

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Caracterización e identificación molecular de agentes patógenos en el cultivo de pitahaya en Ecuador

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Biólogo

Presentado por:

Joel Washington Tumbaco Miño

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2021

DEDICATORIA

A mis abuelas, Ana María y Ricardina. Por haberme cuidado y querido tanto. Confío que, desde el cielo, me sigan protegiendo y guiando en todo momento.

A mis padres, Carlota y Ausberto. Por enseñarme buenos valores, como no rendirse frente a las adversidades, ser humilde y honesto, y luchar por mis sueños. Los quiero muchísimo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento...

A mis padres, por haberme cuidado en todas las etapas de mi existencia, por haberme apoyado incondicionalmente y haberme facilitado los estudios. Y, sobre todo, por darme su amor y la vida.

A mi hermano, Jean Carlos, por haberme protegido en mi niñez y adolescencia.

A mis tías, por darme la oportunidad de seguir adelante con mis futuros proyectos de vida.

A la Facultad de Ciencias de la Vida y sus docentes, por los conocimientos que he adquirido a lo largo de mi carrera.

Al resto de facultades de la Espol, por los conocimientos obtenidos en mis primeros años de carrera.

A la Dra. Lisbeth Espinoza, por guiarme en la consecución de este proyecto y facilitarme los insumos necesarios.

A la Dra. María Fernanda Ratti, por sus enseñanzas y su constante ayuda a lo largo de la elaboración de este proyecto.

A Martha Sumba y Andrea Calero, por su constante apoyo y enseñanzas en las etapas de laboratorio.

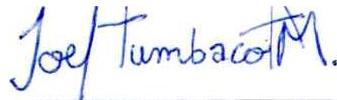
A mis amigos, por todas las experiencias compartidas a lo largo de la carrera y en mi vida personal.

Y a todas aquellas personas que me animaron y me apoyaron en momentos donde más lo necesitaba. Y a todas aquellas que se marcharon y que significaron algo para mí.

A todos ellos, muchísimas gracias.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, me corresponden conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; Yo, Joel Washington Tumbaco Miño doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”.



Joel Tumbaco Miño

EVALUADORES



Firmado electrónicamente por:
**DIEGO ARTURO
GALLARDO
POLIT**

MSc. Diego Gallardo
PROFESOR DE LA MATERIA

LISBETH Firmado digitalmente por
DEL ROCIO LISBETH DEL
ESPINOZA ROCIO ESPINOZA
LOZANO LOZANO
Fecha: 2021.09.27
17:35:19 -05'00'

Lisbeth Espinoza, DPM
PROFESORA TUTORA

RESUMEN

La pitahaya es un cultivo que se ha vuelto trascendental en varios países, entre ellos Ecuador. Una de sus mayores limitantes es la incidencia de plagas y enfermedades que afectan su rendimiento. Éstas son provocadas por agentes fitopatógenos, los cuales incluyen hongos y bacterias, que han sido reportados en otros países y llegan a inducir pérdidas económicas importantes. No obstante, en Ecuador hay escasos estudios sobre estos microorganismos y sus perjuicios en la pitahaya. Por ello, el presente proyecto plantea determinar sus características e identificarlos, mediante estudios morfológicos y moleculares para levantar líneas base sobre su biología. Se recolectaron muestras de tejidos afectados de pitahaya en diversas localidades del país, se aislaron e identificaron los patógenos presentes, de los cuales se estudió dos: *Phytophthora sp.* y *Diaporthe sp.* Se obtuvieron cultivos puros de 3 aislados para ambos, y se evaluó su comportamiento en 3 incubadoras de: 24°C, 28°C y 30°C, bajo luz LED. Asimismo, se extrajo ADN de cada aislado para una posterior identificación molecular. Se determinó que a 30°C se dio la mayor tasa de crecimiento en la mayoría de aislados, pero las temperaturas y el tipo de aislado no influyeron significativamente en el crecimiento de ambos patógenos. Hubo escasa variación en las características morfológicas entre los aislados evaluados, los cuales formaron estructuras reproductivas asexuales y sexuales, predominando la formación de zoosporas y conidios alfa. Con la información obtenida, se logran sentar bases para que próximos estudios determinen la patogenicidad de estos fitopatógenos.

Palabras Clave: Pitahaya, fitopatógenos, cultivos monospóricos, características morfológicas, ADN.

ABSTRACT

The pitaya is a transcendental crop in several countries, including Ecuador. One of its major problems is the incidence of plagues and diseases that affect its performance. These are produced by phytopathogens, which include fungi and bacteria, which has been reported in other countries and incite important economic losses. However, in Ecuador there are few studies about these microorganisms and their damages in pitaya. Por this reason, the present project proposes to determine their characteristics and identify them, through morphological and molecular studies to establish baselines about its biology. Samples of affected pitaya tissues were collected from various localities of the country, the pathogens present in samples were isolated and identified, of which two were studied: Phytophthora sp. y Diaporthe sp. Pure cultures of 3 isolates were obtained for both, and its behaviour was evaluated in 3 incubators of: 24°C, 28°C y 30°C, under LED light. In addition, DNA was extracted from each isolate for subsequent molecular identification. It was determined that at 30 °C, the highest growth rate occurred in most isolates, but temperatures and type of isolate did not significantly influence the growth of both pathogens. There were few variations in morphological characteristics among evaluated isolates, which formed asexual and sexual reproductive structures, predominating the formation of zoospores and alpha conidia. With the obtained information, it is possible to establish bases for future studies to determine the pathogenicity of these phytopathogens.

Keywords: *Dragon fruit, phytopathogens, monosporic cultures, morphological characteristics, DNA.*

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS.....	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	1
1. Introducción	1
1.1 Descripción del problema.....	2
1.2 Justificación del problema	3
1.3 Objetivos	4
1.3.1 Objetivo General.....	4
1.3.2 Objetivos Específicos	5
1.4 Marco teórico	5
1.4.1 Descripción botánica de la pitahaya:	5
1.4.2 Distribución	6
1.4.3 Usos de la pitahaya.....	6
1.4.4 Exportaciones en Ecuador:	7
1.4.5 Fitopatógenos y enfermedades de la pitahaya	7
1.4.6 Descripción de los fitopatógenos sujetos de estudio:.....	9
CAPÍTULO 2	10
2. Metodología	10
2.1 Recolección de muestras en plantaciones de pitahaya	10
2.2 Aislamiento de patógenos	10
2.3 Identificación de patógenos	11
2.4 Obtención de cultivos puros.....	11
2.5 Caracterización morfológica	14
2.6 Identificación molecular	15
CAPÍTULO 3	17
3. Resultados y análisis.....	17

3.1 Resultados	17
3.1.1 Cultivos puros	17
3.1.2 Caracterización morfológica	18
3.1.3 Identificación molecular	26
3.2 Análisis.....	27
CAPÍTULO 4	28
4. Conclusiones y recomendaciones.....	28
4.1 Conclusiones.....	28
4.2 Recomendaciones:	29
BIBLIOGRAFÍA.....	30
APÉNDICES	34

ABREVIATURAS

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
BCE	Banco Central del Ecuador
CORPEI	Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
PDA	Medio de agar, patata y dextrosa
PCA	Medio de agar, patata y zanahoria
V8	Medio con jugo de 8 verduras
CLA	Medio agar hojas de clavel
PDB	Caldo de patata y dextrosa
TC	Tasa de crecimiento
ANOVA	Análisis de Varianza
ITS	Espaciador transcrito interno

SIMBOLOGÍA

mg	Miligramos
m	Metros
cm	Centímetros
ml	Mililitros
μl	Microlitros
h	Horas
rpm	Revoluciones por minuto
pH	Potencial de Hidrógeno
°C	Grados centígrados

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1. Vista superior y del reverso de tres cultivos monospóricos de <i>Phytophthora sp.</i> y una réplica del cultivo de VA.....	17
Figura 3.2. Placas con medio CLA contaminadas.	17
Figura 3.3. Vista superior y del reverso de cinco aislados de <i>Diaporthe sp.</i> a partir de los cuales se obtuvieron los cultivos monospóricos.	18
Figura 3.4. Conidios alfa del aislado D5 y conidios beta del aislado D1 de <i>Diaporthe</i>	18
Figura 3.5. Vista superior y del reverso de placas de <i>Phytophthora</i> ordenadas por temperatura y localidad. De estos cultivos se evaluaron las características morfológicas de interés	19
Figura 3.6. Vista superior y del reverso de placas de <i>Diaporthe</i> ordenadas por temperatura y localidad. De estos cultivos se evaluaron las características morfológicas de interés	19
Figura 3.7. Gráfico de barras de la tasa de crecimiento micelial de los tres aislados de <i>Phytophthora</i> en las temperaturas evaluadas.....	20
Figura 3.8. Gráfico de barras de la tasa de crecimiento micelial de los 3 aislados de <i>Diaporthe</i> en las temperaturas evaluadas.....	21
Figura 3.9. Observación microscópica de los aislados de <i>Phytophthora</i> , incubados a 24°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados de: VA, LU y BA	23
Figura 3.10. Observación microscópica de los aislados de <i>Phytophthora</i> , incubados a 28°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados de: VA, LU y BA	23
Figura 3.11. Observación microscópica de los aislados de <i>Phytophthora</i> , incubados a 30°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados de: VA, LU y BA	24
Figura 3.12. Observación microscópica de los aislados de <i>Diaporthe</i> , incubados a 24°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados: D3, D4 y D5.	25
Figura 3.13. Observación microscópica de los aislados de <i>Diaporthe</i> , incubados a 28°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados: D3, D4 y D5.	25
Figura 3.14. Observación microscópica de los aislados de <i>Diaporthe</i> , incubados a 30°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados: D3, D4 y D5.	26
Figura 3.15. Lista de los niveles de absorbancia en las muestras D3, D4, D5, LU y BA, que indica una escasa cantidad de ADN, insuficiente para seguir con la identificación molecular	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 3.1. Tabla ANOVA de la tasa de crecimiento micelial de los 3 aislados de <i>Phytophthora</i>	20
Tabla 3.2. Tabla ANOVA de la tasa de crecimiento micelial de los 3 aislados de <i>Diaporthe</i>	21
Tabla 3.3. Características morfológicas de los aislados de <i>Phytophthora</i> a 24°C	22
Tabla 3.4. Características morfológicas de los aislados de <i>Phytophthora</i> a 28°C	23
Tabla 3.5. Características morfológicas de los aislados de <i>Phytophthora</i> a 30°C	23
Tabla 3.6. Características morfológicas de los aislados de <i>Diaporthe</i> a 24°C	24
Tabla 3.7. Características morfológicas de los aislados de <i>Diaporthe</i> a 28°C	25
Tabla 3.8. Características morfológicas de los aislados de <i>Diaporthe</i> a 30°C	25

CAPÍTULO 1

1. Introducción

La pitahaya agrupa a un conjunto de plantas que pertenecen a la familia de las cactáceas y que se han adaptado a varias condiciones ambientales de diferentes países de América (Britton & Rose, 1963). Existen dos tipos de pitahaya a nivel mundial: amarilla y roja, y ambas constituyen el género *Hylocereus* (Le Bellec, Vailant, & Imbert, 2006). En los últimos años este cultivo ha cobrado mayor interés comercial en distintos lugares del mundo por el incremento sostenido de su demanda (Esquivel, 2004). Además, es una alternativa agrícola en regiones con escasez de agua, donde su cultivo representa una actividad socio-económica importante para comunidades rurales en México y varias naciones de América, ya que resiste escenarios climáticos restrictivos y necesita de un manejo mínimo. También, esta fruta obtiene buen precio en mercados nacionales e internacionales por considerarse exótica (Castillo, 2006).

En Ecuador, la pitahaya está cobrando gran trascendencia por ser un cultivo no tradicional y poseer un gran potencial para la exportación debido al sabor agradable y dulce de su fruta (Crane & Balerdi, 2005), entre otras propiedades bien valoradas. Por ejemplo, en el 2015, la pitahaya paloreña, que es una variedad cultivada en la amazonia ecuatoriana, fue añadida a la canasta de productos ecuatorianos para el mundo y se inició su exportación a mercados internacionales como Asia, Europa, Perú, Venezuela y Colombia (De la Cueva, 2019).

No obstante, el cultivo de esta fruta presenta varios problemas actualmente: su baja y sectorizada producción, debido a que no se han usado sitios específicos donde cultivarla y la falta de conocimientos de los agricultores. Sin embargo, el sector exportador se encuentra formulando propuestas de valor que promuevan su interés a nivel comercial (Huachi et al., 2015). Además, es afectada por varias plagas y enfermedades causadas por agentes fitopatógenos, reportados en algunos países productores (Montesinos et al., 2015). Entre estos organismos se encuentran *Diaporthe sp.* y *Phytophthora sp.*, de los cuales se tiene escasa información sobre su asociación con la pitahaya y constituyen el objeto de estudio de este proyecto.

Adicionalmente, las plantas varían en la resistencia a enfermedades, vida postcosecha, insolación, periodo de producción y cantidad de frutos. Al ser una planta trepadora necesita de un soporte para cultivarla, lo cual la encarece. En algunos países, la mayoría de la población desconoce del fruto, por lo que si aumenta la producción podría llevar problemas en su comercio. La producción es anual (entre junio a octubre), por lo que en la mayor parte del año no se forman ganancias. Por último, hay enfermedades y plagas que deben identificarse y estudiarse para generar medidas que prevengan y controlen daños. Asimismo, es necesario que la pitahaya no sea huésped de especies de moscas de la fruta para que pueda acceder como fruto fresco a varios mercados, como el japonés y el estadounidense (Castillo, 2006).

1.1 Descripción del problema

Se ha estudiado poco sobre algunas limitantes del desarrollo de pitahaya (Castillo, 2006). Una de estas dificultades es el desarrollo de las enfermedades y plagas, la cual es una de las más relevantes por resolver ya que incide notablemente en la producción de este cultivo (Trujillo, 2014). En varios países se ha reportado la presencia de estos patógenos en la pitahaya y sus agentes causales. Por ejemplo, en México y Colombia se detectaron algunas enfermedades provocadas por microorganismos patógenos como bacterias y hongos, y plagas de insectos que afectan los cultivos (Montesinos et al., 2015). Estos organismos se especifican en la sección 1.4.5.

En Ecuador, hay estudios recientes que han identificado algunas patologías con sus respectivos patógenos causales (Vargas et al., 2020). No obstante, no se conocen con precisión los patógenos asociados al cultivo de pitahaya y los potenciales daños que pueden ocasionar en sus plantaciones (Asistencia Agroempresarial Agribusiness, 1992; Esquivel, 2004). Asimismo, su exportación a mercados internacionales exigentes como el europeo demanda que este fruto tenga un mínimo de calidad y esté libre de enfermedades. Por lo tanto, se vuelven necesarios estudios que caractericen enfermedades que afectan a la pitahaya, así como sus causantes (Trujillo, 2014).

En este proyecto se pretende aislar, identificar y caracterizar dos agentes fitopatógenos del cultivo de pitahaya, mediante estudios de identificación y caracterización de estos microorganismos en laboratorio, a nivel macroscópico, microscópico y molecular. Para ello, se pretende medir rasgos morfológicos y de crecimiento in vitro como la tasa de

crecimiento, forma y color de las colonias. Con el fin de sentar líneas base que contribuyan a que próximas investigaciones establezcan con contundencia su patogenicidad, y que así se tomen las medidas respectivas para su prevención y control. De esta forma, se lograrán evitar pérdidas económicas y que esta fruta tenga la calidad requerida para ser comercializada en el ámbito nacional e internacional.

1.2 Justificación del problema

La pitahaya se ha convertido en una de las frutas no tradicionales con más crecimiento en Ecuador. Las exportaciones pasaron de \$6 millones en el 2006 a \$60 millones en el 2020 (El Universo, 2021). Actualmente, esta fruta se ha vuelto la fuente principal de empleo y sustento para productores en varias zonas del país. Por ejemplo, en el cantón Palora (en la provincia de Morona Santiago) existe la variedad Palora, que es endémica de allí y se ha convertido en la principal fuente de ingresos y trabajo para más de 800 productores del lugar, creando más de 2000 empleos (De la Cueva, 2019).

Además, esta fruta ha conseguido una gran aceptación en el mercado internacional debido a sus propiedades y sabor, entre otros motivos. Así, en 2017 fue la principal fruta exótica de exportación en el país, teniendo una contribución del 82,3% y un crecimiento del 71,3%. En ese año, según el BCE se exportaron 1.811 toneladas métricas a varios países: el 56% llegó hasta Hong Kong, el 12% a Estados Unidos, el 9% a Canadá y a Singapur y el 5% a Francia, así lo precisa la CORPEI (De la Cueva, 2019).

Todos estos hechos resaltan la importancia incipiente que tiene el cultivo de pitahaya en Ecuador, y la necesidad de estudiar sus limitantes, siendo una de las más importantes las enfermedades producidas por fitopatógenos, ya que la presencia de plagas y patologías causa inconvenientes en la producción y calidad de esta fruta, que producen un gran descenso en la rentabilidad para los productores. Una de estas enfermedades, conocida como sarna, provoca daños en tallos y frutos, y es causada por el hongo *Alternaria sp.*, que en condiciones de manejo escaso puede producir hasta 80% de daño en las plantaciones (INIAP, s. f.).

Además, otro autor destaca que, el rendimiento de este cultivo puede reducirse por la presencia de microorganismos como bacterias, hongos y virus, o de algunas plagas de

insectos. Estos patógenos pueden llegar a inducir pérdidas económicas de hasta un 44%. Por ello, los estudios sobre la protección de este cultivo se iniciaron en la década de 1990 en Colombia, Nicaragua y México (Valencia-Botín et al., 2013). Estos daños disminuyen la productividad de esta planta y provocan pérdidas en el rendimiento de hasta 40% en los cultivos de Nicaragua (OIRSA, 1999).

En Ecuador, existe limitada información sobre los patógenos que afectan a esta planta, y esta falta de conocimiento implica un mal control que a su vez aumenta los costos de producción (Suárez, Pico, & Delgado, 2019).

Por todo ello, se vuelve muy necesario el desarrollo de estudios que identifiquen y caractericen las enfermedades que perjudican a la pitahaya ecuatoriana así como a sus causantes. Por lo tanto, este proyecto propone contribuir a la producción de conocimientos científicos relacionados a la biología de los fitopatógenos reportados o por reportar en cultivos de pitahaya del país, obteniendo resultados que permitan formar líneas base para que próximos proyectos puedan definir con mayor evidencia aspectos como: relaciones benéficas o perjudiciales de estos organismos con la pitahaya, patogenicidad en caso de resultar negativa la interacción, las pérdidas económicas o ambientales causadas y medidas de control afines.

De esta forma, al reconocer los patógenos y sus afectaciones, se logrará combatirlos eficazmente y así reducir el riesgo de daño en las plantaciones de pitahaya. Esto implica mayor producción, calidad y rendimiento de este fruto, además de la apertura a más mercados extranjeros que demandan que el producto esté sano; todo ello traerá beneficios económicos para el país, en especial para los productores y demás trabajadores de esta fruta, así como una mejora en su calidad de vida.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar características morfológicas de dos agentes fitopatógenos de cultivos del cultivo de pitahaya mediante pruebas de laboratorio de aislados fúngicos y su identificación para el establecimiento de líneas base de su biología.

1.3.2 Objetivos Específicos

Definir el efecto de la temperatura en el desarrollo de los fitopatógenos en condiciones in vitro para su caracterización.

Comparar la morfología de los fitopatógenos mediante el aislamiento de hongos de distintas localidades, el establecimiento de cultivos monospóricos y la observación de sus caracteres.

Identificar las especies de los fitopatógenos mediante la extracción y secuenciación de su material genético.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Descripción botánica de la pitahaya:

La pitahaya es una planta epífita, trepadora y perenne que requiere de árboles y piedras como soportes para crecer (Rodríguez, 2000). Constituye varias especies que pertenecen a la familia *Cactaceae* y que tienen características morfológicas similares, lo que dificulta su clasificación botánica. Existen cuatro géneros que son de mayor importancia: *Selenicereus sp.*, *Stenocereus sp.*, *Hylocereus sp.* y *Cereus sp.* (Le Bellec, Vailant, & Imbert, 2006). Sus cladodios (tallos) son verdes, suculentos y con función fotosintética, miden entre 0,5 a 1,5 m de largo y 0,03 a 0,06 m de ancho, poseen margen dentado y gruesas aristas longitudinales (entre 3 a 5, que les dan forma triangular). Sus hojas se transforman en acúleos que forman fascículos en las aréolas. Sus flores muy vistosas, que están incrustadas sobre los tallos, son grandes, actinomorfas, hermafroditas y de forma tubular. Esta planta arbustiva llega a alcanzar 2 m y crece óptimamente a una altitud de 800 – 1500 msnm, con temperaturas de 18 – 25°C, en ambientes húmedos y cálidos, reacciona positivamente a la intensidad de luz y se aclimata en suelos drenados con un pH algo ácido (5,5 – 6,5) (ECORAE et al., 2001). Su sistema radicular está formado por una raíz principal poco profunda con función fijadora y raíces secundarias superficiales y ramificadas; además de raíces adventicias que al crecer se introducen en tierra. El fruto es verde previo a su maduración, donde va adquiriendo un color rojo o púrpura en su cáscara y pulpa, o amarillo en su cáscara y blanco en su pulpa, dependiendo de la variedad; pesa entre

200 - 350 g y contiene unas 650 semillas (Bauer, 2012; Le Bellec, Vailant, & Imbert, 2006).

1.4.2 Distribución:

Según Santarrosa (2013): “La pitahaya se produce en regiones subtropicales y tropicales de América. Se encuentra en estado silvestre en México, Venezuela, Colombia, Brasil, Costa Rica y Ecuador. Hay especies cultivadas en Bolivia, Panamá, Curazao, Uruguay, Perú y Vietnam”.

A nivel comercial las variedades más cultivadas pertenecen al género *Hylocereus*, el cual contiene unas 16 especies (Bauer, 2003).

En Ecuador se cultiva la pitahaya roja y amarilla. La roja se siembra en la región Costa, principalmente en Manabí y Guayas. Mientras que la amarilla (la más cultivada del país) se siembra en Pichincha y la región Amazónica, y tiene dos ecotipos: “Pichincha” y “Palora”. Además, no existen estudios botánicos que determinen las especies de pitahayas producidas en el país (Pozo, 2011).

1.4.3 Usos de la pitahaya:

La pitahaya tiene varios usos: el principal es alimenticio, aprovechándose mayoritariamente el fruto, pero también hay consumo de las flores como legumbre y de los brotes tiernos como hortaliza fresca (De Dios, 2004). Las semillas se usan como probióticos, ya que contiene oligosacáridos (Wichienchot, Jatupornpipat, & Rastall, 2010). Además, su pulpa se puede convertir en materia prima para elaborar yogurt, helados, gelatinas, dulces y otros productos industriales; como esencias extraídas de sus flores y suplementos digestivos (FAO-PRODAR, 2006). También tiene propiedades medicinales: que van desde aliviar problemas estomacales hasta endocrinos, y mejora el funcionamiento del tracto digestivo. El beneficio más conocido es su capacidad antioxidante (Chemah, Aminah, & Aida, 2010). Otro compuesto importante son las betalaínas, pigmentos que trabajan junto a antioxidantes como la vitamina C para evitar la muerte celular prematura (Esquivel, P.; Y., Araya, 2012). Asimismo, ayudan a producir colágeno, fortalece los vasos sanguíneos y ayuda a resistir las alergias e infecciones de bacterias y virus (Minschew, 2009).

1.4.4 Exportaciones en Ecuador:

Hong Kong, Estados Unidos, Países Bajos, Rusia, Alemania, Francia y España son los principales consumidores de pitahaya en el mundo (Vargas et al., 2020). Ecuador, en 2019, exportó la fruta a 17 países, siendo Estados Unidos y Hong Kong los principales destinos, con alrededor del 51% y 36% respectivamente (BCE, 2020).

Según Comercio exterior, las exportaciones de pitahaya ecuatoriana han aumentado en los últimos años: llegando a 7.498,80 Tm en 2019, que simbolizaron más de \$44 millones de ingresos para Ecuador; y sólo en el primer trimestre del 2020 se exportaron 5.831,30 Tm que representaron \$28,4 millones FOB. Estos datos evidencian la relevancia paulatina de este fruto en mercados internacionales, y que hay oportunidades para expandirse a otros mercados (BCE, 2020). Además, al ser una fruta exótica, los productores desean ingresar a los mercados de Rusia y China (Vargas et al., 2020).

1.4.5 Fitopatógenos y enfermedades de la pitahaya:

Por otra parte, los patógenos vegetales o fitopatógenos son organismos, mayormente microscópicos, que provocan enfermedades en las plantas, en partes como: hojas, tallos, raíces, sistema vascular y frutos. Comprenden virus, bacterias, hongos, nematodos y plantas parásitas. El fitopatógeno ataca a la planta mediante algunos mecanismos encargados de incrementar la enfermedad y aparición de los síntomas (Nishiguchi et al. 2008; Al-Ani & Furtado, 2020).

Se registran 25 especies y 17 géneros de fitopatógenos que afectan a la pitahaya. La mayoría ocasiona enfermedades fúngicas en tallos, flores y frutos. Existen dos enfermedades bacterianas, una viral y varios nematodos asociados a problemas en este cultivo. Las enfermedades más reportadas son: la enfermedad viral (virus de cactus X), el chancro (*Neoscytalidium dimidiatum*), la antracnosis (*Colletotrichum sp.*), y pudrición de frutos y tallos (*Bipolaris cactivora*) (Balendres & Bengoa, 2019), entre otras.

En México se detectó: la enfermedad ojo de pescado, causada por *Botryosphaeria dothidea* (cuyo estudio permitió establecer a tiempo los síntomas y el método de control) (Valencia, 2002); la pudrición blanda del tallo (en *H. undatus*), que está asociada a dos especies de bacterias; la antracnosis (*Colletotrichum gloesporoides*); la

podrición basal, marchitez y pudriciones de la penca causadas por *Fusarium oxysporum* y daño por fumagina (*Cladosporium*) son las enfermedades más importantes en algunos lugares de México (Araujo & Medina, 2008). Los insectos-plaga más frecuentes son: las chinches patas de hoja (*Leptoglossus phyllopus*, *L. zonatus* y *L. gonagra*), el barrenador de tallos y frutos (*Pyralidae*), el minador de tallos (*Gracilaridae*), *Ceratitiscapitata* y *Anastrephaludens*; las hormigas arrieras (*Acromyrmexocto espinosus*) y las hormigas de fuego (*Solenopsis geminata*) (Suárez, 2011).

En Colombia, en la pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) se registran los siguientes patógenos: *Pectobacterium carotovora*, *Fusarium spp.*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helicotylenchus spp* y *Meloidogyne spp.* (Suárez, 2011). Mientras que, para la pitahaya roja (*Hylocereus spp.*) se mencionan: *Enterobacter cloacae* (Masyahit, Sijam, & Awang, 2009a), *P. carotovora* (Ríos, Villavicencio, Guevara, & Pichardo, 1997), *C. gloeosporioides* (Masyahit, Sijam, & Mohod, 2009b), *Bipolaris cactivora* (Ben-Ze'ev, Assouline, Levy, & Elkind, 2011), *Botryosphaeria dothidea*, *Neoscytalidium dimidiatum* (Chuang et al., 2012) y *Fusarium oxysporum* (Wright, Rivera, & Guirlanda, 2007).

En Ecuador, se han reportado las siguientes plagas: chinche pata de hoja (*Leptoglossus zonatus*), zompopas y hormigas (*Atta sp.* y *Solenopsis sp.*), trips (*Thrips tabaci* y *Frankliniella occidentalis*) (Vargas et al., 2020). De enfermedades causadas por microorganismos se tiene: sarna del tallo y fruta, que afecta a vainas, frutos y tallo, y es causada por el hongo *Alternaria sp.*, la antracnosis, que produce manchas en el tallo y frutos y secado de vainas, es causada por el hongo *Colletotrichum sp.* (Suárez et al., 2019a), la fusariosis provoca la aniquilación parcial o total del sistema radicular y es causada por el hongo *Fusarium sp.* (Suárez et al., 2019b). La pudrición suave bacteriana o bacteriosis, forma manchas en tallos y ramas que acaban en pudrición acuosa, y es causada por la bacteria *Pectobacterium carotovora*. Además, AGROCALIDAD identificó las especies *A. alternata*, *C. gloeosporioides*, *F. solani* y *F. oxysporum* (Mansfield, et al., 2012). En Palora, Delgado et al. (2019) registran que el 97% de nematodos que más daños provocan a las raíces de pitahaya amarilla pertenecen al género *Meloidogyne* y *Helicotylenchus*, con *Tylenchuss* constituyendo el 3%.

Cabe mencionar que para diagnosticar la gran mayoría de enfermedades se necesita la identificación precisa del patógeno/s que las origina, porque los síntomas que inducen

son tan imprecisos o variables que provocan confusión, o porque diferentes patógenos causan un síntoma parecido en la misma especie vegetal (Sosa-Moss et al., 1996). Esta es una más de las razones que vuelve imprescindible la actividad de identificar y caracterizar fitopatógenos.

1.4.6 Descripción de los fitopatógenos sujetos de estudio:

En el proyecto se han identificado algunos de los fitopatógenos mencionados antes, en cultivos de pitahaya ecuatoriana, además de otros que no han sido reportados. Concretamente, los microorganismos que se van a estudiar en este trabajo pertenecen a los géneros: *Diaporthe sp.* y *Phytophthora sp.*

Diaporthe sp. es un grupo de hongos ascomicetos. Las especies de *Diaporthe* pueden actuar como fitopatógenos, saprófitos o simbiontes endofíticos. Rahim et al. (2021) indica que varios estudios informaron que estos microorganismos son responsables de múltiples enfermedades destructivas, como: pudrición de raíces y frutos, muerte regresiva, canchales del tallo, manchas foliares, tizón de hojas y vainas, y pudrición de semillas. Además, se detectó recientemente una enfermedad nueva causada por este género en el tallo de la pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) en Malasia (tizón gris) (Rahim Huda-Shakirah et al., 2021). Cabe mencionar que *Diaporthe* es un teleomorfo que forma ascosporas (etapa sexual) y *Phomopsis* es un anamorfo que forma conidios alfa y beta (etapa asexual) (Barnett & Hunter, 2006).

Phytophthora sp. pertenece al grupo de oomicetos (protistas con características fúngicas) que forman oosporas (sexuales) o zoosporas (asexuales), y clamidosporas como estructuras de resistencia. Constituye diferentes especies que son patógenos hemibiotróficos de elevada trascendencia en siembras forestales y agrícolas porque originan pérdidas económicas grandes en muchas especies vegetales en el mundo (Soto Plancarte et al., 2017). No obstante, no se han encontrado reportes de este microorganismo en la pitahaya.

CAPÍTULO 2

2. METODOLOGÍA

Para cumplir con los objetivos de este proyecto se plantearon seis fases en las que se incluyen: i. Recolección de muestras en plantaciones de pitahaya. ii. Aislamiento de patógenos. iii. Identificación de patógenos. iv. Obtención de cultivos puros. v. Caracterización morfológica. vi. Identificación molecular.

21 Recolección de muestras en plantaciones de pitahaya

Se seleccionaron fincas de producción de pitahaya roja, amarilla y púrpura en varias localidades de la Costa y en una de la Sierra ecuatoriana. Las zonas se ubicaron en las provincias de: Esmeraldas, Santo Domingo, Manabí, Los Ríos, Guayas, Santa Elena y Loja, concretamente en los siguientes sectores: La Unión, Valle hermoso, Tres Charcos, Balzar, Loja, La Laguna, Limoncito, Chanduy, Balzar, Los Ángeles, Rocafuerte, Naranjito, Bucay, Mina de oro, Barranco prieto y Mocache. En estas plantaciones se colectó material vegetal de frutos y cladodios con diferentes sintomatologías. Posteriormente este material fue trasladado al laboratorio de botánica y entomología para su procesamiento.

22 Aislamiento de patógenos

Materiales y equipos:

- Vaso de precipitados
- Tijeras para cortar tejido vegetal
- Cajas de Petri (tamaño estándar)
- Bisturí
- Mechero
- Medios de cultivo generales
- Incubadora

Una vez que las muestras de tejido de pitahaya se llevaron al laboratorio, se seleccionaron partes infectadas y zonas sanas, que fueron sometidas a un proceso de

limpieza y esterilización (para evitar la posible contaminación de microorganismos que pudieran ingresar previamente): se realizó una limpieza en la superficie de las muestras mediante alcohol al 70%, agua destilada estéril e hipoclorito de sodio al 5%, y se secaron en un ambiente estéril.

Posteriormente, éstas se colocaron en medios de cultivo generales para el crecimiento de microorganismos y se incubaron por 7 días. Luego, se revisaron las placas y se observaron las características macro y microscópicas de cada una de ellas para su identificación preliminar y posterior purificación.

23 Identificación de patógenos

Materiales y equipos:

- Microscopio óptico
- Azul de lactofenol
- Agua destilada estéril
- Porta y cubreobjetos
- Cinta adhesiva
- Tijeras
- Mechero

Una vez obtenidas las colonias, se observaron las placas y se anotaron las características macroscópicas observadas. También, se realizó una observación de las estructuras microscópicas mediante microscopio óptico (Marca: micros Austria; Modelo: MCX100), donde se observaron estructuras como micelio y esporas, con ayuda de la tinción de azul de lactofenol.

Se realizó una comparación de las características macro y microscópicas observadas de los hongos sembrados con la información obtenida en la bibliografía para poder efectuar una adecuada identificación de los patógenos. Se identificaron varios microorganismos con la ayuda del libro: *Illustrated genera of imperfect fungi* de Barnett y Hunter.

24 Obtención de cultivos puros

Materiales y equipos:

- Mechero

- Cajas de Petri
- Bisturí/ pinzas
- Medios de cultivo selectivos
- Papel filtro/ embudo
- Placas pequeñas (60 x 15 mm)
- Caja magenta
- Sacabocados
- Micropipetas con puntas
- Microtubos de 1,5 ml
- Cámara de Neubauer
- Solución *Tween* (20%)
- Baño María
- Termómetro
- Asa triangular

En esta etapa del proyecto se estudiaron los fitopatógenos *Diaporthe sp.* y *Phytophthora sp.*, los cuales fueron dos de los microorganismos identificados en el proceso anterior.

Previo a su caracterización, se obtuvieron cultivos monospóricos (cultivos puros) para garantizar que la especie por analizar es la correcta y no otra que pudiera ingresar como contaminante.

Se seleccionaron aislados provenientes de varias localidades para la obtención de cultivos puros. Se utilizaron aislados de 5 localidades para *Diaporthe sp.*; La Unión (LU), Valle hermoso (VA), Balzar (BA), Loja (LO) y La Laguna (LL); y 3 para *Phytophthora sp.*: Balzar (BA), La Unión (LU) y Valle hermoso (VA). Todos los aislados procedieron originalmente de muestras de cladodios de pitahayas situadas en las respectivas localidades. Las colonias de LU, BA y LL procedieron de la variedad roja, la de VA de la variedad amarilla y la de LO de la variedad púrpura. Para el caso de *Diaporthe* se simplificó la codificación del siguiente modo: LL a D1, LU a D2, BA a D3, LO a D4 y VA a D5.

El procedimiento para obtener cultivos monospóricos de *Diaporthe sp.* es general para otras especies fúngicas. Se realizó del siguiente modo: se sembraron colonias de aislados previos de cada localidad evaluada y se indujo su esporulación mediante

condiciones específicas (se detallan en el apartado Descripción de los medios), se dejaron crecer los cultivos resembrados y se observó si formaban esporas en el microscopio. Una vez que se detectó la presencia de esporas, se obtuvieron mediante la extracción de fragmentos del medio y se colocaron en microtubos con solución *Tween 20*, éstos se agitaron para poder dispersar las esporas y se calentaron en Baño María por 10 minutos a una temperatura cercana a 55°C. El contenido de cada microtubo fue colocado en tubos de 15 ml con agua estéril, realizándose diluciones seriadas para reducir la concentración de esporas (suspensión de esporas). Con las soluciones listas, se tomaron 100 µl de la solución con una micropipeta y se dispersó en una placa con medio de cultivo mediante asa triangular. Se dejó crecer cada placa por 1-2 días hasta que se genere el tubo germinativo y poder aislarlas, obteniendo el cultivo monospórico. Un proceso similar y más detallado se lo puede consultar en: *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos* de Cañedo y Ames.

Por otra parte, para obtener los cultivos puros de *Phytophthora sp.* se utilizó un proceso diferente, el cual es especificado en el siguiente protocolo y se encuentra traducido en el apartado Apéndices: *Protocol for Single Spore Isolation of Phytophthora nicotianae*.

Los cultivos monospóricos se dejaron crecer por varios días para su posterior análisis y tratamiento. Los medios de cultivo utilizados para estos procesos fueron: PDA, PCA, CLA y agar V8 clarificado. Además, se dejaron crecer los cultivos a una temperatura aproximada de 25-28°C y bajo ciclos de 12 h de luz y de 12 h de oscuridad. Cabe mencionar que el medio CLA se usó en específico para *Diaporthe* y el V8 clarificado para *Phytophthora*. Los medios PDA y PCA se emplearon para ambos.

Descripción de los medios:

El medio de cultivo PDA (*Potato Dextrose Agar* o agar de patata y dextrosa), el cual es el más usado para el cultivo de hongos, se lo preparó mediante un polvo indicado para medio PDA (marca Titan Media) y agua destilada estéril. Luego, se esterilizó con el autoclave a 121°C y a una presión de 1 atm por 15 minutos, y posteriormente se le añadió ampicilina como antibiótico para evitar el crecimiento de bacterias que pudieran contaminarlo. Este proceso de esterilización se usó también con los demás medios.

El medio PCA (*Potato Carrot Agar* o agar de patata y zanahoria) se lo preparó al hervir patata y zanahoria en agua destilada estéril, formándose una sopa de la que se filtró

sólo el líquido mediante papel filtro y embudo. A esta mezcla se le añadió agar y se autoclavó; en este medio se empleó el antibiótico Ampicilina (Zurita & Urcia, 2017). Además, se le agregó uno a dos trozos de ramas de naranjo esterilizadas a cada cultivo para inducir la esporulación de *Diaporthe sp.*, según lo establecido por Pintos et al. (2000).

El medio agar V8 clarificado se lo preparó con jugo V8, agar y agua destilada estéril con un procedimiento similar a los anteriores. Previo a mezclar el jugo V8 se lo clarificó, colocándolo en la centrifuga a una velocidad de 4000 rpm por 20 min y se tomó el sobrenadante, luego se añadió CaCO₃ y se mezcló con el resto de los componentes. A este medio se le colocó un complejo de antibióticos conocido como PARP: pimaricina, ampicilina, rifampicina y PCNB. Se puede leer detalladamente la elaboración de este medio en el trabajo de: (Ferguson & Jeffers, 1999).

El medio CLA (*Carnage Leaf Agar* o agar hojas de clavel) se lo preparó con hojas de clavel esterilizadas (las cuales se cortaron en trozos de 5 mm mediante tijeras y se añadieron en un medio agar agua previamente preparado. Para más detalles de su preparación se puede consultar en el documento del Gobierno de Chile-SAG (indicado en las referencias). Este medio se usó para inducir la esporulación de *Diaporthe*, según lo establecido por Raheem et al. (2021).

25 Caracterización morfológica

Se sembraron los cultivos puros en cuatro réplicas ordenadas por cada localidad y se incubaron a tres temperaturas distintas: 24, 28 y 30°C, las cuales se lograron en 3 incubadoras calibradas a esas temperaturas y con presencia de luz LED. Los aislados evaluados a 28°C y 30°C fueron sometidos a luz permanente (24 h de luz), mientras que los evaluados a 24°C se sometieron a ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Se incubaron en total 60 placas de *Diaporthe sp.* (en medio PCA con ampicilina y una ramita de naranjo como material vegetal) y 36 de *Phytophthora sp.* (en medio V8 clarificado con ampicilina).

El crecimiento micelial (medido en cm) fue evaluado con una regla graduada a medida que se desarrollaban las colonias (cada 24 horas). Una vez crecieron completamente se procedió a la observación de las características morfológicas de interés: pigmento reverso (del medio) y anverso (de la colonia), textura y tipo de micelio, tipo de

esporulación y elevación. Además, se calculó la tasa de crecimiento (en cm/día) a partir de los datos de tamaño micelial utilizando la siguiente fórmula (ecuación 2.1):

$$TC = \frac{Cf - Ci}{tf - ti}$$

(2.1)

Dónde:

Cf: Crecimiento diametral final expresado en cm

Ci: Crecimiento diametral inicial (día uno) expresado en cm

tf: Tiempo final en el que termina el crecimiento fúngico (día final)

ti: Tiempo inicial (día uno).

Para evaluar el comportamiento del crecimiento de los aislados, se empleó un análisis estadístico descriptivo y análisis de varianza.

Se definió a la tasa de crecimiento como variable dependiente de tipo numérica, y a la temperatura y el aislado como variables independientes. La primera de tipo numérica y discontinua, y la segunda de tipo categórica.

Para la inferencia estadística se comprobó la normalidad de los supuestos, es decir si cumplían los tres requisitos de normalidad: simetría, homogeneidad e independencia mediante las pruebas respectivas, empleando un intervalo de confianza del 95%. Para la organización de los datos se empleó el programa Excel y para realizar el análisis estadístico y, las tablas y gráficos se utilizó el software *Info Stat*.

26 Identificación molecular

Para identificar los fitopatógenos a nivel de especie se realizó una extracción de material genético (ADN) de los cultivos que fueron caracterizados. Se sembraron en medios especiales para extracción y caracterización molecular. Para *Phytophthora* se utilizaron los medios líquidos V8 clarificado y PDB, mientras que para *Diaporthe* se emplearon las colonias de PCA evaluadas en el proceso anterior.

El protocolo y los reactivos que fueron empleados para la extracción de ADN de *Diaporthe* se especifican en: *EZNA Fungal DNA Mini Kit Protocols* de: (Omega BIO-TEK, 2013). Mientras que para *Phytophthora* se empleó el protocolo: *Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification* de: (Cenis, 1992).

Una vez que se extrajo ADN de cada aislado, se planteó inicialmente el siguiente procedimiento: realizar una amplificación de secuencias conservadas mediante PCR utilizando cebadores específicos para los microorganismos estudiados (cebadores ITS): ITS1 para *Diaporthe* e ITS4 para *Phytophthora*. Luego, se obtendrían las secuencias y se aplicaría una comparación de secuencias mediante la base de datos Gen Bank para inferir la especie más cercana a cada muestra. Sin embargo, por cuestiones de tiempo y por la tardanza en ciertos procesos, sólo se realizó la extracción de ADN de los aislados evaluados.

CAPÍTULO 3

3. Resultados y análisis

3.1 Resultados

3.1.1 Cultivos puros

El medio V8 clarificado PARP no sirvió para el crecimiento de *Phytophthora sp.* Por lo que se utilizó el medio V8 clarificado, con la única adición del antibiótico Ampicilina.

Phytophthora creció exitosamente en PCA y PDA, donde se detectaron estructuras reproductivas como: esporangios, zoosporas y clamidosporas. Los cultivos monospóricos de este agente se lograron en PCA.



Figura 3.1. Vista superior (izquierda) y del reverso (derecha) de tres cultivos monospóricos de *Phytophthora sp.* y una réplica del cultivo de VA (arriba a la derecha).

En el medio CLA, *Diaporthe sp.* no se desarrolló apropiadamente sólo hubo crecimiento de bacterias alrededor de las hojas de clavel (Figura 3.2).



Figura 3.2. Placas con medio CLA contaminadas.

Diaporthe creció y esporuló en PCA con pequeñas ramas de naranjo. Se detectaron las siguientes estructuras reproductivas: conidios alfa en los aislados de BA, LO y VA (D3, D4 y D5) y conidios beta en los de LL y LU (D1 y D2). En la Figura 3.4 se observan tales esporas en dos de los aislados trabajados.



Figura 3.3. Vista superior (izquierda) y del reverso (derecha) de cinco aislados de *Diaporthe* a partir de los cuales se obtuvieron los cultivos monospóricos.

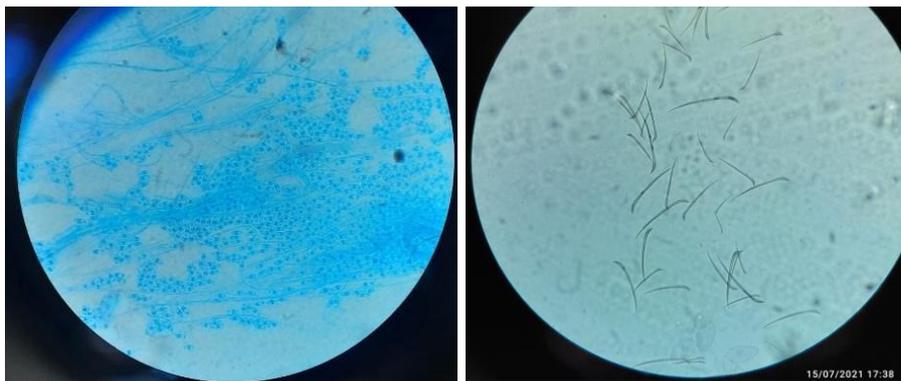


Figura 3.4. Conidios alfa del aislado D5 (izquierda) y conidios beta del aislado D1 (derecha) de *Diaporthe sp.*

Ya que no hubo crecimiento de los aislados D1 y D2 en la fase de obtención de cultivos puros, se trabajó con D3, D4 y D5 en PCA.

3.1.2 Caracterización morfológica

Debido a problemas de contaminación con otros microorganismos, la mayor parte de las placas de *Phytophthora* fueron desechadas, por lo que sólo se conservaron las menos contaminadas o las placas totalmente limpias. No obstante, se pudo medir crecimiento en todas las réplicas y se realizó la observación del resto de características en las placas conservadas (Figura 3.5).

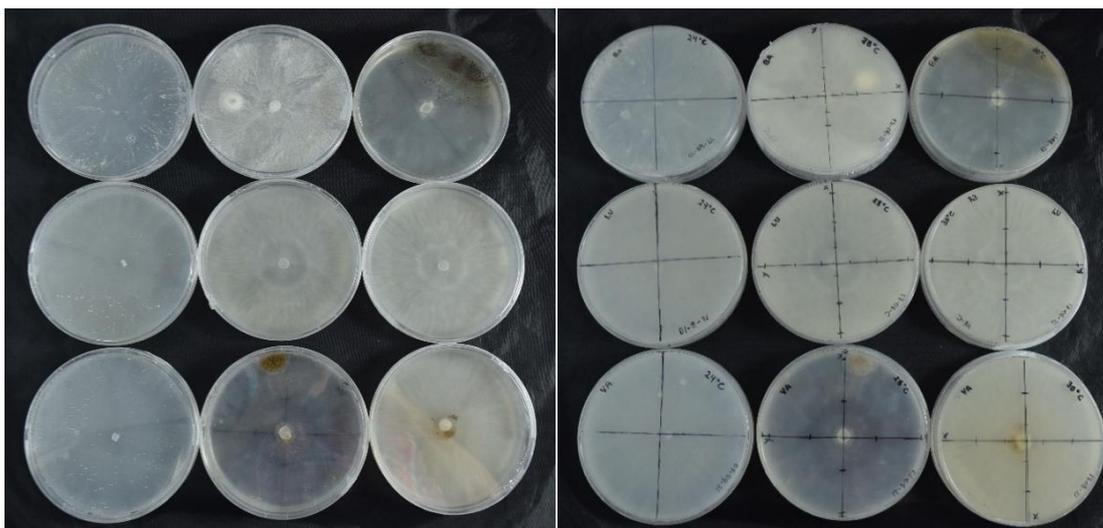


Figura 3.5. Vista superior (izquierda) y del reverso (derecha) de placas de *Phytophthora* ordenadas por temperatura y localidad. De estos cultivos se evaluaron las características morfológicas de interés.

En la Figura 3.5 las placas se ordenaron de la siguiente forma: las de la izquierda son las que se sometieron a 24°C (con medio PCA), las del medio a 28°C y las de la derecha a 30°C. De arriba hacia abajo: las 3 primeras son las correspondientes a BA, las del medio a LU y las de abajo a VA.

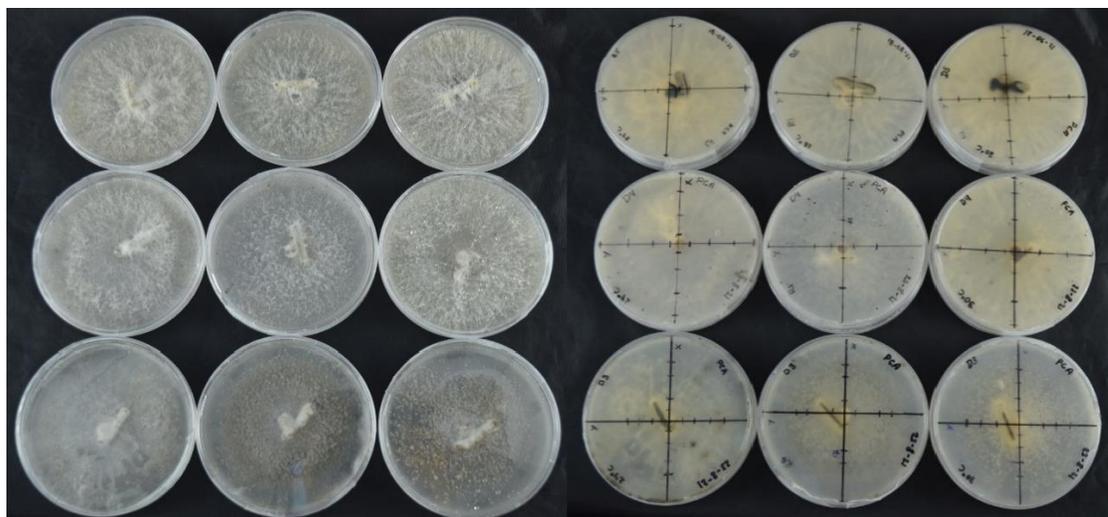


Figura 3.6. Vista superior (izquierda) y del reverso (derecha) de placas de *Diaporthe* ordenadas por temperatura y localidad. De estos cultivos se evaluaron las características morfológicas de interés.

En la Figura 3.6. las placas se ordenaron de la siguiente forma: las de la izquierda fueron sometidas a 24°C, las del medio a 28°C y las de la derecha a 30°C. De arriba hacia abajo: las 3 primeras son las correspondientes a D5, las del medio a D4 y las de abajo a D3.

La medición diaria del tamaño micelial se la precisó en los Apéndices 2 al 5. Asimismo, se calculó la tasa de crecimiento (TC) para los dos agentes fitopatógenos y se realizó un análisis estadístico de esta variable de interés. Según se muestra en la Figura 3.7, el aislado de BA tuvo la mayor TC a 24°C y 30°C, mientras que los de LU y VA tuvieron una TC similar en todas las temperaturas.

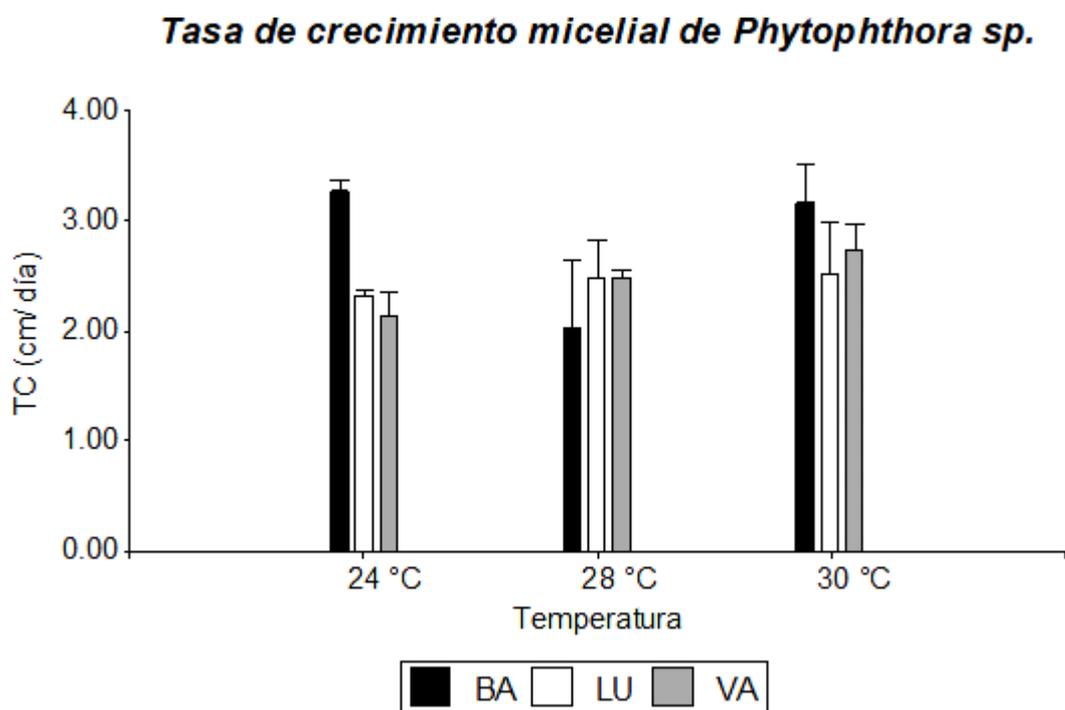


Figura 3.7. Gráfico de barras de la tasa de crecimiento micelial de los tres aislados de *Phytophthora* en las temperaturas evaluadas. Las líneas truncadas representan el rango de error.

Tabla 3.1. Tabla ANOVA de la tasa de crecimiento micelial de los tres aislados de *Phytophthora*.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV	
TC (cm/día)	36	0.33	0.14	25.28	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor p
Modelo	5.71	8	0.71	1.70	0.1450
Aislado	1.13	2	0.57	1.34	0.2778
Temperatura	1.32	2	0.66	1.57	0.2265
Aislado*Temperatura	3.26	4	0.81	1.94	0.1332
Error	11.36	27	0.42		
Total	17.07	35			

De la Tabla 3.1 se pudo interpretar que el tipo de aislado, temperatura y la interacción aislado-temperatura no fueron estadísticamente significativos en la tasa de crecimiento de *Phytophthora*.

Tasa de crecimiento micelial de *Diaporthe* sp.

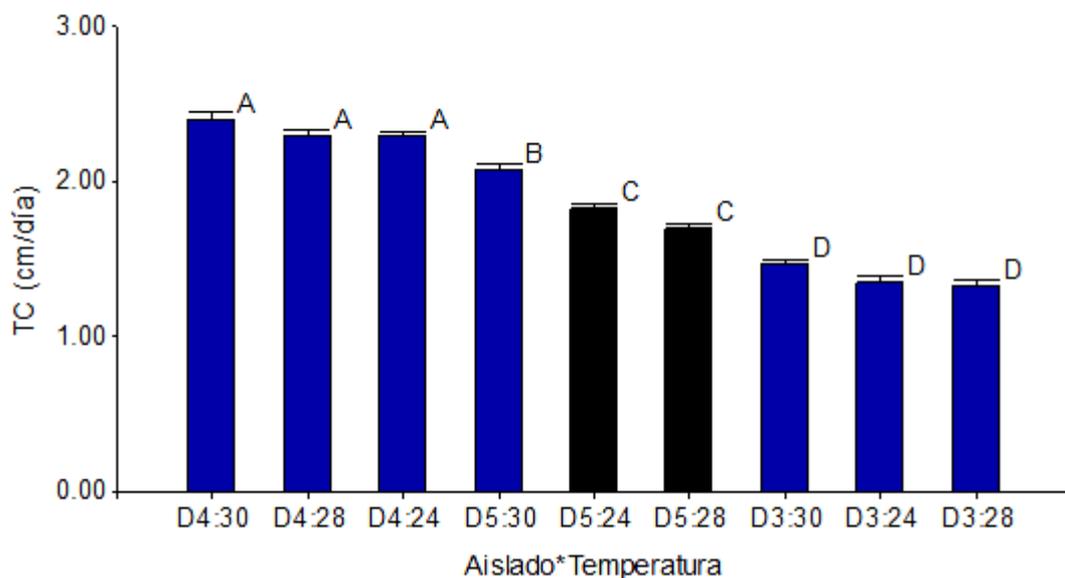


Figura 3.8. Gráfico de barras de la tasa de crecimiento micelial de los 3 aislados de *Diaporthe* en las temperaturas evaluadas. Las líneas truncadas representan el rango de error.

Según se muestra en la Figura 3.8, el aislado D4 tuvo la mayor TC a todas las temperaturas, D5 tuvo una menor TC y D3 fue el que creció más lentamente. Las diferentes letras en el mismo aislado (B y C) indican que hubo diferencias significativas en la TC de D5 entre la temperatura de 30°C con las de 24 y 28°C.

Nota: la TC de D5 (a 24°C) y D5 (a 28°C) (barras negras) fue calculada a los 5 días de edad del cultivo, mientras que en los demás tratamientos se calculó a los 4 días (barras azules).

Tabla 3.2. Tabla ANOVA de la tasa de crecimiento micelial de los 3 aislados de *Diaporthe*.

Análisis de la varianza					
Variable	N	R ²	R ² Ajustado	CV	
TC (cm/día)	36	0.98	0.97	3.87	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F	Valor p
Modelo	5.81	8	0.73	140.00	<0.0001
Aislado	5.43	2	2.72	523.77	<0.0001
Temperatura	0.29	2	0.14	27.76	<0.0001
Aislado*Temperatura	0.09	4	0.02	4.23	0.0087

Error	0.14	27	0.01		
Total	5.95	35			

En la Tabla 3.2 se presentan los resultados del ANOVA que presentan las variables de aislado, temperatura y la interacción aislado-temperatura fueron estadísticamente significativos en la tasa de crecimiento de *Diaporthe*, por lo que ambas variables influyen en la TC.

Posteriormente a la evaluación del crecimiento, se observaron las características morfológicas de interés de cada cultivo. Se observaron cambios de coloración del medio en algunos aislados de *Diaporthe*: D3 (blanco a verde oscuro) a la tercera semana y D4 (amarillo a ámbar) a la cuarta semana, y del micelio en D3 (blanco a verde olivo) a la segunda semana. Mientras que el color del medio y del micelio permanecieron constantes en los de *Phytophthora*.

Todos los caracteres evaluados se presentan desde la Tabla 3.3 hasta la Tabla 3.8 y desde la Figura 3.9 hasta la Figura 3.15.

Tabla 3.3. Características morfológicas de los aislados de *Phytophthora* a 24°C:

Aislado	Tipo de micelio	Textura	Esporulación	Pigmento anverso	Pigmento reverso	Elevación
BA	Cenocítico	Hialina y vellosa	Esporangios encapsulados/ zoosporas	Blanco	Blanco semitransparente	Plana y extendida
LU	Cenocítico	Hialina y vellosa	Esporangios/ zoosporas; clamidosporas	Blanco	Blanco perla	Plana y extendida
VA	Cenocítico	Hialina y vellosa	Esporangios/ zoosporas; clamidosporas	Blanco	Blanco grisáceo	Plana y extendida

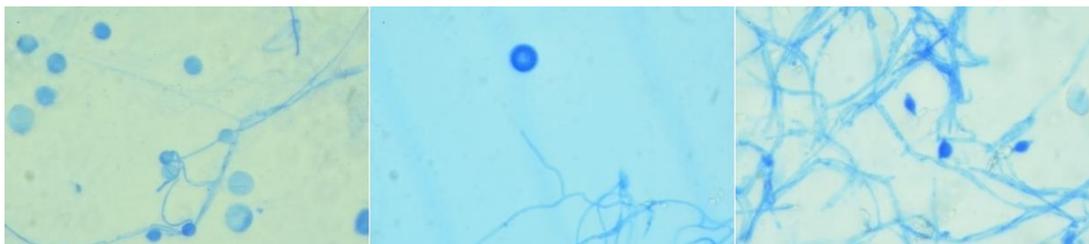


Figura 3.9. Observación microscópica de los aislados de *Phytophthora*, incubados a 24°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados de: VA (izquierda), LU (centro) y BA (derecha).

Tabla 3.4. Características morfológicas de los aislados de *Phytophthora* a 28°C:

Aislado	Tipo de micelio	Textura	Esporulación	Pigmento anverso	Pigmento reverso	Elevación
BA	Cenocítico	Velosa y algodonosa	Esporangios/ zoosporas	Blanco	Blanco perla	Plana y extendida
LU	Cenocítico con protuberancia	Velosa y concéntrica	Esporangios/ zoosporas; Oosporas	Blanco	Blanco perla	Plana y extendida
VA	Cenocítico con hinchamiento	Hialina y vellosa	Esporangios/ zoosporas; Clamidosporas intercalares	Blanco	Trasparente	Plana y limitada



Figura 3.10. Observación microscópica de los aislados de *Phytophthora*, incubados a 28°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados de: VA (izquierda), LU (centro) y BA (derecha).

Tabla 3.5. Características morfológicas de los aislados de *Phytophthora* a 30°C:

Aislado	Tipo de micelio	Textura	Esporulación	Pigmento anverso	Pigmento reverso	Elevación
BA	Cenocítico	Hialina y	Esporangios/	Blanco	Trasparente	Plana y

		vellosa	zoosporas; oosporas			limitada
LU	Cenocítico	Vellosa y concéntrica	Esporangios/ zoosporas	Blanco	Blanco perla	Plana y extendida
VA	Cenocítico	Vellosa	Esporangios/ zoosporas; clamidosporas	Blanco	Blanco crema	Plana y extendida

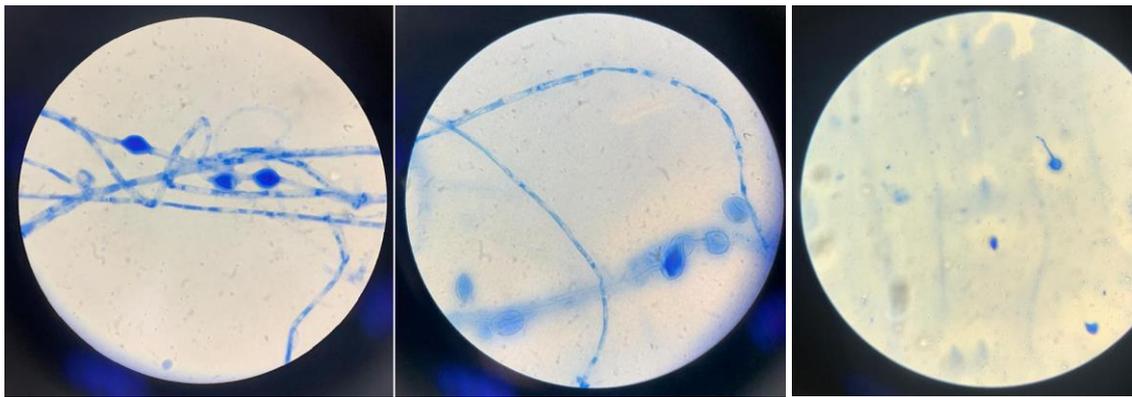


Figura 3.11. Observación microscópica de los aislados de *Phytophthora*, incubados a 30°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados de: VA (izquierda), LU (centro) y BA (derecha).

Tabla 3.6. Características morfológicas de los aislados de *Diaporthe* a 24°C:

Aislado	Tipo de micelio	Textura	Esporulación	Pigmento anverso	Pigmento reverso	Elevación
D3	Septado	Algodonosa y granular	Conidios alfa	Blanco; verde oscuro	Blanco; amarillo claro; verde oscuro	Elevada y limitada
D4	Septado	Algodonosa	Picnidios/ conidios alfa	Blanco	Amarillo pálido; ámbar	Elevada y limitada
D5	Septado	Algodonosa	Picnidios/ conidios alfa	Blanco	Crema	Elevada y limitada

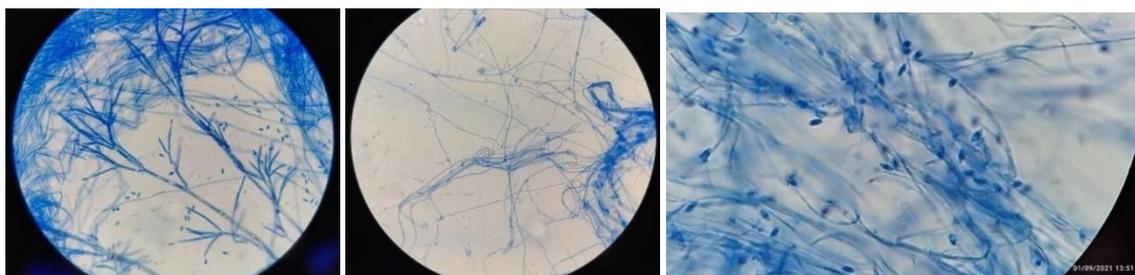


Figura 3.12. Observación microscópica de los aislados de *Diaporthe*, incubados a 24°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados: D3 (izquierda), D4 (centro) y D5 (derecha).

Tabla 3.7. Características morfológicas de los aislados de *Diaporthe* a 28°C:

Aislado	Tipo de micelio	Textura	Esporulación	Pigmento anverso	Pigmento reverso	Elevación
D3	Septado con protuberancia; verde olivo	Algodonosa y granular	Conidios alfa	Blanco; verde oscuro	Blanco; naranja claro	Elevada y limitada
D4	Septado con protuberancia	Algodonosa	Picnidios; Asca/ ascosporas	Blanco	Blanco hueso	Elevada y limitada
D5	Septado	Algodonosa	Picnidios/ esporas diminutas	Blanco	Amarillo naranja	Elevada y limitada

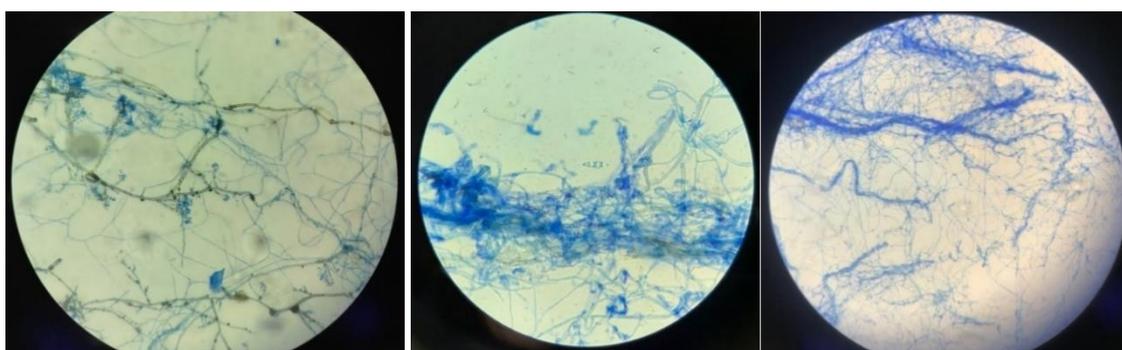


Figura 3.13. Observación microscópica de los aislados de *Diaporthe*, incubados a 28°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados: D3 (izquierda), D4 (centro) y D5 (derecha).

Tabla 3.8. Características morfológicas de los aislados de *Diaporthe* a 30°C:

Aislado	Tipo de	Textura	Esporulación	Pigmento	Pigmento	Elevación
---------	---------	---------	--------------	----------	----------	-----------

	micelio			anverso	reverso	
D3	Septado	Algodonosa y granular	Cirros/ Conidios alfa	Blanco; verde oscuro	Blanco; naranja claro	Elevada y limitada
D4	Septado	Algodonosa	Picnidios/ conidios alfa	Blanco	Crema	Elevada y limitada
D5	Septado	Algodonosa	Picnidios/ conidios alfa	Blanco	Crema	Elevada y limitada



Figura 3.14. Observación microscópica de los aislados de *Diaporthe*, incubados a 30°C. Se observan las estructuras reproductivas de los aislados: D3 (izquierda), D4 (centro) y D5 (derecha).

3.1.3 Identificación molecular

Se realizó la extracción de ADN de los aislados ensayados, no obstante, la cuantificación de ADN (mediante espectrofotómetro) obtenido de cada muestra indicó bajos niveles de absorbancia, es decir, escaso material genético obtenido de todos los aislados (Figura 3.13). Por lo que, es necesario repetir el proceso de extracción para seguir con los siguientes procesos: amplificación, secuenciación y comparación de secuencias para determinar las especies a las que pertenecen los aislados evaluados.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sta
1	D3	Admin	8/31/2021 9:55 AM	2.6	ng/ul	0.053	0.026	2.02	0.67	DN
2	D4	Admin	8/31/2021 9:57 AM	2.0	ng/ul	0.040	0.018	2.17	0.46	DN
3	D5	Admin	8/31/2021 9:57 AM	0.8	ng/ul	0.016	0.003	5.76	0.30	DN
4	LU	Admin	8/31/2021 9:58 AM	0.9	ng/ul	0.017	0.002	7.46	0.27	DN
5	BA	Admin	8/31/2021 9:59 AM	1.3	ng/ul	0.027	0.020	1.38	0.42	DN
6	F2	Admin	8/31/2021 9:59 AM	4.1	ng/ul	0.083	0.045	1.85	0.79	DN
7	F5	Admin	8/31/2021 10:00 AM	2.4	ng/ul	0.047	0.037	1.27	0.49	DN
8	F6	Admin	8/31/2021 10:01 AM	3.6	ng/ul	0.071	0.053	1.34	0.59	DN
9	F7	Admin	8/31/2021 10:01 AM	6.4	ng/ul	0.128	0.068	1.88	0.61	DN
10	F8	Admin	8/31/2021 10:02 AM	11.1	ng/ul	0.222	0.137	1.62	0.63	DN
11	F11	Admin	8/31/2021 10:02 AM	9.6	ng/ul	0.191	0.115	1.66	0.60	DN
12	F9	Admin	8/31/2021 10:03 AM	10.8	ng/ul	0.216	0.119	1.82	0.50	DN
13	F10	Admin	8/31/2021 10:03 AM	30.1	ng/ul	0.602	0.374	1.61	0.66	DN
14	F13	Admin	8/31/2021 10:04 AM	32.9	ng/ul	0.658	0.376	1.75	0.91	DN
15	N9	Admin	8/31/2021 10:05 AM	7.9	ng/ul	0.157	0.094	1.67	0.66	DN

Figura 3.15. En la lista se indican bajos niveles de absorbancia en las muestras D3, D4, D5, LU y BA (no pudo extraerse ADN de la muestra VA), que indican una escasa cantidad de ADN, insuficiente para seguir con la identificación molecular.

32 Análisis

Phytophthora sp. no creció en el medio V8 PARP, posiblemente debido a que el PCNB no se diluyó correctamente en etanol, el cual pudo llegar a inhibir el crecimiento de los especímenes trabajados, tal y como afirma Hong et al. (2003), que algunas especies de este género son sensibles al etanol y cloro, por lo tanto, se debería prescindir su empleo.

Diaporthe sp. no creció en el medio CLA, probablemente por una incorrecta esterilización de las hojas de clavel al no someterlas a luz UV, lo que ayuda al proceso de esterilización de tejido vegetal. Otra opción es que el crecimiento bacteriano inhibió el desarrollo de este ascomiceto, lo cual pudo suceder porque no se agregó al medio ningún antibiótico.

La mayoría de las placas de V8 con ampicilina se contaminaron posiblemente por una incorrecta esterilización del medio, o la entrada de esporas del ambiente en la resiembra. Debido a esta contaminación muchas placas crecieron erráticamente; algunas crecieron abundantemente al primer día y dejaron de crecer en días posteriores, otras crecieron escasamente, etc. Esto explica la alta variabilidad de los datos de crecimiento del oomiceto estudiado.

Algunos aislados (LU y VA a 28°C; BA a 30°C) formaron posiblemente un contacto gametangial (en las figuras, las esferas azules entre hifas), desde donde se forman

oosporas. Esto indica que probablemente, la *Phytophthora* presente en la pitahaya puede reproducirse sexualmente.

Según lo recopilado por Reyes y Morales (2007), *Phytophthora* no prospera a una temperatura menor a 7.5 °C y superior a 28.5 °C, pero bajo la humedad y temperatura óptimas, los esporangios se forman abundantemente y liberan altas cantidades de zoosporas. Así, las temperaturas experimentadas estaban dentro del rango donde este oomiceto crece y se reproduce apropiadamente. Además, este estudio encontró que en un rango de 8-36°C, la especie *P. parasítica* crece mejor a 24 y 28°C (Reyes & Morales, 2007), lo cual no concuerda con lo hallado ya que no se encontraron diferencias significativas entre 24, 28 y 30°C, pero se determinó que la TC fue más elevada a 30°C en este patógeno.

Uno de los aislados (D4) a 28°C formó ascas. Esto indica que probablemente, el *Diaporthe* presente en la pitahaya puede reproducirse sexualmente. Según la literatura, *Diaporthe* es en realidad la fase sexual (forma ascosporas), mientras que *Phomopsis* sp. es la etapa asexual (desarrolla conidios), sin embargo, se decidió usar *Diaporthe* para referirse a ambas etapas del ciclo de vida.

Como recopilan Juanicotena y Rodríguez (2008): el rango de temperatura óptima para el crecimiento micelial de *Diaporthe* es de 23 a 25°C, pudiendo crecer entre 14 y 32°C. No obstante, se comprobó que un crecimiento óptimo también se puede dar entre 20° - 27°C, mientras que a 30°C se inhibe su desarrollo y la formación de picnidios (Juanicotena & Rodríguez, 2008). Lo cual, no concuerda totalmente con los resultados obtenidos, ya que a 30°C se observó que los aislados desarrollaron micelio y formaron picnidios. Además, no hubo diferencias significativas en el crecimiento entre las temperaturas evaluadas (24, 28 y 30°C), donde sólo en el aislado D5 se determinó que obtuvo la mayor tasa de crecimiento a 30°C.

Las características morfológicas evaluadas en este trabajo fueron similares a las que identificaron los trabajos de Aristizábal (2014) con *Phytophthora* en ají de Colombia, y de Rahim et al. (2021) con *Diaporthe* en la pitahaya de Malasia.

CAPÍTULO 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones:

En base al análisis de los resultados se puede concluir que:

- *Phytophthora sp.* creció en diversos medios (V8 clarificado, PCA y PDA) sin material vegetal para inducir su esporulación. Lo contrario sucedió con *Diaporthe sp.*, el cual sólo creció en PDA y PCA y necesitó obligatoriamente de material vegetal para esporular.
- La temperatura de 30°C fue la que proporcionaba mayor tasa de crecimiento en los aislados tanto de *Diaporthe* como de *Phytophthora*. Sin embargo, las diferencias entre las temperaturas y su influencia en el crecimiento fueron mínimas.
- La temperatura de 30°C produjo mayor crecimiento en un solo aislado de *Diaporthe* (D5), en cambio con *Phytophthora*, no hubo diferencias significativas en el crecimiento entre las tres temperaturas evaluadas.
- Se pudo realizar la caracterización morfológica de los microorganismos sujetos de estudio, identificando las variables de interés de los aislados y encontrando los tipos de esporulación de cada uno. Pero no se pudo determinar el tiempo de esporulación. Además, se identificó que ambos fitopatógenos se pueden reproducir asexual y sexualmente en las condiciones experimentales, siendo la forma asexual la predominante entre todos los aislados.
- Se compararon las características entre los aislados mediante el uso de tablas. De su observación se dedujo que la mayoría de las características (en un mismo aislado) son similares entre sí, cambiando ligeramente el pigmento reverso. Entre aislados las diferencias fueron más notables, siendo una de las variables que más cambiaba el tipo de esporulación.

- Se extrajo material genético de los aislados que servirá para una posterior identificación molecular de especies fitopatógenas que afectan a la pitahaya ecuatoriana. No obstante, se deberá repetir el proceso para poder realizar tal identificación, de la cual se obtendrán datos de caracteres biológicos que ayuden a prevenir las enfermedades que estos agentes provocan.
- Con la información obtenida a partir de este proyecto se obtendrá una mejor base para que próximos estudios determinen la patogenicidad de estos agentes y la relación del complejo *Phytophthora-Diaportha* con la pitahaya.

4.2 Recomendaciones:

- Se recomienda seguir con la investigación exhaustiva de los agentes fitopatógenos ya que puede proporcionar información relevante para frenar la problemática de la incidencia de enfermedades que afectan a los cultivos de pitahaya ecuatoriana actualmente.
- Los problemas de contaminación se pueden evitar trabajando de forma ordenada y aséptica. Se recomienda utilizar antibióticos si se va a trabajar con aislados fúngicos.
- Se recomienda probar con más medios de cultivo y materiales vegetales para verificar una mayor eficiencia a la hora de crecer o inducir esporulación de colonias de diferentes especies microbianas.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Ani, L. K. T., & Furtado, E. L. (2020). The effect of incompatible plant pathogens on the host plant. *Molecular Aspects of Plant Beneficial Microbes in Agriculture*, 47-57. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818469-1.00004-3>
- Araujo, L., & Medina, O. (2008). *Reconocimiento de patógenos asociados al cultivo de pitahaya amarilla (Selenicereus megalanthus Haw.) en el departamento del Valle del Cauca*. Valledupar: Universidad Popular del Cesár.
- Asistencia Agroempresarial Agribusiness. (1992). *Manual técnico del cultivo de la pitahaya*. Quito: Corporación Andina de Fomento.
- Balendres, M., & Bengoa, J. (2019). Diseases of dragon fruit (*Hylocereus* species): Etiology and current management options. *Crop Protection* .
- Barnett, H., & Hunter, B. B. (2006). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Minnesota.
- Bauer, R. (2003). A synopsis of the tribe Hylocereeae F. Buxb. *Cactaceae Systematics Initiatives*, 3-63.
- Bauer, R. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de la pitahaya Medidas para la temporada invernal*. <http://www.comunicacion.amc.edu.mx/comunicacion/noticias/images/cyd-040809-pitahaya3-g.jpg>
- BCE. (2020). *Estadísticas de Comercio Exterior*. Obtenido de Banco Central del Ecuador: <https://sintesis.bce.fin.ec/BOE/OpenDocument/1602171408/OpenDocument/opendoc/>
- Ben-Ze'ev, I., Assouline, I., Levy, E., & Elkind, G. (2011). First report of *Bipolaris cactivora* causing fruit blotch and stem rot of dragon fruit (pitaya) in Israel. *Phytoparasitica*, 195-197.
- Britton, N., & Rose, J. N. (1963). *The Cactaceae: Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family*. Courier Corporation.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima: Centro Internacional de la Papa.
- Castillo, R. (2006). Aprovechamiento de la pitahaya: bondades y problemáticas - PDF Descargar libre. *Caos Conciencia*, 1, 13-18. <https://docplayer.es/20839911-Aprovechamiento-de-la-pitahaya-bondades-y-problematicas.html>
- Genis, J. (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Res.*
- Chemah, T. A., Aminah, A. N., & Aida, W. (2010). Determination of pitaya seeds as a natural antioxidant and source of essential fatty acids. *International Food Research Journal*, 1003-1010.
- Chuang et al., M. (2012). First Report of Stem Canker Disease of Pitaya (*Hylocereus undatus* and *H. polyrhizus*) Caused by *Neoscytalidium dimidiatum* in Taiwan. *Plant Disease*.
- Crane, J., & Balerdi, B. (2005). *The pitaya (Hylocereus undatus and other spp.)*. Florida: University of Florida.

- De Dios, C. (2004). Geographical distribution of pitahayas (*Hylocereus*) in Mexico. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 4-23.
- De la Cueva, D. (2019, mayo 22). *La pitahaya: un producto rentable y sostenible que llega a mercados internacionales*. <https://www.numbersmagazine.com/articulo.php?tit=la-pitahaya-un-producto-rentable-y-sostenible-que-llega-a-mercados-internacionales->
- Delgado, A., Pico, J., Navia, D., & Suárez, C. (2019). Poster 10: Prospección de nemátodos fitoparásitos asociados al cultivo de pitahaya amarilla (*Cereus sp.*) en el cantón Palora. *Memorias del II Simposio Internacional Producción Integrada de Frutas*. Estación Experimental Central de la Amazonía.
- ECORAE et al. (2001). *Compendio de recomendaciones tecnológicas para los principales cultivos de la amazonía ecuatoriana*. Quito: ECORAE, INIAP, OEA, GTZ.
- El Universo. (2021, marzo 10). *Ecuador exportó primer contenedor de pitahaya hacia Europa | Economía | Noticias | El Universo*. <https://www.eluniverso.com/noticias/economia/ecuador-exporto-primer-contenedor-de-pitahaya-hacia-europa-nota/>
- Esquivel, P. (2004). Los frutos de las cactáceas y su potencial como materia prima. *Agronomía Mesoamericana*, 215-219.
- Esquivel, P.; Y., Araya. (2012). Características del fruto de la pitahaya (*Hylocereus sp.*) y su potencial de uso en la industria alimentaria. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 113-129.
- FAO-PRODAR. (2006). *Productos frescos y procesados. Fichas técnicas*. Obtenido de http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/AE620s/Pfrescos/PITAHAYA.HTM
- Ferguson, A., & Jeffers, J. S. (1999). Detecting Multiple Species of *Phytophthora* in Container Mixes from Ornamental Crop Nurseries. *Plant Disease*, 1129-1136.
- Gobierno de Chile - SAG. (s.f.). *Instructivo Técnico para el diagnóstico de Fusarium circinatum en muestras de viveros bajo control oficial*.
- Hong, C. X., Richardson, P. A., & Kong, P. a. (2003). Efficacy of chlorine on multiple species of *Phytophthora* in recycled nursery irrigation water. *Plant Dis*, 1183-1189.
- Huachi, L., Yugsi, E., Paredes, M., Coronel, D., Verdugo, K., & Coba Santamaría, P. (2015). DESARROLLO DE LA PITAHAYA (*Cereus SP.*) EN ECUADOR. *La Granja: Revista de Ciencias de la Vida*, 22(2), 50-58. <https://doi.org/10.17163/LGR.N22.2015.05>
- INIAP. (s.f.). *INIAP realiza estudio para combatir problemas fitosanitarios en el cultivo de pitahaya - Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias*. Recuperado 11 de julio de 2021, de <https://www.iniap.gob.ec/pruebav3/iniap-realiza-estudio-para-combatir-problemas-fitosanitarios-en-el-cultivo-de-pitahaya/>
- Juanicotena, E., & Rodríguez, M. (2008). *Respuesta al control químico de Diaporthe helianthi, para dos híbridos de girasol de comportamiento contrastante*. Montevideo.
- Le Bellec, F., Vailant, F., & Imbert, E. (2006). Pitahaya (*Hylocereus spp.*): a new fruit crop, a market with a future. *Fruits*, 238-245.

- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., . . . Foster, G. (2012). Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 614–629.
- Masyahit, M., Sijam, K., & Awang, Y. (2009a). a. First Report on Bacterial Soft Rot Disease on Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) caused by *Enterobacter cloacae* in Peninsular Malaysia. *Agric. Biol.*, 659-666.
- Masyahit, M., Sijam, K., & Mohod, M. (2009b). The First Report of the Occurrence of Anthracnose Disease Caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) on Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.). *Am. J. Applied Sci.*, 902-912.
- Minshew, B. (2009). The secret of nopalea's amazing betalains. *TriVita: experience wellness VitaJournal*, 14.
- Montesinos, J., Rodríguez, L., Ortiz, R., Fonseca, M., Ruíz, G., & Guevara, F. (2015). Revisión bibliográfica Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales*, 36, 67-76. <http://scielo.sld.cu/pdf/ctr/v36s1/ctr07s115.pdf>
- Nishiguchi, M., Hirsch, A., Devinney, R., Vedantam, G., Riley, M., & Mansky, L. (2008). Deciphering evolutionary mechanisms between mutualistic and pathogenic symbioses. *Vie et Milieu*, 87-106.
- OIRSA. (1999). *Manual de Fitosanidad de Pitahaya*. Managua: Organismo Internacional de Regulación Fitosanitaria.
- Pintos, C., García, J., Mansilla, J. C., R., S., & J., A. (2000). Presencia de *Diaporthe actinidiae* afectando al Kiwi (*Actinidia deliciosa*) en el noroeste de la península ibérica. *Bol. San. Veg. Plagas*, 389-399.
- Pozo, E. (2011). Vamos a cultivar pitahaya. Ecuador. ACRES. Concepto, Recursos y Estrategias Agropecuarias. *ACRES*, 7-20.
- Rahim Huda-Shakirah, A., Jia Kee, Y., Leong Wong, K., Zakaria, L., & Hawa Mohd, M. (2021). *Diaporthe* species causing stem gray blight of red-fleshed dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*) in Malaysia. *Scientific Reports*, 11, 3907. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83551-z>
- Reyes, C., & Morales, L. (2007). Determinación de la temperatura óptima de desarrollo in vitro de *Phytophthora parasitica dastur.* en aguacate "hass", en la zona aguacatera de michoacan, México. *Proceedings VI World Avocado Congress* . Viña del Mar.
- Ríos, G., Villavicencio, A., Guevara, V., & Pichardo, S. (1997). *Estudio epidemiológico y etiológico de la bacteriosis de la pitahaya (Hylocereus undatus Britton and Rose), Smith, y su efecto sobre cinco variedades del cultivo*. Managua: Universidad Nacional Agraria.
- Rodríguez, C. A. (2000). Producción y comercialización de pitahayas en México. *Claridades agropecuarias*, 3-22.
- Santarrosa, V. (2013). *Evaluación nutricional comparativa de pitahaya (Hylocereus triangularis) deshidratada en deshidratador de bandejas con la liofilizada*. Riobamba: Escuela superior Politécnica de Chimborazo.
- Sosa-Moss, C., Perdomo, F., Brathwaite Chelston, & Salazar, J. (1996). *Técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas*. IICA. <http://orton.catie.ac.cr/repdoc/A9456e/A9456e.pdf>
- Soto Plancarte, A., Alvarado, G. R., Leticia Fernández Pavía, Y., Elena, M., Santos, P., López Pérez, L., Díaz Celaya, M., Patricia, S., & Pavía, F. (2017). Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp. enfoque aplicado a la investigación* Isolation and diagnosis protocols of *Phytophthora* spp.

applied research approach. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8, 1867-1880.
www.phytophthoradb.org,

- Suárez. (2011). *Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla Selenicereus megalanthus (Haw.) Britt and Rose y pitahaya roja Hylocereus polyrhizus (Haw.) Britt and Rose*. Universidad Nacional de Colombia.
- Suárez et al. (2019b). Identificación del agente causal de la pudrición del pie de pitahaya amarilla (*Hylocereus sp.*) en el cantón Palora.
- Suárez et al., C. (2019a). Poster: Prospección de enfermedades fúngicas sobre pencas de pitahaya amarilla (*Selenicereus sp.*) en el cantón Palora.
- Suárez, C., Pico, J., & Delgado, A. (2019). P8 Reconocimiento de enfermedades fúngicas sobre pencas de pitahaya amarilla. Quito: Universidad San Francisco de Quito.
- Trujillo, D. (2014). *Microorganismos asociados a la pudrición blanda del tallo y manchado del fruto en el cultivo de pitahaya amarilla en Ecuador. Tumbaco-Pichincha*. Universidad Central del Ecuador.
- Valencia, B. A. (2002). *Etiología de la enfermedad ojo de pescado en pitahaya (Hylocereus undatus H.)*. Montecillo: Colegio de Postgraduados de Montecillo.
- Valencia-Botín, A. J., Kokubu, H., & Ortíz-Hernández, Y. D. (2013). A brief overview on pitahaya (*Hylocereus spp.*) diseases. *Australasian Plant Pathology*, 42(4), 437-440.
<https://doi.org/10.1007/S13313-012-0193-8>
- Vargas, Y., Pico, J., Díaz, A., Sotomayor, D., Burbano, A., Caicedo, C., Paredes, N., Congo, C., Tinoco, L., Bastidas, S., Chuquimarca, J., Macas, J., & Viera, W. (2020). *Manual del Cultivo de Pitahaya para la Amazonía Ecuatoriana Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias Estación Experimental Central de la Amazonía*.
- Wichienchot, S., Jatupornpipat, M., & Rastall, R. A. (2010). Oligosaccharides of pitaya (dragon fruit) flesh and their prebiotic properties. *Food Chemistry*, 850-857.
- Wright, E., Rivera, M., & Guirlanda, A. (2007). Basal Rot of *Hylocereus undatus* Caused by *Fusarium oxysporum* in Buenos Aires, Argentina. *Plant Disease*.
- Zurita, S., & Urcia, F. (2017). *Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico*. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.

APÉNDICES

APÉNDICE 1

Protocolo para el aislamiento de una sola espora de *Phytophthora nicotianae*.

Consideraciones antes de comenzar:

1. Compruebe que los cultivos no estén contaminados con bacterias u hongos, utilice placas que se hayan transferido recientemente a placas nuevas, idealmente de 48 horas de antigüedad.
2. Preparar medio V8-PARP y dispensar en placas de Petri de 100 x 15 mm (tamaño estándar), preparar suficientes placas para tener 2-3 placas por cada una que queramos aislar.
3. Asegúrese de tener placas de Petri pequeñas nuevas o esterilizadas (60 x 15 mm) para cada cultivo.
4. Agua destilada autoclavada.
5. Asegúrese de que tengamos acceso a una incubadora con luces.

Protocolo:

1. A partir de cultivos limpios, realice de 3 a 4 perforaciones con un sacabocados estéril. Colocarlos en llama después de perforar cada cultivo.
2. Coloque los tapones en placas pequeñas con el cultivo hacia abajo en la placa.
3. Agregue agua esterilizada en los platos pequeños, suficiente para cubrir los tapones. Tenga cuidado de no llenar demasiado la placa para que no se pueda cerrar o el agua se adhiera a la tapa. Además, evite inclinar los tapones, deben permanecer de pie.
4. No sellar las placas (es muy difícil sellarlas y no es necesario) y colocarlas dentro de una caja magenta. Deje la caja en la incubadora y configúrela para que se quede con las luces encendidas y a 25°C.
5. Verifique si hay esporangios después de 24 h bajo el estereoscopio; si es visible, también debe haber esporas que nadan en el agua. Si no se han producido esporangios, es posible que necesite más tiempo bajo la incubadora o se debe repetir el ensayo.

6. Tome 100 μ L de agua (cerca de los esporangios o asegurándose de que estamos succionando zoosporas) con puntas estériles y extiéndalo en nuevas placas V8. Utilice esparcidores estériles para extender la solución sobre la superficie de la placa. Si la solución está muy concentrada con zoosporas, podemos probar una dilución de 10 veces antes de plaquear en V8.

7. Compruebe si hay un nuevo crecimiento después de 24 a 48 horas, las hifas deben ser radiales y delgadas. Evite el uso de crecimientos cuyas hifas se superpongan. Tome un trozo de agar con hifas recién crecidas de un solo crecimiento y transfíeralo a una nueva placa. El nuevo cultivo está aislado con una sola espora y está listo para su procesamiento posterior.

APÉNDICE 2

Crecimiento micelial de los 3 aislados de *Phytophthora sp.* bajo 3 temperaturas en los días evaluados. El diámetro se midió en cm.

Temperatura (°C)	Réplica	Aislado	Día 1		Día 2		Día 3	
			Diámetro en x	Diámetro en y	Diámetro en x	Diámetro en y	Diámetro en x	Diámetro en y
24	1	BA	0,3	0,2	3,8	3,5	5,5	6,8
24	2	BA	0,2	0,1	3,2	3,5	7,1	7,0
24	3	BA	0,3	0,2	3,9	4,8	7,0	6,9
24	4	BA	0,2	0,2	4,1	3,7	6,8	6,8
24	1	LU	1,7	1,6	6,0	5,9	6,0	5,9
24	2	LU	1,8	1,7	6,4	6,7	6,4	6,7
24	3	LU	1,5	1,6	6,1	6,1	6,1	6,1
24	4	LU	1,7	1,7	6,5	6,5	6,5	6,5
24	1	VA	2,2	2,4	6,5	6,6	6,5	6,6
24	2	VA	2,4	2,2	6,6	6,4	6,6	6,4
24	3	VA	1,0	0,8	3,4	3,5	6,2	6,3
24	4	VA	0,7	0,4	2,3	2,5	3,6	3,9
28	1	BA	0,2	0,2	4,9	5,1	7,9	7,9
28	2	BA	0,1	0,0	1,4	1,6	2,9	3,3
28	3	BA	0,1	0,2	1,4	1,2	2,9	2,8
28	4	BA	0,1	0,1	1,3	1,4	2,9	2,8
28	1	LU	0,9	0,9	3,7	3,7	6,9	6,9
28	2	LU	2,1	2,1	6,8	6,2	6,8	6,2
28	3	LU	2,5	2,4	5,3	6,2	5,3	6,2
28	4	LU	0,9	0,9	3,7	3,8	6,8	7,3
28	1	VA	2,9	2,8	3,6	3,2	7,9	7,9
28	2	VA	2,7	2,8	7,3	7,3	7,3	7,3
28	3	VA	2,7	2,8	3,5	3,2	7,9	7,9
28	4	VA	2,9	2,7	7,1	7,2	7,9	7,9
30	1	BA	0,5	0,6	5,0	5,3	7,9	7,9
30	2	BA	0,6	0,4	5,6	5,5	7,9	7,9
30	3	BA	0,3	0,2	4,8	4,8	6,2	6,4
30	4	BA	0,5	0,9	5,2	5,1	5,2	5,1
30	1	LU	2,6	2,8	6,9	6,6	7,9	7,9
30	2	LU	2,0	2,0	6,1	5,9	7,9	7,9
30	3	LU	0,5	0,5	3,2	3,2	7,1	7,2
30	4	LU	0,4	0,4	1,8	2,0	2,8	2,8
30	1	VA	3,3	3,4	7,9	7,9	7,9	7,9
30	2	VA	1,4	1,3	4,4	4,4	7,9	7,9
30	3	VA	3,1	3,1	6,7	6,0	7,9	7,9
30	4	VA	1,2	1,2	3,9	3,9	6,9	7,2

APÉNDICE 3

Promedios del crecimiento micelial (en cm) de los 3 aislados de *Phytophthora sp.* bajo 3 temperaturas en los días evaluados. Se incluye la tasa de crecimiento (TC).

Temperatura (°C)	Réplica	Aislado	Promedio	Promedio	Promedio	TC (cm/día)
24	1	BA	0,25	3,65	6,15	2,95
24	2	BA	0,15	3,35	7,05	3,45
24	3	BA	0,25	4,35	6,95	3,35
24	4	BA	0,20	3,90	6,80	3,30
24	1	LU	1,65	5,95	5,95	2,15
24	2	LU	1,75	6,55	6,55	2,40
24	3	LU	1,55	6,10	6,10	2,28
24	4	LU	1,70	6,50	6,50	2,40
24	1	VA	2,30	6,55	6,55	2,13
24	2	VA	2,30	6,50	6,50	2,10
24	3	VA	0,90	3,45	6,25	2,68
24	4	VA	0,55	2,40	3,75	1,60
28	1	BA	0,20	5,00	7,90	3,85
28	2	BA	0,05	1,50	3,10	1,53
28	3	BA	0,15	1,30	2,85	1,35
28	4	BA	0,10	1,35	2,85	1,38
28	1	LU	0,90	3,70	6,90	3,00
28	2	LU	2,10	6,50	6,50	2,20
28	3	LU	2,45	5,75	5,75	1,65
28	4	LU	0,90	3,75	7,05	3,08
28	1	VA	2,85	3,40	7,90	2,53
28	2	VA	2,75	7,30	7,30	2,28
28	3	VA	2,75	3,35	7,90	2,58
28	4	VA	2,80	7,15	7,90	2,55
30	1	BA	0,55	5,15	7,90	3,68
30	2	BA	0,50	5,55	7,90	3,70
30	3	BA	0,25	4,80	6,30	3,03
30	4	BA	0,70	5,15	5,15	2,23
30	1	LU	2,70	6,75	7,90	2,60
30	2	LU	2,00	6,00	7,90	2,95
30	3	LU	0,50	3,20	7,15	3,33
30	4	LU	0,40	1,90	2,80	1,20
30	1	VA	3,35	7,90	7,90	2,28
30	2	VA	1,35	4,40	7,90	3,28
30	3	VA	3,10	6,35	7,90	2,40

30	4	VA	1,20	3,90	7,05	2,93
----	---	----	------	------	------	------

APÉNDICE 4

Crecimiento micelial de los 3 aislados de *Diaporthe sp.* bajo 3 temperaturas en los días evaluados. El diámetro se midió en cm.

Temperatura	Réplica	Aislado	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4		Día 5	
			Diámetro en x	Diámetro en y								
24	1	D3	0,5	0,5	1,7	1,5	3,1	3,1	4,6	4,4	No medido	No medido
24	2	D3	0,5	0,5	1,7	1,6	3,8	3,1	5,1	4,4	No medido	No medido
24	3	D3	0,5	0,5	1,5	1,6	3,0	3,1	4,4	4,5	No medido	No medido
24	4	D3	0,5	0,4	1,6	1,8	3,2	3,4	4,4	4,5	No medido	No medido
24	1	D4	0,5	0,6	2,2	2,4	4,9	5,1	7,2	7,3	No medido	No medido
24	2	D4	0,4	0,4	2,2	2,4	4,9	5,1	7,2	7,6	No medido	No medido
24	3	D4	0,4	0,4	2,4	2,4	5,0	5,0	7,3	7,6	No medido	No medido
24	4	D4	0,5	0,7	5,2	5,5	5,2	5,5	7,6	7,2	No medido	No medido
24	1	D5	0,4	0,3	1,7	1,6	No medido	No medido	No medido	No medido	7,9	7,9
24	2	D5	0,3	0,3	2,2	2,0	No medido	No medido	No medido	No medido	7,9	7,9
24	3	D5	0,6	0,5	1,7	1,9	No medido	No medido	No medido	No medido	7,1	7,3
24	4	D5	0,4	0,5	1,9	1,7	No medido	No medido	No medido	No medido	7,9	7,9
28	1	D3	0,6	0,6	1,8	1,9	3,4	2,6	4,8	4,8	No medido	No medido
28	2	D3	0,6	0,7	1,9	2,0	3,5	3,5	4,9	4,7	No medido	No medido
28	3	D3	0,6	0,5	1,6	1,8	3,0	3,0	4,3	4,3	No medido	No medido
28	4	D3	0,6	0,6	1,9	1,9	3,2	3,2	4,5	4,4	No medido	No medido
28	1	D4	0,6	0,6	3,1	2,7	5,4	5,4	7,4	7,7	No medido	No medido
28	2	D4	0,6	0,6	3,2	2,9	5,6	5,6	7,5	7,9	No medido	No medido
28	3	D4	0,6	0,4	2,3	2,5	5,1	5,4	7,1	7,2	No medido	No medido
28	4	D4	0,7	0,6	2,9	2,9	5,4	5,2	7,3	7,7	No medido	No medido
28	1	D5	0,4	0,6	2,0	2,3	No medido	No medido	No medido	No medido	7,3	7,5
28	2	D5	0,4	0,4	1,8	2,0	No medido	No medido	No medido	No medido	7,4	7,2
28	3	D5	0,6	0,5	2,1	2,0	No medido	No medido	No medido	No medido	7,3	7,2

28	4	D5	0,6	0,6	2,6	2,4	No medido	No medido	No medido	No medido	7,2	7,1
30	1	D3	0,6	0,6	1,8	1,8	3,5	3,4	4,7	4,8	No medido	No medido
30	2	D3	0,5	0,5	1,9	1,7	3,6	3,6	5,4	5,2	No medido	No medido
30	3	D3	0,5	0,6	1,7	1,8	3,2	3,4	4,9	5,0	No medido	No medido
30	4	D3	0,6	0,6	1,9	1,8	3,5	3,3	4,9	4,8	No medido	No medido
30	1	D4	0,5	0,4	3,2	2,5	6,0	6,3	7,6	7,5	No medido	No medido
30	2	D4	0,4	0,5	2,4	2,3	5,4	5,2	7,6	7,9	No medido	No medido
30	3	D4	0,5	0,4	2,8	2,4	5,7	5,3	7,7	7,6	No medido	No medido
30	4	D4	0,6	0,6	2,8	2,8	5,7	5,7	7,9	7,9	No medido	No medido
30	1	D5	0,5	0,6	2,1	2,2	4,6	4,6	7,1	7,1	No medido	No medido
30	2	D5	1,0	1,0	1,9	2,9	4,9	5,2	7,1	7,3	No medido	No medido
30	3	D5	1,2	1,2	2,9	3,0	5,2	5,2	7,2	7,0	No medido	No medido
30	4	D5	0,9	0,8	2,6	2,6	4,9	5,0	7,0	7,2	No medido	No medido

APÉNDICE 5

Promedios del crecimiento micelial (en cm) de los 3 aislados de *Diaporthe sp.* bajo 3 temperaturas en los días evaluados. Se incluye la tasa de crecimiento (TC).

Temperatura (°C)	Réplica	Aislado	Promedio (Día 1)	Promedio (Día 2)	Promedio (Día 3)	Promedio (Día 4)	Promedio (Día 5)	TC (cm/día)
24	1	D3	0,50	1,60	3,10	4,50	No medido	1,33
24	2	D3	0,50	1,65	3,45	4,75	No medido	1,42
24	3	D3	0,50	1,55	3,05	4,45	No medido	1,32
24	4	D3	0,45	1,70	3,30	4,45	No medido	1,33
24	1	D4	0,55	2,30	5,00	7,25	No medido	2,23
24	2	D4	0,40	2,30	5,00	7,40	No medido	2,33
24	3	D4	0,40	2,40	5,00	7,45	No medido	2,35
24	4	D4	0,60	5,35	5,35	7,40	No medido	2,27
24	1	D5	0,35	1,65	No medido	No medido	7,90	1,89
24	2	D5	0,30	2,10	No medido	No medido	7,90	1,90
24	3	D5	0,55	1,80	No medido	No medido	7,20	1,66
24	4	D5	0,45	1,80	No medido	No medido	7,90	1,86
28	1	D3	0,60	1,85	3,00	4,80	No medido	1,40

28	2	D3	0,65	1,95	3,50	4,80	No medido	1,38
28	3	D3	0,55	1,70	3,00	4,30	No medido	1,25
28	4	D3	0,60	1,90	3,20	4,45	No medido	1,28
28	1	D4	0,60	2,90	5,40	7,55	No medido	2,32
28	2	D4	0,60	3,05	5,60	7,70	No medido	2,37
28	3	D4	0,50	2,40	5,25	7,15	No medido	2,22
28	4	D4	0,65	2,90	5,30	7,50	No medido	2,28
28	1	D5	0,50	2,15	No medido	No medido	7,40	1,73
28	2	D5	0,40	1,90	No medido	No medido	7,30	1,73
28	3	D5	0,55	2,05	No medido	No medido	7,25	1,68
28	4	D5	0,60	2,50	No medido	No medido	7,15	1,64
30	1	D3	0,60	1,80	3,45	4,75	No medido	1,38
30	2	D3	0,50	1,80	3,60	5,30	No medido	1,60
30	3	D3	0,55	1,75	3,30	4,95	No medido	1,47
30	4	D3	0,60	1,85	3,40	4,85	No medido	1,42
30	1	D4	0,45	2,85	6,15	7,55	No medido	2,37
30	2	D4	0,45	2,35	5,30	7,75	No medido	2,43
30	3	D4	0,45	2,60	5,50	7,65	No medido	2,40
30	4	D4	0,60	2,80	5,70	7,90	No medido	2,43
30	1	D5	0,55	2,15	4,60	7,10	No medido	2,18
30	2	D5	1,00	2,40	5,05	7,20	No medido	2,07
30	3	D5	1,20	2,95	5,20	7,10	No medido	1,97
30	4	D5	0,85	2,60	4,95	7,10	No medido	2,08

APÉNDICE 6

Ensayos del autor en el laboratorio



Ilustración 1. Obteniendo discos de aislados de Phytophthora sp. para la obtención de cultivos puros.



Ilustración 2. Macerando micelio de unode los aislados durante el proceso de extracción de ADN para la posterior identificación molecular.