta microconidios de forma oval, que se forman sobre monofiálides cortas, y las clamidosporas son tipos verrugas en cadenas o pares.

3.2.3. *Diaporthe* sp.

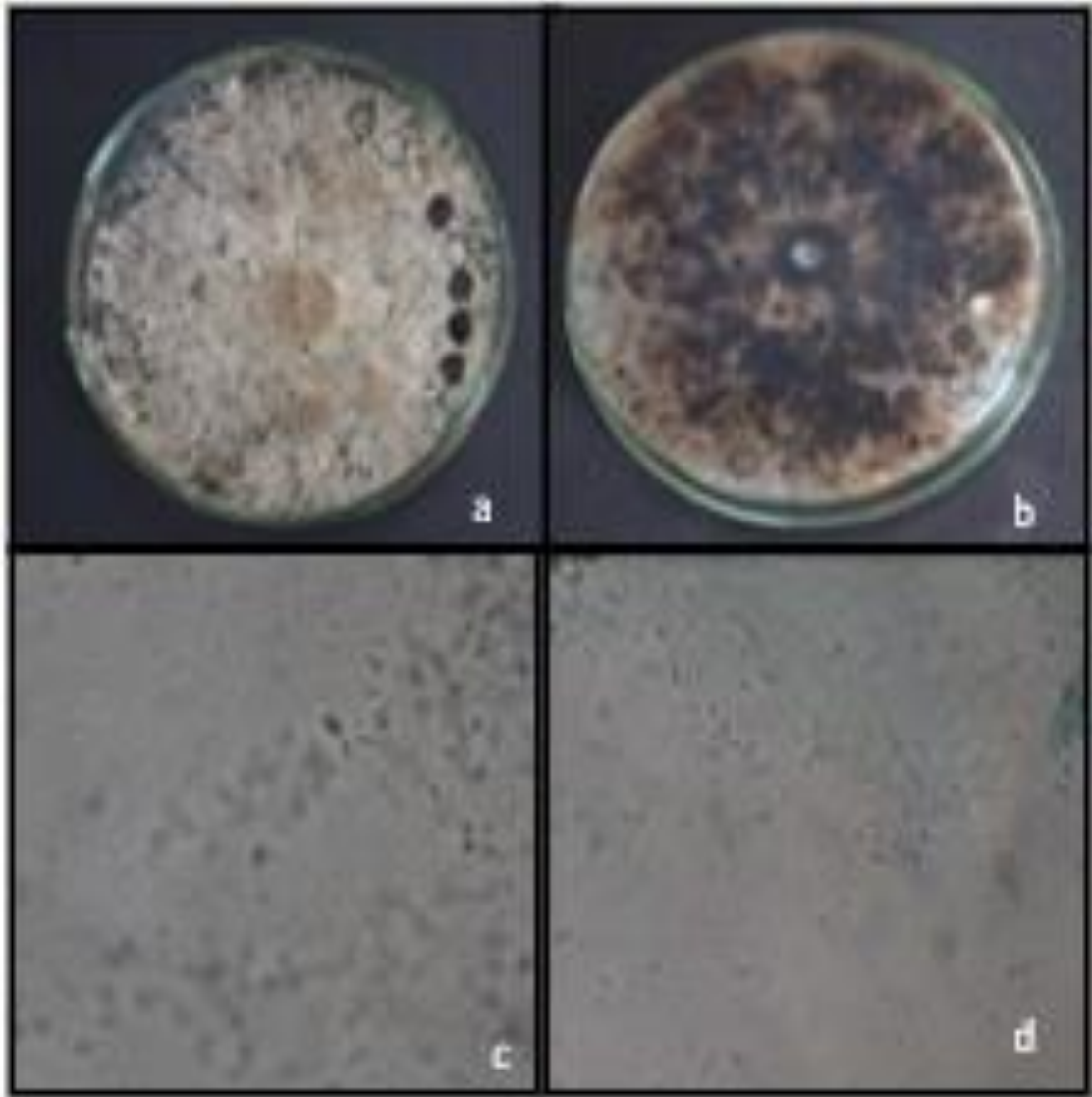


Figura 15-3. Características morfológicas de *Diaporthe* sp. Crecido en medio de cultivo PDA a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e incubados durante 8 días (a, b).

Las cepas con los códigos (KC3; M3R2) corresponde a *Diaporthe* sp. creció en medio de cultivo PDA a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ con una tasa de crecimiento micelial de 15.2 mm/día, en donde se observó un color café claro tanto en el anverso como en el reverso de la caja, con un margen irregular y poca elevación (**Tabla 8-3**). Se observó conidios que tienen una medida de $3,5\text{ }\mu\text{m}$ de largo x $1,5\text{ }\mu\text{m}$ de ancho. (**Tabla 9-3**).

Según Huda et al., (2021), menciona que los aislados de *Diaporthe* sp. producen colonias blanquecinas, grisáceas o parduscas, en Papa Dextrose Agar (PDA), y se observan conidios α y β , los conidios α son aseptados, hialinos y fusiformes, y los conidios β son rectos, filiformes aseptados hialinos.

3.2.4. *Daldinia* sp.

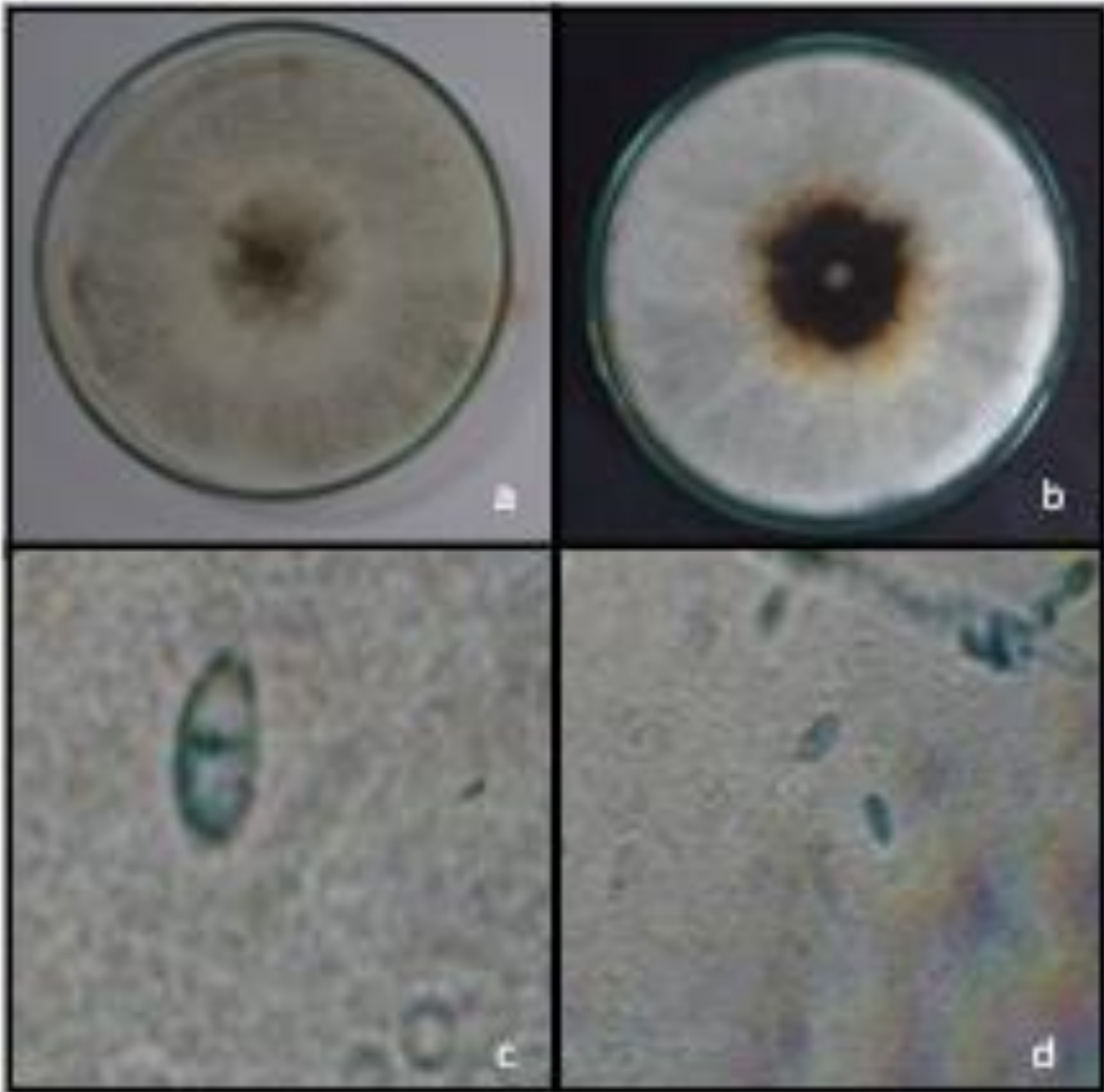


Figura 16-3. Características culturales de *Daldinia* sp. crecido en medio PDA a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e incubados durante 8 días. (a, b).

El aislado con el código (CS9) corresponde a *Daldinia* sp. crecido en medio PDA a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ con una tasa de crecimiento micelial de 9,4 mm. día, una coloración café claro en el anverso, y en el reverso un color blanco con café oscuro en el centro, bordes irregulares y sin presencia de elevación del micelio. (**Tabla 8-3**). Se observó conidios de color café claro, con medidas de $3\text{ }\mu\text{m}$ de largo x $1.5\text{ }\mu\text{m}$ de ancho. (**Tabla 9-3**).

Tabla 8-3: Características culturales de los aislados del cultivo de pitahaya.

Código	Cepa	Margen	Elevación	Color anverso	Color reverso	TCM (mm/día)
PLYPa.I	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	irregular	Alta	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	20,8
MX2.5	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	irregular	alta	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	19,6
MX1.11	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	irregular	Alta	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	20,5
PJNa.6	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	irregular	Alta	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	21,8
PGL2.1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	irregular	Alta	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	19,2
GR16	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	irregular	Alta	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	23,2
HL11	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	irregular	Alta	Blanco grisáceo	Blanco grisáceo	15,4
MX1.2 R3	<i>Fusarium oxysporum</i>	regular	No	Blanco	Blanco	9,7
CS9	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	Irregular	No	Marrón y blanco	Marrón y blanco	9,4
KC3	<i>Diaporthe</i> sp	Regular	No	Blanco	Blanco	3,7
M3R2	<i>Diaporthe</i> sp.	irregular	poco	Café claro	Café claro	15,2

Realizado por: Yumbla, Johanna, 2022.

Tabla 9-3: Identificación morfológica de los aislados obtenidos del cultivo de pitahaya de acuerdo con las medidas de longitud y ancho de los conidios.

Código	Cepa	CONIDIOS					
		Ancho (µm)			Longitud (µm)		
		Máximos	Mínimos	\bar{x}	Máximos	Mínimos	\bar{x}
PLYPa.I	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	7	5	6	11	9	10
MX2.5	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	7	5	6	12	7	9,5
MX1.11	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	7	5	6	12	8	10
PJNa.6	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	6	4	5	11	6	8,5
PGL2.1	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	7	5	6	12	8	10
GR16	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	6	5	5,5	13	8	10,5
HL11	<i>Lasiodiplodia</i> sp.	6	4	5	14	8	11
MX1.2 R3	<i>Fusarium</i> sp.	2	1	1,5	3	2	2,5
CS9	<i>Daldinia</i> sp.	2	1	1,5	4	2	3
M3R2	<i>Diaporthe</i> sp.	2	1	1,5	5	2	3,5

Realizado por: Yumbla, Johanna, 2022.

3.3. Caracterización molecular de los aislados fúngicos obtenidos.

Las secuencias de nucleótidos obtenidos y alineados con las base de datos BLAST del Centro Nacional de Información Biotecnológica indicó que los aislados PLYPa.I.1 corresponde a *Lasiodiplodia theobromae* (ITS) con un porcentaje de identidad del 100%, (EF) con un porcentaje de identidad de 99, 85 % y (β - Tubulina) con un porcentaje de identidad de 99,53%; HL.11 corresponde a *Lasiodiplodia theobromae* (ITS) con un porcentaje de identidad del 100%, (EF) con un porcentaje de identidad de 93,55 % y (β - Tubulina) con un porcentaje de identidad de 99,75%; MX1.11 corresponde a *Lasiodiplodia theobromae* (ITS) con un porcentaje de identidad del 100%, (EF) con un porcentaje de identidad de 99, 36 % y (β - Tubulina) con un porcentaje de identidad de 99,51%; MX2.5 corresponde a *Lasiodiplodia theobromae* (ITS) con un porcentaje de identidad del 100%, (EF) con un porcentaje de identidad de 99, 52 % y (β - Tubulina) con un porcentaje de identidad de 99,75%; GR16 corresponde a *Lasiodiplodia theobromae* (ITS) con un porcentaje de identidad de 99.81 y (β - Tubulina) con un porcentaje de identidad de 99,52%; PJNa.6 corresponde a *Lasiodiplodia theobromae* (ITS) con un porcentaje de identidad del 100%, (EF) con un porcentaje de identidad del 100 % ; PGL2.1 corresponde a *Lasiodiplodia theobromae* (ITS) con un porcentaje de identidad del 100%, y (EF) con un porcentaje de identidad de 79,67 %.

El aislado M3R2 corresponde a la especie identificada *Diaporthe* sp. (ITS) con un porcentaje de identidad del 93.10%, y (EF) con un porcentaje de identidad de 96,17 % ; el aislado KC3 corresponde a *Diaporthe miriciae* (ITS)con un porcentaje de identidad del 92.90 % y (EF) con un porcentaje de identidad de 78,15 % ; el aislado MX1.2 R3 se identificó como *Fusarium oxysporum* (ITS) con un porcentaje de identidad del 100%, y (EF) con un porcentaje de identidad de 99.74 %; y el aislado CS9 corresponde a la especie identificadas como *Daldinia eschscholtzii* (ITS) con un porcentaje de identidad del 99.81%. **(Tabla 10-3).**

Tabla 10-3: Identificación molecular de los aislados obtenidos, alineados con las especies mantenidas en la base de datos BLAST.

Código	Gen amplificado	Número de nucleótidos	Especies identificadas	Número de acceso al Gen Bank	Porcentaje de identidad	Cobertura	Origen
PLYPa.II	Espacios Internos Transcritos (ITS)	505	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MG9484601	100,00	100	China
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	686	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	GQ469898.1	99,85	100	Sur Africa
	β - Tubulina	433	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	XM_035512034.1	99,53	97	Indonesia
HL.11	Espacios Internos Transcritos (ITS)	502	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MT644474.1	100,00	100	China
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	379	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	KX464640.1	93,55	73	Australia
	β - Tubulina	408	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	XM_035512034.1	99,75	98	Indonesia
MX1.11	Espacios Internos Transcritos (ITS)	499	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MT644474.1	100,00	100	China
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	157	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MN629743.1	99,36	100	Tailandia
	β - Tubulina	408	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	XM_035512034.1	99,51	100	Indonesia
MX2.5	Espacios Internos Transcritos (ITS)	505	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MT644474.1	100,00	100	China
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	631	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MK495411.1	99,52	100	Brazil
	β - Tubulina	401	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	XM_035512034.1	99,75	99	Indonesia
GR16	Espacios Internos Transcritos (ITS)	519	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MK834672.1	99,81	100	China
	β - Tubulina	413	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	XM_035512034.1	99,52	100	Indonesia
PJNa.6	Espacios Internos Transcritos (ITS)	506	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	MT644474.1	100,00	100	China

	Factor de Elongación y Traducción (EF)	531	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	KF886731.1	100,00	100	Sur Africa
PGL2.1	Espacios Internos Transcritos (ITS)	515	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	OM319565.1	100,00	100	India
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	254	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	KYO24622.1	79,67	92	Sur Africa
M3R2	Espacios Internos Transcritos (ITS)	495	<i>Diaporthe</i> sp.	MZ207907.1	93,10	98	Mexico
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	449	<i>Diaporthe</i> sp.	MF085049.1	96,17	98	Brazil
KC3	Espacios Internos Transcritos (ITS)	579	<i>Diaporthe miriciae</i>	MH268404.1	92,90	100	Taiwan
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	476	<i>Diaporthe miriciae</i>	MH368012.1	78,15	91	Taiwan
MX1.2R3	Espacios Internos Transcritos (ITS)	522	<i>Fusarium oxysporum</i>	MTO32694.1	100,00	100	USA
	Factor de Elongación y Traducción (EF)	389	<i>Fusarium oxysporum</i>	MK968952.1	99,74	100	Algeria
CS9	Espacios Internos Transcritos (ITS)	536	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	MZ270647.1	99,81	100	Mexico

Realizado por: Yumbra, Johanna, 2022.

Según Suaréz et al., (2021) menciona que para la identificación morfológica se debe tener en cuenta dos parámetros en especial el E-value, cuyo valor debe estar próximo a un puntaje de 0,0 y la identidad con un porcentaje del 90 al 100 %. Aunque los niveles de identidad son significativos y, a pesar de que la región ITS es considerada un código de barras para la identificación taxonómica de hongos, el uso estándar de estos cebadores durante la PCR puede generar sesgos, incurriendo al error en la secuencia, generando una predisposición en la clasificación de especies dentro de las divisiones basidiomicetos y ascomicetos, dependiendo de los iniciadores utilizados. Por lo que es recomendable usar otros indicadores para comparar los resultados de las especies obtenidas. De acuerdo a lo mencionado se puede confirmar que todas los aislados presentan un porcentaje de identidad mayor al 92,90 % y un valor E de 0,0. en la región ITS.

3.4. Caracterización de la patogenicidad de los aislados fúngicos obtenidos.

De las inoculaciones realizadas, solamente los cladodios que se usaron el método con herida presentaron síntomas en todas las repeticiones, los síntomas que más se observaron fueron: manchas circulares necróticas con bordes anaranjados y algunas manchas blanquecinas con puntuaciones negras. (Tabla 11-3).

Tabla 11-3: Caracterización de la patogenicidad de los aislados inoculados.

Código	Cepa	Métodos de inoculación		Reaislado
		Con herida	Sin herida	
		Síntoma	Síntoma	
PLYPa.I	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Manchas circulares necróticas con bordes ligeramente anaranjados y desprendimiento del tejido vegetal (Figura 16-3).	No	Se recuperó
PJNa.6	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Pequeñas manchas oscuras con bordes anaranjados (Figura 19-3).	No	Se recuperó
PGL2.1	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Manchas circulares necróticas con desprendimiento del tejido vegetal (Figura 20-3).	No	Se recuperó
HL.11	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Manchas oscuras con bordes ligeramente pigmentados de color naranja y desprendimiento del tejido	No	Se recuperó

		vegetal (Figura 22-3).		
MX1.11	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Manchas necróticas con desprendimiento del tejido vegetal (Figura 18-3).	No	Se recuperó
MX2.5	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Manchas oscuras con puntuaciones Negras y bordes anaranjados (Figura 17-3).	No	Se recuperó
GR16	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	Manchas circulares de color gris con presencia de puntuaciones Negras y desprendimiento del material vegetal (Figura 22-3).	No	Se recuperó
M3R2	<i>Diaporthe sp.</i>	Manchas de color café claro (Figura 26-3).	No	Se recuperó
KC3	<i>Diaporthe miriciae</i>	Manchas de color blanco con ligero oscurecimiento en el centro (Figura 25-3).	No	No se recuperó
MX1.2R3	<i>Fusarium oxysporum</i>	Manchas blanquecinas con bordes anaranjados (Figura 23-3).	No	Si se recuperó
CS9	<i>Daldinia eschscholtzii</i>	Manchas de color café claro con un borde blanquecino. (Figura 27-3).	No	No se recuperó

Realizado por: Yumbla, Johanna, 2022.

3.4.1. Sintomatología obtenida con cada una de las cepas inoculadas.

Con respecto a *Lasiodiplodia theobromae* la sintomatología que se observó en los cladodios inoculados fue similar a la sintomatología que presentaron los cladodios recolectados de las diferentes localidades de Pedro Vicente Maldonado. Entre los síntomas se observa manchas circulares naranjas con oscurecimiento en el centro (**Figura 18-3**) desprendimiento del tejido vegetal (**Figura 17-3**), manchas blanquecinas con bordes anaranjados (**Figura 20-3**), manchas circulares grisáceas con presencia de puntuaciones negras (**figura 22-3**).

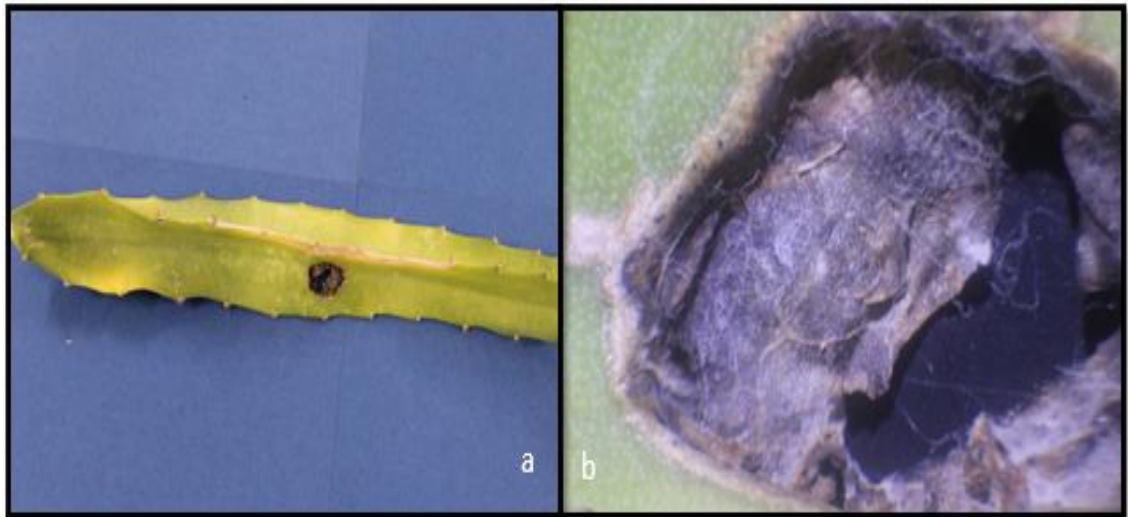


Figura 17-3. *Lasiodiplodia theobromae* (PLYPaI.1). Cladodio inoculado por el método con herida.

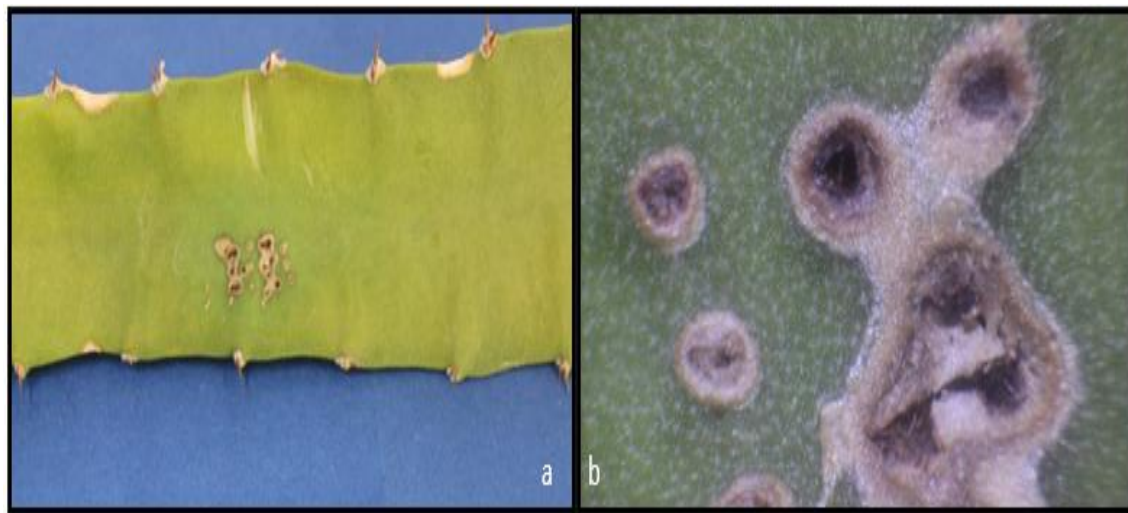


Figura 18-3. *Lasiodiplodia theobromae* (MX2.5) Cladodio inoculado por el método con herida.



Figura 19-3. *Lasiodiplodia theobromae* (MX1.11) Cladodio inoculado por el método con herida.

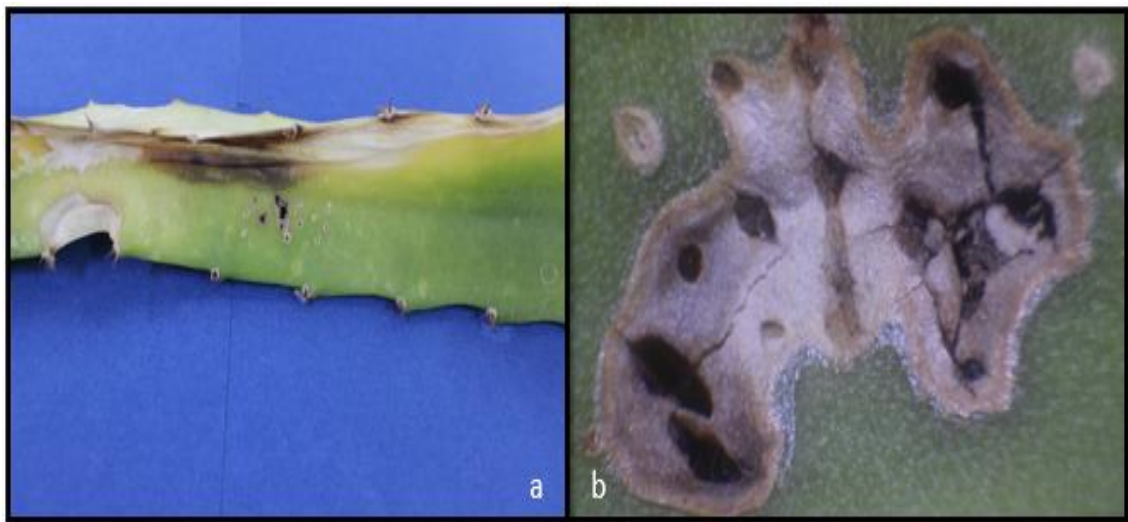


Figura 20-3. *Lasiodiplodia theobromae* (PJNa.6) Cladodio inoculado por el método con herida.

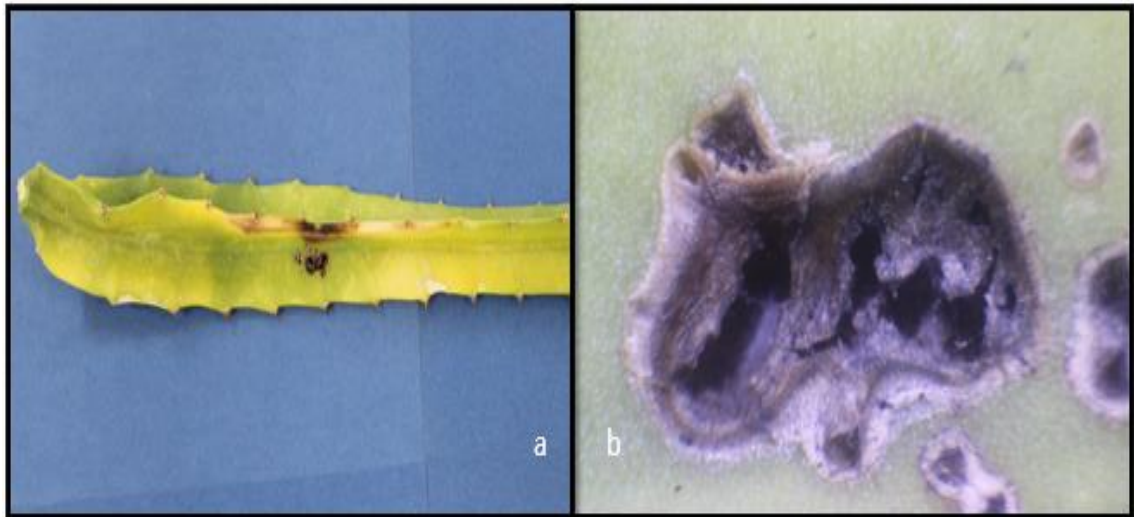


Figura 21-3. *Lasiodiplodia theobromae* (PGL2.1). Cladodio inoculado por el método con herida.

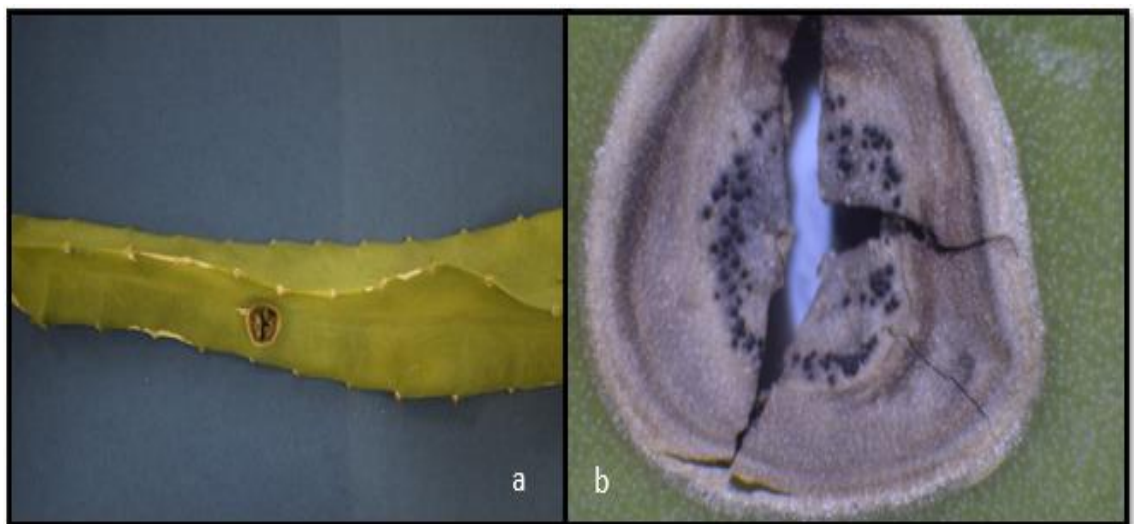


Figura 22-3. *Lasiodiplodia theobromae* (GR.16). Cladodio inoculado por el método con herida.

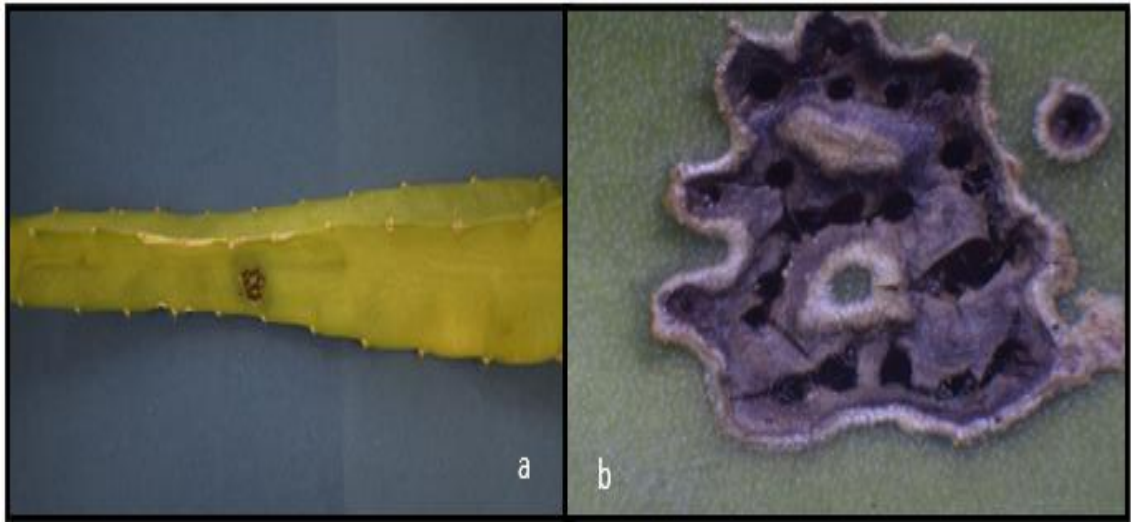


Figura 23-3. *Lasiodiplodia theobromae* (HL.11). Cladodio inoculado por el método con herida.

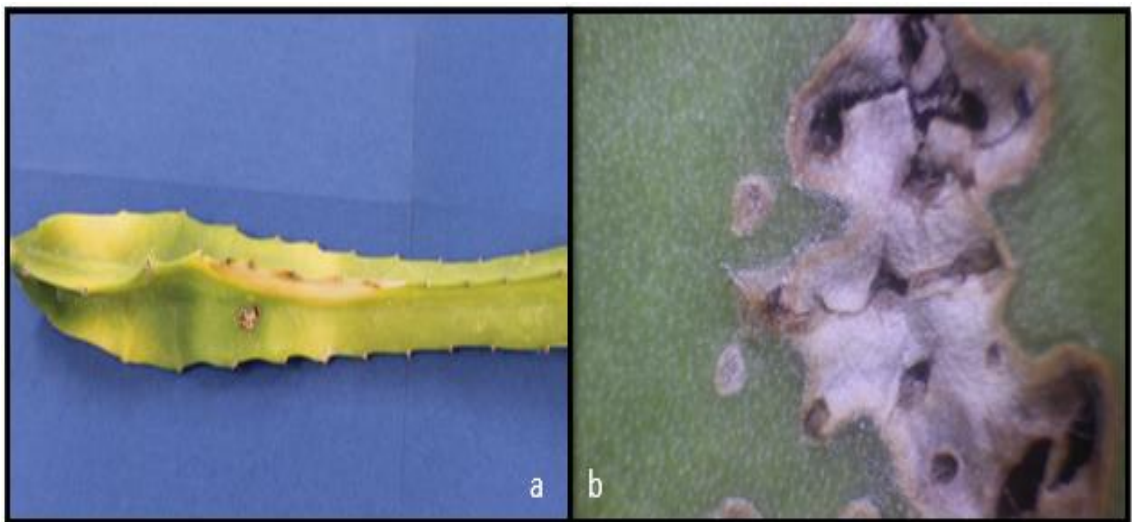


Figura 24-3. *Fusarium oxysporum* (MX1.2 R3). Cladodio inoculado por el método con herida.
(b) Manchas blanquecinas con pigmentación naranja en los bordes.

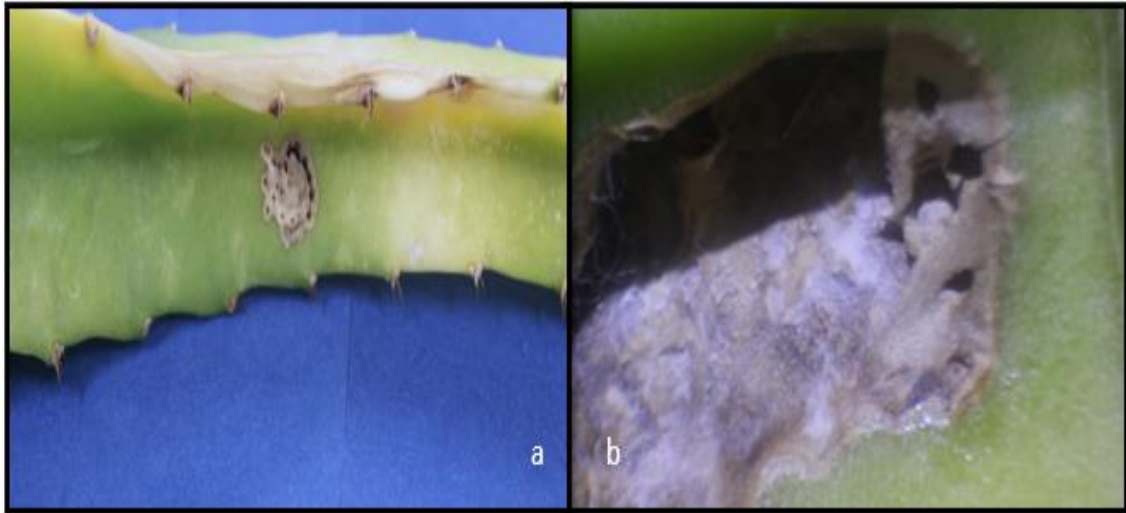


Figura 25-3. *Diaporthe* sp. (KC3). Cladodio inoculado por el método con herida. (a) Manchas blanquecinas con bordes ligeramente anaranjados.

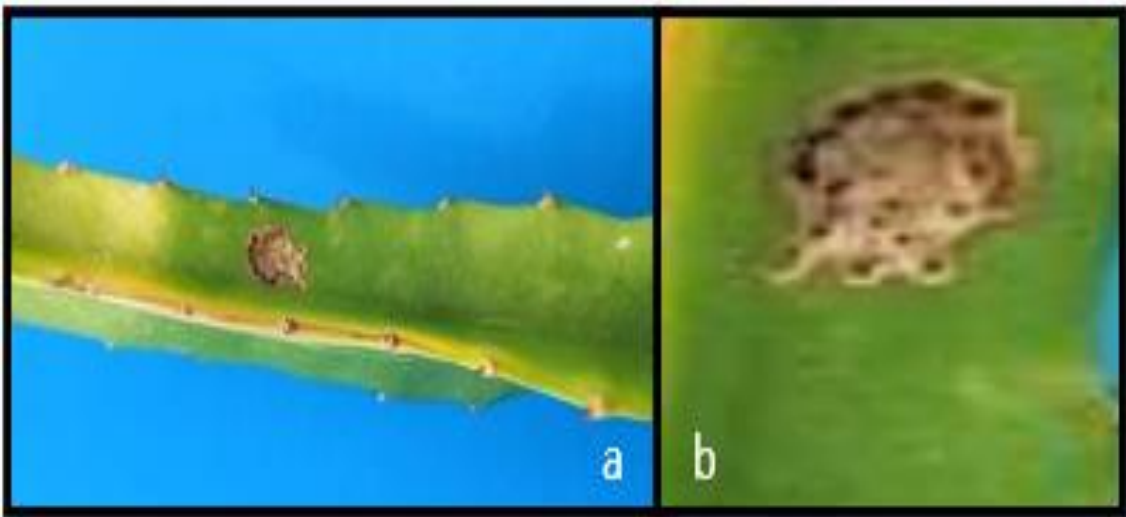


Figura 26-3. *Diaporthe* sp. (M3R2). Cladodio inoculado por el método con herida. (a, b) Manchas de color café claro.

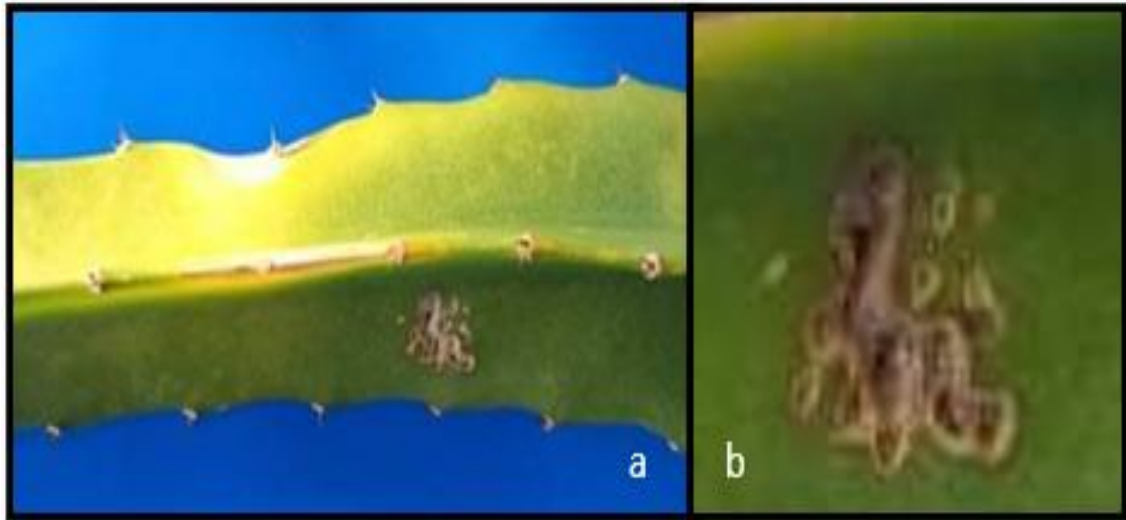


Figura 27-3. *Daldinia*. (CS9). Cladodio inoculado por el método con herida. (a) Manchas de color café claro, (b) Manchas de color café con un borde blanquecino.

Según Huda et al., (2021), menciona que el síntoma que se puede observar en *Diaporthe* sp. es una lesión amarillenta rodeada de un borde rojizo, que gradualmente se convirtió en una herida hundida de color marrón oscuro, a medida que la enfermedad progresaba la herida tomaba una apariencia seca y tornada de color gris. Entonces de acuerdo con la sintomatología citada se puede apreciar que es similar a la que se pudo observar en los cladodios de pitahaya inoculados.

Ploetz, (2003) menciona que la principal vía de entrada de *L. theobromae* a los hospederos es a través de heridas producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales, esto concuerda con el trabajo realizado en el invernadero ya que de los diferentes aislados inoculados los síntomas antes mencionados solo se pudo observar en los cladodios que se aplicó el método con herida.

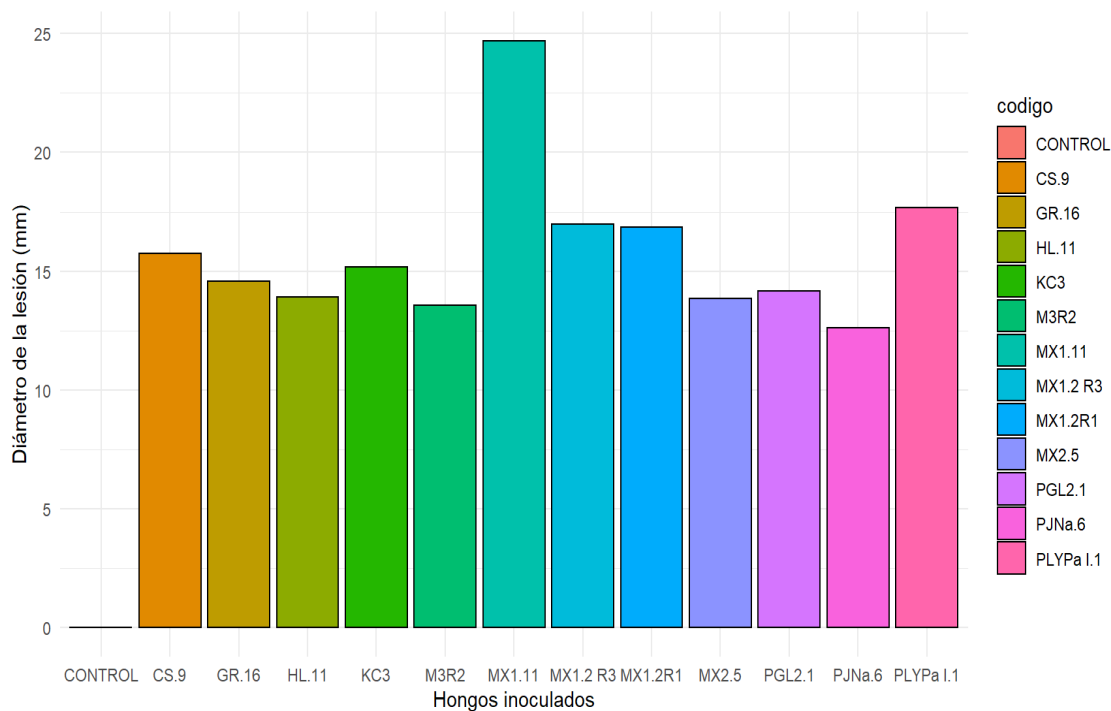


Gráfico 1-3. Diámetro (mm) de las lesiones de los diferentes aislados inoculados con herida.

Realizado por: Yumbla, Johanna, 2021.

El aislado que presentó el mayor diámetro en la herida fue MX1.11, correspondiente a *Lasiodiplodia teobromae*, con un diámetro de 24,68 mm/semana, y el que presento menor diámetro fue el aislado PJNa.6 correspondiente a *Lasiodiplodia teobromae*, con un diámetro de 12,62 mm/ semana (**Gráfico 1-3**).

Por otro lado, el aislado correspondiente a *Fusarium oxysporum* (MX1.2 R3) presenta un diámetro de 16,99 mm/ semana, el aislado correspondiente a *Daldinia* sp. (CS9) tiene un diámetro de 15,75 mm/semana, y el aislado de *Diaporthe* sp el de mayor (KC3) con un diámetro de 15,17 mm/semana, y el de menor (M3R2) con un diámetro de 13,57 mm/semana (**Gráfico 1-3**).

La prueba de rangos múltiples de Tukey =0,05 para los diferentes aislados presentaron 3 grupos estadísticos; en el grupo “a” se encuentra el aislado MX1.11 con un diámetro de 24,68, en el grupo “b” tenemos los aislados PLYPaI.1; MX1.2 R3; MX1.2R1; CS9; KC3; GR16; PGL2.1; HL11; MX2.5; M3R2; PJNa.6, y en el grupo “c” pertenece a la muestra control con un valor de 0.00. (**Tabla 12-3**)

Tabla 12-3: Test de Tukey al 0,05 del crecimiento de las lesiones de los diferentes aislados inoculados con herida.

Código	Diámetro promedio	Rangos de significancia
MX1.11	24,68333	a
PLYPa.I	17,66667	b
MX1.2 R3	16,99000	b
MX1.2 R1	16,85000	b
CS9	15,75333	b
KC3	15,17333	b
GR16	14,58000	b
PGL2.1	14,16667	b
HL11	13,92000	b
MX2.5	13,86333	b
M3R2	13,57667	b
PJNa.6	12,62667	b
Control	0,00000	C

CONCLUSIONES

- Los aislados obtenidos en campo de las diferentes localidades en la Provincia de Pichincha, asociados a los síntomas de cáncer en los cladodios de pitahaya se caracterizaron cultural, morfológica y molecularmente como *Lasiodiplodia theobromae* (PLYPaI.1; MX2.5: MX1.11: PJNa.6; PGL2.1), como *Fusarium oxysporum* (MX1.2 R3), como *Diaporthe* sp (M3R2), como *Diaporthe miriciae* (KC3) y *Daldinia* sp. (CS9).
- Los síntomas comúnmente asociados a cáncer de las muestras colectadas fueron muy similares en su totalidad, se identificaron pequeñas manchas circulares anaranjadas con oscurecimiento en el centro, manchas blanquecinas con puntuaciones negras, y desprendimiento del tejido vegetal.
- Los aislados asociados al síntoma de cáncer en el cultivo de pitahaya en la provincia de Pichincha fueron: *Lasiodiplodia theobromae* (PLYPaI.1; MX2.5: MX1.11: PJNa.6; PGL2.1; GR16; HL11), *Fusarium oxysporum* (MX1.2 R3), *Diaporthe* sp (M3R2) los síntomas se desarrollaron exclusivamente en presencia de heridas. Este estudio corresponde al primer reporte a nivel de Ecuador, en donde se reporta a estos hongos como causantes de cáncer en el cultivo de pitahaya.
- Entre los aislados el más agresivo fue MX1.11 (24,68 mm), y el menos agresivo fue PJNa.6 (12,62 mm) ambos corresponden a la especie identificada como *Lasiodiplodia theobromae*,

RECOMENDACIONES

- Realizar un muestreo más extenso en diferentes localidades en la provincia de Pichincha para estudiar los diferentes hongos filamentosos asociados al cáncer de pitahaya.
- Utilizar diferentes regiones para la caracterización molecular de los aislados asociados al cáncer de pitahaya.
- Realizar pruebas de patogenicidad con los aislados que se recuperaron en la inoculación y corroborar la sintomatología obtenidos en la presente investigación.
- Cuantificar el impacto que ocasiona *Lasiodiplodia theobromae* en diferentes cultivos, el modo de infección y la sensibilidad que puede presentar a diversos productos químicos.

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Agar: sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de algas marinas y que se utiliza para preparar medios de cultivo sólidos, con el objeto de estudiar y cultivar los microorganismos (Cabrera, 2019, p.3).

Aislamiento: separación de un patógeno de su hospedante y su cultivo en un medio nutritivo (Ulloa, 2006, p. 18).

Clamidospora: Espora asexual de pared gruesa que se forma por la modificación de una célula de las hifas de un hongo (Ulloa, 2006, p.24).

Conidio: Espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo (Ulloa, 2006, p.22)..

Cultivo: Crecimiento artificial de microorganismos en un medio de nutritivo preparado; colonia de microorganismos mantenidos artificialmente en dicho medio de nutritivo (Ulloa, 2006, p.14).

Daldinia sp.: Con 48 especies a nivel mundial, se caracteriza por presentar peritecios inmersos en estromas globosos a clavados de colores cobrizos, violáceos, vináceos, marrones a negros, liberando pigmentos de colores ocráceos, púrpuras, verdosos y grisáceos en KOH. Está caracterizado por ascas cilíndricas estipitadas con poro apical amiloide, y ascosporas elipsoidales marrones lisas u ornamentadas (Barbosa, 2020, p4).

Diaporthe sp.: Las especies de *Diaporthe* a menudo se han reportado como patógenos de plantas, endófitos no patógenos, comúnmente aislados de una amplia gama de huéspedes (Ulloa, 2006, p.25).

Esporas: Es una célula reproductiva que, principalmente, algunas plantas y hongos pueden producir y que tiene la capacidad de dividirse sucesivamente para acabar formando un nuevo individuo (Ulloa, 2006, p.31).

Inoculación: Acto o proceso de inocular; especialmente la introducción de un patógeno en un organismo vivo (Ulloa, 2006, p.31).

Medio de cultivo: Sistema o sustrato nutritivo que se utiliza para el cultivo artificial de hongos y otros microorganismos (Ulloa, 2006, p.35).

Necrótico: Muerto y decolorado (Ulloa, 2006, p.39).

Patógeno: Entidad que produce enfermedad (Gepp, 2011, p.14).

Picnidio: Cuerpo fructífero asexual, esférico o en forma de botella, que en su interior contiene conidióforos y conidios (Ulloa, 2006, p.43).

PCR (Por sus siglas en ingles reacción en cadena de polimerasa): técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del DNA, aunque sean minúsculas (Ulloa, 2006, p.43).

Primers: los iniciadores de la PCR, también denominados cebadores o primers, son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región, complementaria al DNA molde, que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la Taq DNA polimerasa (Ulloa, 2006, p.47).

Síntoma: Reacciones o alteraciones internas o externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad (Ulloa, 2006, p.43).

BIBLIOGRAFIA

BARBOSA RESÉNDIZ, A.; et al. “The genus *Daldinia* (Sordariomycetes, Ascomycota) in México”. *Acta Botanica Mexicana* [en línea], 2020, (México) 1(127), pp. 1-4. [Consulta: 20 julio 2021]. Disponible en: <https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1600>

BOX, M. *Prontuario de agricultura. Cultivos agrícolas* [en línea]. Madrid-España: Aedos, 2005. pp. 16-18. [Consulta: 20 julio 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=Glts8S4zuWAC&pg=PA897&dq=fertilizaci%C3%B3n+de+la+pitahaya&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwiag56H3b71AhUZRzABHY6TC5M4FBD0AXoEAcQAQAg#v=onepage&q&f=false>

CARDOZO BURGOS, Carolina; et al. *Prácticas Agronómicas en la producción de pitahaya amarilla* [en línea]. Colombia: 2018. pp. 1-15. [Consulta: 24 julio 2021]. Disponible en: https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/19680/64907_63957.pdf?sequence=1&isAllowed=y

CABRERA, A. *Agar-Agar* [en línea]. México: El Universal, 2019. pp. 2-4. [Consulta: 12 febrero 2022]. Disponible en: <https://www.eluniversal.com.mx/menu/que-es-el-agar-agar>

CEPERO, M. *Biología de hongos* [en línea]. Bogotá-Colombia: Uniandes, 2015. p. 225. [Consulta: 22 julio 2021]. Disponible en: <https://books.google.com.ec/books?id=pS2RDwAAQBAJ&pg=PA140&dq=Neoscytalidium+di+midiatum&hl=es-419&sa=X&ved=2ahUKEwilz5a05b71AhXjsDEKHWn1AbIQ6AF6BAgKEAI#v=onepage&q&f=false>

CRUZ SÁNCHEZ, E.; et al. “Respuesta de la pitahaya roja (*Hylocereus undatus*) a la aplicación de dos abonos orgánicos sólidos en la zona de San Carlos, Los Ríos, Ecuador” [en línea], 2019, (Ecuador) 37(3), pp. 2-3. [Consulta: 22 julio 2021]. ISSN 0718-3429 Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-34292019000300099

GARCÍA, M. *Pitaya Cosecha Y Postcosecha* [en línea]. Tibaitatá-Colombia: Pronatta, 2003. pp. 8-15. [Consulta: 20 julio 2021]. Disponible en:

https://books.google.com.ec/books?id=hGc0pGGO6VYC&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

GEPP, V. *Aislamiento de hongos fitopatógenos* [en línea]. Ecuador: 2011. pp. 12-14 [Consulta: 12 febrero 2022]. Disponible en: https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=http%3A%2F%2Fwww.pv.fagro.edu.uy%2Ffitopato%2Fcursos%2Fdiag_Met%2FAisla_hongosBN.ppt&wdOrigin=BROWSELINK

HUDA, A.; *Diaporthe species causing stem gray blight of red-fleshed dragon fruit (Hylocereus polyrhizus) in Malaysia* [en línea]. Malasia: scientific reports, 2021, p. 3 [Consulta: 12 abril 2022]. Disponible en: [s41598-021-83551-z \(1\) \(1\).pdf](https://doi.org/10.1038/s41598-021-83551-z)

INFOAGRO. *EL cultivo de Pitahaya.* [en línea]. México: 2012. pp. 3-4 [Consulta: 22 de julio 2021]. Disponible en: https://infoagro.com/documentos/el_cultivo_pitahaya.asp#menuHeaderSectors

INIAP. *Cultivos De La Amazonia Ecuatoriana* [en línea]. Quito-Ecuador : ECORAE, 2001. pp. 77-84. [Consulta: 20 julio 2021]. Disponible en: https://books.google.com.ec/books?id=dYgzAQAAMAAJ&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

JIMÉNEZ MARTINEZ, E.; et al. “*Identificación de las principales plagas que afectan la pitahaya (Hylocereus undatus Britt and Rose) en Carazo, Nicaragua*”. [en línea], 2018, (Nicaragua), 26(01), pp. 192–209. [Consulta: 22 julio 2021]. ISSN 1997-9231 Disponible en: <https://doi.org/10.5377/rci.v26i01.9894>

MARTÍNEZ, P. *Manejo de Lasiodiplodia Theobromae y otros hongos de madera con Atlante Plus (Ácido Salicílico y Fosfonato de potasio) en el cultivo del palto* [en línea]. Perú: Atlántica Agrícola, 2017. p.2. [Consulta: 20 julio 2021]. Disponible en: <https://www.redagricola.com/pe/manejo-lasiodiplodia-theobromae-otros-hongos-madera-atlante-plus-acido-salicilico-fosfonato-potacio-cultivo-del-palto/>

MORA, P. *Manejo fitosanitario del cultivo de la pitahaya* [en línea]. Bogotá-Colombia: ICA, 2012. pp. 8-10. [Consulta: 14 diciembre del 2020]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/getattachment/87a2482e-a36a-4380-80ae-11072d0c717c/-nbsp%3BManejo-fitosanitario-del-cultivo-de-pitahaya.aspx>.

PLOETZ, R.; “*Lasiodiplodia theobromae* en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, diversidad y control” *Revista mexicana de fitopatología* [en línea], 2003, (México) 33(1), p. 3 [Consulta: 20 Mayo 2022]. ISSN 2007-8080. Disponible en: www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054

RAVELLO JÁUREGUI, María Sylvia. Caracterización de aislados de *Lasiodiplodia theobromae* asociados a muerte regresiva en manzanos. [En línea] (Trabajo de titulación) (Ingeniería) Universidad de Talca, Facultad de ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía, Chile. 2019. pp. 15-16. [Consulta: 2022-04-21]. Disponible en: <http://dspace.otalca.cl/bitstream/1950/12042/3/20190177.pdf>

RETANA, K. “Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. *Apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica”. *Agronomía Costarricense* [en línea], 2017, (Costa Rica), 42(1), pp. 115-126. [Consulta: 12 febrero 2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/journal/436/43654703006/html/>

RODRIGUEZ, P. *Producción y comercialización de pitahayas en México* Claridades Agropecuarias [en línea]. México: CIESTAAM, 2000. pp. 2-22 [Consulta: 14 diciembre del 2020]. Disponible en: <https://info.aserca.gob.mx/claridades/revistas/082/ca082.pdf>

SALAZAR GONZÁLEZ, C.; et al. “Caracterización molecular de *Fusarium* asociado a pudrición basal del fruto en pitahaya (*Selenicereus megalanthus*)” *Agronomía Mesoamericana* [en línea], 2016, (Costa Rica) 27(2), p. 7. [Consulta: 20 julio 2021]. ISSN 1021-7444 Disponible en: <https://doaj.org/article/e11efea92e724814aaf25ccf66638b22>

SUARÉZ CONTRERAS, L.; & PEÑARANDA FIGUEREDO, F. “Identificación molecular de hongos filamentosos y su potencial biotecnológico”. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* [en línea], 2021, (Colombia) 20(1), pp. 199-204. [Consulta: 12 febrero 2022]. ISSN 1692-3561. Disponible en: [1692-3561-bsaa-20-01-194.pdf](https://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/20-01-194.pdf) (scielo.org.co).

ULLOA, Miguel; & HANLIN, Richard. *Nuevo Diccionario Ilustrado de Micología.* [en línea]. México DF-México: Minnesota-U.S.A.: Revista Mexicana de biodiversidad, 2007. pp. 4-48. [Consulta: 20 Marzo 2022]. Disponible en : https://www.researchgate.net/publication/262546012_Nuevo_diccionario_ilustrado_de_micologia

VERONA RUIZ, A.; et al. “Pitahaya (*Hylocereus spp.*): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos”. *SCIENTA AGROPECUARIA*. [en línea], 2020, (Perú) 11(3), pp. 12-19. [Consulta: 24 julio 2021]. ISSN 2306-6741. Disponible en: <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>

ANEXOS

ANEXO A: RECOLECCION DE MUESTRAS EN LAS DIFERENTES LOCALIDADES DEL CANTON PEDRO VICENTE MALDONADO DE LA PROVINCIA DE PICHINCHA.



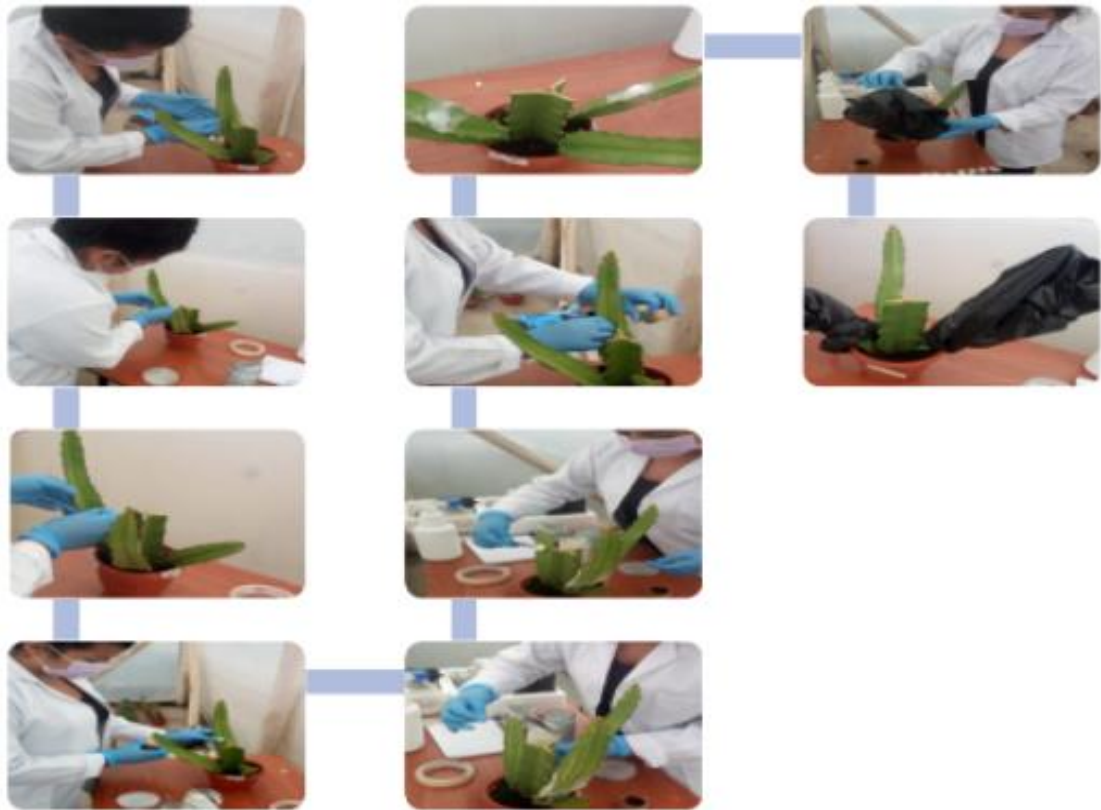
ANEXO B: NÚMERO DE FINCAS MUESTREADAS Y SU UBICACIÓN GEOGRÁFICA.

Finca	Propietario	Localidad	Provincia	Coordenadas geográficas	Ecotipos	
					Pichincha (ha)	Palora (ha)
1	Sr. Cesar Augusto Silva Quinde	Pedro Vicente Maldonado / La Céllica / El Cisne	Pichincha	00°08'56.0"N 79°01'57.3"O		3,0
2	Sra. Norma Lalvay	Pedro Vicente Maldonado / La Céllica / El Cisne	Pichincha	00°09'37.3"N 79°03'13.5"O		1,5
3	Ing. Gustavo Narváez	Los Bancos	Pichincha	00°02'30.0"N 78°54'33.8"O		8,0
4	Sr. Guillermo Rojas	Pedro Vicente Maldonado / La Céllica / 15 de mayo	Pichincha	00°13'51.0"N 79°08'03.9"O		
5	Sr. Klever Chela	Pedro Vicente Maldonado	Pichincha	00°05'52.1"N 79°03'26.5"O		3,0
6	Sr. Cristian Merino	Pedro Vicente Maldonado / La Céllica / 15 de mayo	Pichincha	00°13'11.8"N 79°08'13.2"O		3,0
7	Ing. Mario Moscoso	Pedro Vicente Maldonado / Bonanza	Pichincha	00°08'02.9"N 79°06'13.5"O		22,0
8	Ing. Marco Reyes	Puerto Quito / Nuevo Ecuador	Pichincha	00°15'05.1"N 79°09'11.0"O		5,0
9	Sr. Jonathan Granda	Pedro Vicente Maldonado / La Céllica / 15 de mayo	Pichincha	00°14'13.6"N 79°08'42.3"O		4,0
10	Sr. Alfonso Villagomez	La Céllica / vía 15 de mayo	Pichincha	00°10'36.9"N 79°05'06.4"O		2,5
11	Sr. Bolívar Arévalo	Nanegal	Pichincha	00°13'12.7"N 78°41'19.4"O		6,0
12	Sr. Luis Yépez	15 de mayo/La Céllica, cantón Pedro Vicente Maldonado	Pichincha	00°13'08.3"N 79°06'43.7"O	1,0	3,0
13	Sr. Gabino Góngora	15 de mayo/La Céllica, cantón Pedro Vicente Maldonado	Pichincha	00°13'36.8"N 79°08'07.0"O		6,0
14	Sr. Rodrigo Yépez	La Céllica, cantón Pedro Vicente Maldonado	Pichincha	00°09'51.3"N 79°05'00.2"O		2,0
15	Sr. Marcelo Jumbo	Pedro Vicente Maldonado	Pichincha	00°04' 55.3"N 79°03'21.7"O	0,5	0,5

ANEXO C: PREPARACIÓN DE CLADODIOS PARA LA INOCULACIÓN.



ANEXO D: INOCULACION DE DIFERENTES AISLADOS FUNGICOS EN PLANTAS DE PITAHYA.



ANEXO E: REGISTRO DE DATOS SEMANALES DE LAS HERIDAS DE LOS CLADODIOS EN EL INVERNADERO



ANEXO F: GELES DE AGAROSA DE LOS DIFERENTES PRODUCTOS DE PCR

