

UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA



CENTRO DE POSTGRADOS

Maestría en Agronomía, Mención Sistemas Agropecuarios

Magíster en Agronomía

Proyecto de Innovación presentado para obtener el

Título de Magister en Agronomía

Caracterización cultural, morfológica y fisiológica *in vitro* de *Fusarium* spp., agente causal de marchitez vascular de Pitahaya, en Palora-Ecuador

AUTORA: Ing. Laura Alexandra Mosquera Paredes

DIRECTORA: Dra.C. Karina Carrera Sánchez

PUYO – ECUADOR

2018

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS

Yo Laura Alexandra Mosquera Paredes, certifico que los criterios y opiniones que constan en el Proyecto de Innovación titulado “Caracterización cultural, morfológica y fisiológica in vitro de *Fusarium* spp., agente causal de marchitez vascular de Pitahaya, en Palora-Ecuador” son de mi exclusiva responsabilidad, respetando fuentes de información de terceros, así como de pensamiento inéditos y que los resultados derivados del proceso de investigación son propiedades de la Universidad Estatal Amazónica para hacer uso del contenido con fines académicos o de investigaciones.



Ing. Laura Alexandra Mosquera Paredes



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

Centro de Postgrados

AVAL

Quien suscribe Karina María Elena Carrera Sánchez, Directora del Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Innovación titulado: Caracterización cultural, morfológica y fisiológica in vitro de *Fusarium* spp., agente causal de marchitez vascular de Pitahaya, en Palora-Ecuador a cargo de Laura Alexandra Mosquera Paredes egresada de la primera cohorte de la Maestría en Agronomía mención Sistemas Agropecuarios de la Universidad Estatal Amazónica.

Certifico haber acompañado el proceso de elaboración del Proyecto de Innovación y considero cumple los lineamientos y orientaciones establecidas en la normativa vigente de la institución por lo que se encuentra listo para ser sustentado.

Por lo antes expuesto se avala el Proyecto de innovación para que sea presentado ante la Dirección de Posgrado como forma de titulación como Magister en Agronomía mención Sistemas Agropecuarios y que dicha instancia considere el mismo a fin de que tramite lo que corresponda.

Para que a si conste, firmo la presente a los 31 días del mes de octubre de 2018.

Atentamente,

Dra. C. Karina Carrera Sánchez, Ph.D.

DIRECTORA DEL PROYECTO DE INNOVACION

CERTIFICADO DE APROBACIÓN POR TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

En nuestra calidad de tribunal de sustentación de proyecto de innovación titulado, "Caracterización cultural, morfológica y fisiológica in vitro de *Fusarium* spp., agente causal de marchitez vascular de Pitahaya, en Palora-Ecuador" de la autora Laura Alexandra Mosquera Paredes, maestrante en Agronomía, mención en Sistemas Agropecuarios, certificamos que reúne los requisitos y méritos suficientes, para su aprobación. Los miembros del tribunal que examinaron el presente documento, aprobamos el proyecto de investigación.

MIEMBROS DEL TRIBUNAL



Dra. C. Laura Scalvenzi, Ph.D.



Dra. C. Dunia Chávez Esponda, Ph.D.



Ing. Sandra Soria Re, Ms.C.



UNIVERSIDAD ESTATAL AMAZÓNICA

SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND



Oficio No. 078-IL-UEA-2018

Puyo, 23 de noviembre de 2018

Por medio del presente **CERTIFICO** que:

El trabajo de titulación correspondiente a la ING. MOSQUERA PAREDES LAURA ALEXANDRA, con C.I. 1600532509, con el Tema: **"Caracterización cultural, morfológica y fisiológica in vitro de *Fusarium spp.*, agente causal de marchitez vascular de Pitahaya, en Palora-Ecuador"**, de la Maestría en Agronomía, Mención en Sistemas Agropecuarios, Directora de proyecto Dra. C. Carrera Sánchez Karina María Elena, ha sido revisado mediante el sistema antiplagio URKUND, reportando una similitud del 1%, Informe generado con fecha 20 de noviembre de 2018 por parte de la directora, conforme archivo adjunto.

Particular que comunico para los fines pertinentes

Atentamente,

Ing. Italo Marcelo Lara Pilco MSc.

ADMINISTRADOR DEL SISTEMA ANTIPLAGIO URKUND – UEA - .

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primeramente a Dios por bendecirme para llegar a cumplir esta meta tan anhelada.

Agradezco profundamente a mis padres y familiares por motivarme constantemente a culminar mis estudios.

A mis hijos por su infinita paciencia, por su tierna compañía y su inagotable apoyo, gracias por compartir mi vida y mis logros.

A mi directora de tesis, Dra. C. Karina Carrera por su esfuerzo y dedicación quien, con sus conocimientos, su experiencia, su paciencia y su motivación ha logrado en mí que pueda terminar mi investigación con éxito.

A la MsC. Sandra Soria e Ing. Daisy Changoluisa por su apoyo durante la investigación y gran amistad.

A los Dr. C. Dunia Chávez, Carlos Bravo y Segundo Valle, por su ayuda en el procesamiento estadístico de la investigación.

A las autoridades y docentes de la Universidad Estatal Amazónica quienes oportunamente me apoyaron en el desarrollo del proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios, por darme la vida a través de mis queridos Padres quienes con mucho cariño, amor y ejemplo han hecho de mí una persona con valores para poder desenvolverme como: hija, madre y profesional.

En especial a mi mamá Magdalena quien desde el cielo me da muchas paz y tranquilidad para terminar este sueño tan anhelado.

A mi papá Juan y hermanos Marco y Daniel quienes con su empuje y ánimos me han ayudado a salir adelante frente a las adversidades encontradas durante esta trayectoria universitaria.

A mis Hijos Ziols y Taylor, quienes son el motivo y la razón que me ha llevado a seguir superándome día a día, para alcanzar mis más apreciados ideales de superación.

A mis compañeros de aula y a toda la comunidad Universitaria, por completar mi formación profesional y personal.

RESUMEN EJECUTIVO

El presente trabajo tiene por objetivo determinar la caracterización cultural, morfológica y fisiológica *in vitro*, del hongo *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez vascular de pitahaya amarilla (*Hylocereus* spp), en la Región Amazónica del Ecuador. Se recolectaron raíces de 8 fincas de producción de pitahaya amarilla ubicadas en el cantón Palora de la provincia de Morona Santiago. Se realizaron aislamientos que fueron evaluados e identificados mediante caracterización cultural (velocidad de crecimiento, color de micelio, color de reverso de la caja de Petri del aislado, borde y textura) morfológica (tamaño de microconidias, macroconidios y clamidosporas) y fisiológicas (Influencia de pH en el crecimiento micelial), con la finalidad de contar con un banco de aislados monospóricos para el control biológico en futuras investigaciones. Los experimentos se realizaron en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica. Para los ensayos se utilizaron medios de cultivo semi sólido (PDA y CLA) y medio de cultivo líquido PDB. La velocidad de crecimiento radial fue de 2,8 mm.día⁻¹ de los aislados, independientemente de su procedencia. No se encontraron diferencias significativas en la caracterización cultural en cuanto al borde y textura de las colonias entre los aislados. Se detectaron variaciones en su coloración, observándose colores rojos, rojo pálido, rojo amarillento hasta el rosa claro. No se observaron diferencias significativas en cuanto al tamaño de microconidias, macroconidios y conidióforos, determinándose que el pH 7 es el óptimo para el desarrollo de *Fusarium* spp.

Palabras claves. *Fusarium*, pitahaya amarilla (*Hylocereus* spp), aislados, Palora, Amazonia.

ABSTRACT AND KEYWORDS

The objective of this work is to determine cultural, morphological and physiological characterization *in vitro* of the fungus *Fusarium* spp., causal agent of the vascular wilt of yellow pitahaya (*Hylocereus* spp.) in the Amazonian Region of Ecuador. Roots were collected from 8 farms of yellow pitahaya production located in the Palora canton of Morona Santiago province. Isolates were evaluated and identified by cultural characterization (growth rate, mycelial color, reverse color of the isolated Petri dish, border and texture.) Morphological (size of microconidia, macroconidia and chlamydospores) and its physiological characteristics (Influence pH in mycelial growth), in order to have a bank of monosporic isolates for biological control in future research. The experiments were carried out in the Microbiology laboratory of the Amazon State University. Semi-solid culture media (PDA and CLA) and liquid culture medium PDB were used for the assays. The radial growth rate was 2,8 mm.day⁻¹ of the isolates, regardless of their origin. No significant differences were found in the cultural characterization regarding the border and texture of the colonies among the isolates. Variations in its coloration were detected, observing red colors, pale red, yellowish red to light pink. No significant differences were observed in the size of microconidia, macroconidia and conidiophores, determining that pH 7 is the optimum for the development of *Fusarium* spp.

Keywords. *Fusarium*, yellow pitahaya (*Hylocereus* spp), isolated, Palora, Amazonia.

TABLA DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Origen, importancia y clasificación de la pitahaya	4
2.2. Descripción botánica.	4
2.3. Variedades de pitahaya	5
2.4. Principales enfermedades del cultivo	5
2.4.1. Antracnosis	5
2.4.2. Pudrición suave	6
Es causada por la bacteria <i>Erwinia</i> sp. (Winslow et al.)	6
2.4.3. Nematodos Fitopatógenos	6
2.4.4. Pudrición basal	6
2.4.4.1. <i>Fusarium</i> spp.	7
2.4.4.2. Clasificación taxonómica	7
2.4.4.3. Descripción <i>in vitro</i> de <i>Fusarium</i>	7
2.4.4.4. Epifitología	8
2.4.4.5. Ciclo de vida del patógeno	8
2.4.4.6. Síntomas y signos	10
2.4.4.7. Hospederos de <i>Fusarium</i> spp.	10
2.4.4.8. Características culturales	11
2.4.4.9. Características morfológicas.....	11
2.4.4.10. Medidas de control	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
3.1. LOCALIZACIÓN DEL AREA DE ESTUDIO	14
3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN	14
3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN	14
Análisis de la zona de estudio	14
Recolección de muestras con síntomas de marchitez vascular.....	17
Aislamiento y obtención de cultivos puros de <i>Fusarium</i> spp.....	17
Identificación de micobiota asociada a raíz de pitahaya	17
Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp.....	17

Obtención de cultivos puros de <i>Fusarium</i> spp.	18
Conservación de <i>Fusarium</i> spp.	18
3.3.1. Identificación de aislados de <i>Fusarium</i> spp.	18
3.3.2. Caracterización aislados de <i>Fusarium</i> spp. en base a su morfología	19
3.3.3. Caracterización para aislados de <i>Fusarium</i> spp. en base a su fisiología	20
3.3.3.1. Influencia del pH en el crecimiento micelial de <i>Fusarium</i> spp.	20
3.4. RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES.....	21
Recursos humanos	21
Materiales	21
Equipos	21
Medios de cultivos.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIONES	22
Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp.	22
4.1 . Identificación de aislados de <i>Fusarium</i> spp. en pitahaya en base a sus características culturales.....	24
4.2. Caracterización aislados de <i>Fusarium</i> spp. en pitahaya en base a su morfología	27
4.3. Caracterización para aislados de <i>Fusarium</i> spp. en base a su fisiología	32
Influencia de pH en el crecimiento micelial	32
CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES	34
BIBLIOGRAFÍA	35

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Mapas de: A) Ecuador, B) Provincia de Morona Santiago y C) Ubicación de las fincas muestreadas.....	15
Figura 2. Diagrama de fuljo para caracterización de <i>Fusarium</i> spp. de pitahaya.	16
Figura 3. Aislados de <i>Fusarium</i> spp. en medio PDA obtenidos a partir de plantaciones de pitahaya.....	22
Figura 4. Macroconidios y clamidosporas de <i>Fusarium</i> spp. micrografía con aumento de 1000X	23
Figura 5 a. Esporas de <i>A. niger</i> en medio PDA b. microfotografía con aumento de 1 000X	23
Figura 6. a) Bacterias en medio PDA. b) Bacterias Gram (-) coloreadas con tinción de Gram.	24
Figura 7. Crecimiento micelial de los diferentes aislados de <i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo PDA a 25 ± 2 °C.....	25
Figura 8. Microconidias de <i>Fusarium</i> spp. de forma ovalada y elíptica perteneciente al aislado UEA-Fsp4 en medio CLA a los 8 días de incubación microfotografía con aumento de 1000 X	27
Figura 9. Macroconidios de <i>Fusarium</i> spp. del aislado UEA-Fsp4 en medio CLA a los 14 días de incubación, microfotografía con aumentos de 1 000X	28
Figura 10 a. Clamidosporas de <i>Fusarium</i> spp del aislado UEA-Fsp4 y b. UEA-Fsp6 en medio CLA a los 18 días de incubación microfotografía con aumento de 1000 X.....	28
Figura 11. Largo promedio de microconidias producidos por aislados de <i>Fusarium</i> spp a los 7 días de incubación en medio CLA.....	29
Figura 12. Largo promedio de macroconidias producidos por aislados de <i>Fusarium</i> spp. a los 14 días de incubación en medio CLA	30

Figura 13. Largo promedio de clamidosporas producidos por aislados de <i>Fusarium</i> spp a los 14 días de incubación en medio CLA.....	30
Figura 14. Concentración promedio de conidios de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. en medio CLA a los 18 días de incubación.....	31
Figura 15. Dinámica de peso de micelio en diferentes pH de <i>Fusarium</i> spp. de pitahaya en medio de cultivo PDB a los 21 días de incubación a 25 ± 2 °C	32

TABLA DE TABLAS

Tabla 1. Plantaciones de producción de pitahaya muestreadas	14
Tabla 2 Procedencia de aislados de <i>Fusarium</i> spp.	22
Tabla 3. Color del anverso y reverso del micelio de las colonias de los aislados de <i>Fusarium</i> spp. de pitahaya en medio PDA a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ incubados durante 18 días.....	26

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La fruta del dragón, también conocida como pitahaya, es producida por un cactus tropical trepador del género (*Hylocereus*) (Britton & Rose) y es un miembro de las cactáceas. (He et al., 2012). Estas frutas son autóctonas del continente americano de la región Andina y se encuentra distribuida geográficamente en Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela (Stella et al., 2012).

Hay tres especies que tienen frutos comerciales valiosos tales como *Hylocereus undatus*, (Hunt) de cascara roja, carne blanca; *Hylocereus polyrhizus* (Britton & Rose) cáscara roja y carne roja e *Hylocereus megalantus* (Ralf Bauer) con cascara amarilla, carne blanca (Wiwik et al., 2013).

Según Rodríguez (1997), Pozo (2011), Stella et al. (2012), la pitahaya tiene gran importancia como cultivo debido a su amplia variabilidad en cuanto a forma y tamaño del fruto, esquejes, colores de cáscara, la pulpa y a sus períodos de fructificación.

Es considerado un frutal exótico, por su sabor, apariencia, calidad y propiedades nutraceuticas; con buen potencial de mercado tanto a nivel nacional como internacional. En Ecuador el cultivo de pitahaya es relativamente nuevo, pero actualmente existen grandes extensiones de cultivo localizadas en las provincias de Guayas con la producción de *H. undatus*, en Pichincha con la producción de *H. megalantus* y Morona Santiago *Hylocereus* spp.

Desde hace aproximadamente diez años, en el cantón Palora, provincia de Morona Santiago, inició el cultivo de pitahaya como alternativa de diversificación de productos con la finalidad de consumo local, nacional y con miras a la exportación, para generar ingresos económicos y mejorar la calidad de vida de los agricultores. En la actualidad tiene mayor importancia debido a que la fruta está posicionada en el mercado nacional e internacional.

El cultivo de pitahaya es importante por ser un producto no tradicional y tener un gran potencial de exportación; esto se debe a que la fruta tiene un sabor dulce agradable y tener propiedades medicinales (Crane y Balerdi, 2005).

Hace unos años se identificó una variedad de pitahaya endémica de la Amazonía Ecuatoriana llamada ecotipo Palora, de la cual no existe un estudio botánico para determinar la especie a la que corresponde.

En el cantón Palora las plantaciones de pitahaya iniciaron como una actividad económica alternativa; en la actualidad existen aproximadamente 1 200 hectáreas sembradas y en producción; con aproximadamente 228 productores dedicados como única actividad económica. La fruta se comercializa en el cantón en centros de acopio quienes ofertan al mercado nacional y exportan a Estados Unidos, Canadá, Hong Kong, Singapur, España, Francia y Malasia convirtiéndose el cultivo en una actividad económica insuperable del cantón.

Por su interés económico se ha intensificado la producción cubriendo extensiones considerables de terreno en monocultivo de la misma manera incrementando problemas fitosanitarios que afectan el rendimiento y la calidad de la fruta, sin ninguna información científica acerca de la determinación de agentes causales. Actualmente se han detectado en el cultivo síntomas como clorosis general de la planta, enanismo, marchitamiento, lesiones café oscuras en los tallos junto con zonas cloróticas y muerte vascular; sin embargo; por similitud a los síntomas se presume la presencia del hongo *Fusarium*, Además las condiciones climatológicas del cantón registran una humedad relativa promedio del 85% y una temperatura promedio de 24 °C; condiciones propicias para la proliferación de hongos; Pero también Gonzales et al. (2012) informan que la infección por nematodos formadores de agallas causa cambios fisiológicos en la raíz, lo que provoca como consecuencia la resistencia al hongo *Fusarium* spp. La presencia de patógenos en el suelo es inherente por su historial de uso con cultivos de naranjilla.

Las enfermedades causadas por *Fusarium* spp. se encuentran prácticamente en todas las áreas del mundo y pueden ser muy agresivas en climas húmedos. Existen varias especies de interés que han ocasionado pérdidas económicas a nivel internacional como el brote del mal de Panamá, donde el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* W.C Snyder & H. N. Hansen, devastó extensivamente a los plantíos de plátano en América Central en la década de 1960. Además ocasiono epidemias de podredumbre de espiga en trigo y avena, causando pérdidas de millones de dólares para los productores de Estados Unidos (Melo, 2015).

La pitahaya es una especie que no presenta similitud de manejo con otras plantaciones de importancia económica. Los productores del cantón Palora han desarrollado tecnologías de manejo empíricas con programas fitosanitarios no específicos para los agentes causales de las enfermedades. El uso inadecuado de pesticidas puede causar resistencia de los patógenos y residualidad de ingredientes activos en la fruta, ocasionando pérdidas económicas que actualmente se combate retirando la planta con raíz del cultivo y replantando sin previo tratamiento del suelo.

Es por ello que resulta importante el estudio de este patógeno ya que se pone a disposición de la comunidad científica una colección de cultivos de *Fusarium*.spp. adecuadamente caracterizadas, así mismo se logró demostrar que el agente causal de marchitez vascular de pitahaya constituye *Fusarium*. spp. Con esta caracterización e identificación del causante de la enfermedad se reducirá las pérdidas económicas de los productores, ocasionadas por este hongo fitopatógeno en las plantaciones de pitahaya.

PROBLEMA CIENTÍFICO

El cantón Palora reviste gran importancia en la producción de pitahaya; sin embargo, no se ha caracterizado cultural, morfológica y fisiológicamente a *Fusarium* spp. a nivel de laboratorio causante de la marchitez vascular, enfermedad responsable de las pérdidas económicas para los productores del sector.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se propone en esta investigación la siguiente hipótesis y objetivos:

HIPÓTESIS DE LA INVESTIGACIÓN

Mediante el aislamiento y la caracterización cultural, morfológica y fisiológica del agente causal del marchitamiento vascular de la pitahaya, se logrará identificar *in vitro* el género *Fusarium* spp.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las características culturales, morfológicas y fisiológicas *in vitro* de *Fusarium* spp., agente causante del marchitamiento vascular de la pitahaya (*Hylocereus* spp.), en el cantón Palora, provincia de Morona Santiago-Ecuador.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar aislados de *Fusarium* spp. en pitahaya en base a sus características culturales.
2. Caracterizar aislados de *Fusarium* spp. en pitahaya en base a su fisiología.
3. Caracterizar aislados de *Fusarium* spp. en pitahaya en base a su morfología.

CAPITULO II

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Origen, importancia y clasificación de la pitahaya

El género *Hylocereus* pertenece a la familia de las cactáceas con 1 438 especies, dentro de 124 géneros. Sus frutos son comestibles de alto valor nutricional por ser ricos en vitamina C, zinc y potasio y de gran importancia económica por su alta tolerancia a la sequía (Anderson, 2001; Nyffeler et al., 2010).

La clasificación aceptada por la International Cactaceae Systematics Group para la pitahaya según Hunt (2006) perteneciente al Reino: Plantae; Subreino: Viridiaeplantae; División: Tracheophyta; Subdivisión: Spermatophytina; Infradivisión: Angiospermae; Clase: Magnoliopsida; Superorden: Caryophyllanae; Orden: Caryophyllales; Familia: Cactaceae; Subfamilia: Cactoideae; Género: *Hylocereus*

2.2. Descripción botánica.

Según García et al. (2009); Medina (2015) y Montesinos et al. (2015), la pitahaya es una planta epífita facultativa lo que explica su comportamiento trepador con tallo segmentado con facilidad de emitir raíces secundarias. La llamativa forma de su tallo es una característica evolutiva que le permite captar humedad, ya sea de la lluvia o del ambiente y que lleva el agua directamente a la zona de raíces ejerciendo las veces de un canal. Las espinas pequeñas comparadas con las de otros cactus que crecen en ecosistemas xerofíticos, son una evidencia de su evolución en ecosistemas selváticos o boscosos, ya que no necesita protegerse de la luz solar directa y de los predadores debido a que en su hábitat natural está protegida.

Sus características fundamentales son:

Raíz: Las raíces primarias crecen siguiendo el nivel del suelo, profundizan de 5 a 25 cm y su área de expansión es de aproximadamente 30 cm de diámetro. Las raíces secundarias se producen después de una prolongada sequía siendo sus funciones el fijar y sostener las plantas a su tutor y absorber sustancias nutritivas y agua del ambiente.

Tallos: Son cladodios suculentos, verdes y fotosintéticos, se caracterizan por presentar costillas o aristas gruesas que los recorren longitudinalmente.

Hojas: Se transforman en acúleos (de 2 a 4 mm) dispuestos en los bordes, formando fascículos en las denominadas aréolas (pequeñas almohadillas homólogas de las yemas que originan brotes e inflorescencias).

Flores: Son hermafroditas y actinomorfas, se insertan directamente sobre los tallos, tienen forma tubular, son grandes (de 20 a 40 cm de longitud y hasta 25 cm en su diámetro mayor), muy vistosas, resultando atractivas para los polinizadores, se abren solamente en la noche, aparecen en general solitarias y presentan un periantio heteroclamídeo. El verticilo sexual masculino lo integran numerosos estambres dispuestos en espiral que producen granos de polen tricolpados. El ovario del gineceo es ínfero con numerosos carpelos soldados y unilocular que se prolonga en un único estilo con brácteas completamente verdes o verdes con orillas rojas y pétalos blancos, amarillos o rosados, el cual contiene numerosos primordios seminales crasinucelados y bigtégmicos, con largos funículos arreglados en una placentación basal o parietal. La flor presenta una cámara nectarial.

Futo: El fruto es una baya globosa o subglobosa (dehiscente en *Hylocereus*), mide en promedio de 8 a 15 cm de largo y de 6 a 10 cm de diámetro, su pericarpelo es de color rojo o amarillo.

2.3. Variedades de pitahaya

Las especies *H. undatus*, *H. polyrhizus*, *Hylocereus costaricensis* (Britton & Rose), *Hylocereus triangularis* (Haw) y *Hylocereus purpusii* (Lourteig), tradicionalmente conocidas como pitahaya roja, son cultivadas principalmente en Centro América, en tanto que la pitahaya amarilla *Hylocereus* spp. con 20 especies, se encuentra distribuida en Sudamérica (Tel et al., 2013).

La taxonomía de *Hylocereus* spp (Britton & Rose) es uno de los aspectos que no se han resuelto por completo. Se señala que el género es poco colectado, estudiado y algunas especies son pobremente conocidas (Bravo et al., 2011).

2.4. Principales enfermedades del cultivo

Algunos problemas sanitarios del cultivo de pitahaya son causados por microorganismos patógenos que pueden deteriorar la planta impidiendo la nutrición por el bloqueo de alimento y agua, la alteración del metabolismo por toxinas del patógeno o el consumo del contenido de las células, todo lo cual se traduce en una disminución de la producción (Peñuela, 2004).

2.4.1. Antracnosis

Enfermedad causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. & Sacc.) microorganismo que vive en la materia orgánica y en ocasiones especiales tiene la capacidad de volverse patógeno, prefiriendo atacar tejidos muy jóvenes o tejidos muy viejos y débiles. Los ataques más severos ocurren cuando coinciden el estado de susceptibilidad del cultivo

con un tiempo lluvioso y días con permanente humedad relativa, mayor del 90%. Las fuentes de inóculo se encuentran en toda la planta (Alarcón y Chavarriaga, 2007).

2.4.2. Pudrición suave

Es causada por la bacteria *Erwinia* sp. Winslow et al. (1920) que puede vivir en condiciones de escasez de oxígeno; afecta a las pencas de la pitahaya, que presentan síntomas de manchas amarillas de aspecto húmedo, que acarrearán la pudrición del tejido, con olor fuerte. La bacteria, que penetra por las heridas de los tejidos, se puede diseminar por medio de herramientas contaminadas y por insectos. Su desarrollo se favorece con condiciones de alta humedad relativa (90%) y alta temperatura (Delgado et al., 2010).

2.4.3. Nematodos Fitopatógenos

Según Castaño et al. (1989) El nematodo agallador, o del nódulo, *Meloidogyne* sp., penetra en las raíces, encontrando un sitio adecuado para la alimentación, se torna sedentario e induce la formación de agallas que son visibles a la vista y variables en tamaño. La parte aérea de la planta presenta cladodios amarillos y angostos, los brotes mueren, las plantas detienen su crecimiento y tienen menor producción.

El nematodo *Helicotylenchus* spp. es ectoparásito, semiendoparásito o endoparásito, producto de la afectación de este nematodo es la formación de lesiones pequeñas circulares de color café oscuras a negras en la epidermis de las raíces (Luc et al., 2005).

Cuando es afectado por *Helicotylenchus* spp. Castaño et al. (1989) manifiestan que en la parte aérea de la pitahaya amarilla los síntomas son similares a los producidos por *Meloidogyne* sp.

Otros nematodos que se encuentran con menor frecuencia en pitahaya amarilla son: *Dorylaimus*, *Tylenchus*, *Aphelenchus*, *Pratylenchus*, *Tylenchorhynchus*, *Trichodorus*, *Hoplotilus*, *Hemicycliophora* (Guzmán et al., 2012).

2.4.4. Pudrición basal

Es ocasionado por el hongo *Fusarium oxysporum* (Schltdl) Los primeros síntomas son pequeñas manchas de color entre amarillo y marrón, que dan lugar, en condiciones favorables, a una pudrición blanda (Hyo et al., 2007).

Se inicia con una lesión amarilla en el sitio de unión del fruto con el cladodio. La infección avanza hacia el centro del fruto produciendo su pudrición parcial, puede llegar a afectar el 50 % del fruto. El problema es más evidente cuando se acerca la cosecha (Rojas et al., 2008; Suárez, 2011; Murcia et al., 2013).

Murcia et al. (2013) mencionan como agentes causales de la pudrición basal del fruto a *Fusarium moniliforme* Sheldon con mayor frecuencia y *F. oxysporum* como secundario.

Los cladodios presentan lesiones de color amarillo, que luego se ponen de color marrón, se desarrolla en forma ascendente y puede causar la muerte de la planta (Wright et al., 2007). Las heridas ocasionadas a las raíces por maquinaria o la afección de nematodos aumentan la susceptibilidad al marchitamiento y favorecen el desarrollo del hongo.

2.4.4.1. *Fusarium* spp.

El género *Fusarium* es uno de los hongos más estudiados, son un grupo cosmopolita que comúnmente colonizan partes de plantas aéreas y subterráneas, ya sea como invasores primarios o secundarios. Algunos *Fusarium* son comunes en el suelo y es raro encontrar una raíz necrótica de una planta en la mayoría de los suelos agrícolas que no están colonizados por al menos una especie de *Fusarium*. Es el tercer género de hongos con mayor número de especies que produce una amplia gama de toxinas y metabolitos secundarios que se asocian a enfermedades de plantas, pueden también causar daño a la salud de hombres y animales. Según Nelson et al. (1983) y Leslie y Summerell (2006) las especies en el género *Fusarium* son altamente variables debido a su composición genética y por los cambios en el medio ambiente en los que crecen causan cambios morfológicos especialmente de los macroconidios, es la base para la identificación.

La marchitez por *Fusarium*, también conocida como "fusariosis" o "muerte súbita", comienza con amarillamiento de las ramas y marchitez, hasta que la planta entera se seca como consecuencia de la podredumbre de la raíz y el cuello. La enfermedad se observa en plantas adultas; sin embargo, bajo condiciones favorables, como suelos con un historial de enfermedades, altas temperaturas y humedad, las plantas jóvenes pueden morir bajo el ataque del patógeno (Teixeira et al., 2017).

2.4.4.2. Clasificación taxonómica

Según Crous et al. (2004) la clasificación taxonómica de *Fusarium* es: Dominio: Eucariota; Reino: Fungi; División: Ascomycota; Clase: Ascomycetes; Subclase: Sordarymycetes; Orden: Hypocreales; Familia: Nectriaceae; Género: *Fusarium*.

2.4.4.3. Descripción *in vitro* de *Fusarium*

La descripción original del género *Fusarium* data de 1908. Las principales características son la formación de conidios alargados, fusiformes, con varios septos (Gerlach y Nirenberg, 1982).

Los hongos fitopatógenos del género *Fusarium* son ascomicetes, poseen un micelio altamente desarrollado, septado y conidióforos característicos del género, algunas especies pueden presentar un talo unicelular (Villa et al., 2015).

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento de *Fusarium*. Las esporas están dispersas en el micelio aéreo. Los macroconidios son curvos, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Los microconidios son comúnmente unicelulares, elipsoidales, fusiformes, claviformes, piriformes o su globosos, similares en ancho a los macroconidios, con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas mucosas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre se producen ambos tipos de esporas (Leslie y Summerell, 2006).

De forma general, la enfermedad infecta a la planta por el sistema radicular, ingresando por heridas que pueden darse por acción de nematodos o insectos, aunque también puede darse por sea penetración directa; las esporas y micelios ascienden por el xilema de la planta. Se propagan por medio de esporas, clamidosporas o micelio presentes en el agua de riego, equipo agrícola, estructuras vegetativas y semillas (Santema, 2015).

2.4.4.4. Epifitiología

La temperatura es uno de los factores ambientales que mayor influencia tiene en el desarrollo de la enfermedad y en la expresión de los síntomas, así como la nutrición de la planta. La temperatura óptima para el desarrollo del patógeno está entre 25 y 30 °C, una temperatura mínima de 5 °C y una temperatura de máxima de 37 °C, el punto termal de muerte en el suelo es de 57,5 a 60 °C durante 30 minutos. La esporulación óptima ocurre entre los 20 a 25 °C, con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El pH óptimo es de 7,7 y puede desarrollarse entre 2,2 y 9,0. El hongo es aerobio y sus poblaciones se reducen con la saturación de agua en el suelo (De Granada et al., 2001).

2.4.4.5. Ciclo de vida del patógeno

Fusarium spp., es un habitante del suelo que sobrevive como micelio en residuos de plantas infectadas y en todas sus formas esporales, como clamidosporas. Su diseminación en el campo a distancias cortas se realiza por medio de agua y maquinaria agrícola contaminada y en largas distancias principalmente en trasplantes de plantas infectadas o en el suelo llevado con ellos. Por lo general, una vez que es infectada con *Fusarium* spp., se mantendrá indefinidamente (Leslie y Summerell, 2006).

Cuando las plantas sanas se siembran en suelo contaminado, el tubo germinativo de las esporas o el micelio penetran las puntas de las raíces directamente o entran a través de heridas o en el momento de formación de raíces laterales. El micelio avanza hacia la corteza de la raíz intercelularmente, y cuando llega a los vasos del xilema entran en ellos por los haces vasculares (Agrios, 2005).

La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en dormancia presentes en tejidos muertos del hospedante, las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan por la corteza a la endodermis y entran a los vasos del xilema, también las hifas pueden penetrar a través de las heridas hechas de forma mecánica o por nematodos, insectos o miriápodos. Sin embargo, la colonización directa por las raíces es el método más común de penetración del patógeno (De Granada et al., 2001).

El micelio permanece exclusivamente en los vasos y viaja a través de ellos, sobre todo hacia arriba, hacia el tallo y la corona de la planta. Mientras en los vasos, el micelio se ramifica y produce microconidias, las cuales se separan y son llevadas hacia la parte aérea de la planta en el flujo de la savia (Dean et al., 2012).

La obstrucción de los haces por el micelio, esporas y el aplastamiento de los vasos por la proliferación de las células del parénquima, es responsable de pérdida de agua de la planta infectada. Cuando las hojas transpiran más agua que las raíces y el tallo, los estomas se cierran y las hojas se marchitan y finalmente muere la planta. Luego, el hongo invade todos los tejidos de la planta, llega a la superficie de la planta muerta, y hay esporulación. Las esporas pueden ser diseminadas a plantas sanas o nuevas áreas por el viento, el agua, etc.

Las microconidias germinan en donde se detiene el movimiento ascendente de la savia, el micelio penetra en la pared superior de los haces vasculares, produciendo más microconidias. El micelio también avanza lateralmente a los vasos adyacentes, penetrando a través de los haces (Leslie y Summerell, 2006).

Los marchitamientos vasculares son enfermedades destructivas producidas por diversos agentes etiológicos y se encuentran ampliamente distribuidos en poblaciones y cultivos de un sin número de especies vegetales. Las plantas afectadas que se dejan en el campo son la principal fuente de inóculo, ya que el patógeno esporula fácilmente en las plantas enfermas y es diseminado por el agua y el viento a plantas sanas (Agrios, 2005).

2.4.4.6. Síntomas y signos

La enfermedad se caracteriza por la aparición unilateral de los síntomas de marchitamiento, acompañada del amarillamiento parcial de las hojas y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma, a causa de la interferencia en el crecimiento, en estados iniciales en las hojas pueden observarse la mitad clorótica y la otra mitad de un color verde normal. Se observa además un enanismo de los brotes y disminución del crecimiento de la planta. Los síntomas de la enfermedad avanzan afectando la planta hacia arriba hasta causar un marchitamiento general y la muerte (De Granada et al., 2001).

Al comienzo las plantas muestran marchitez en las horas más calurosas del día recuperándose al atardecer. En los estadios finales, las raíces principales y la base del tallo presentan necrosis vascular. Cuando se corta el tallo se observa el sistema vascular de color marrón. El tallo cortado transversalmente, presenta en los haces vasculares una coloración amarillenta o marrón con la muerte y lisis de los tejidos, sin afectar la medula; este es un aspecto muy importante para diagnosticar la enfermedad y distinguirla de otras enfermedades vasculares (Agrios, 2005).

Este hongo infecta a la planta a través de la raíz y una vez, que alcanza el sistema vascular coloniza toda la planta, para luego reproducirse produciendo microconidios, macroconidios y clamidosporas. Los microconidios y macroconidios son responsables de la infección de nuevas plantas y de la distribución del patógeno en el cultivo. Las clamidosporas son esporas de reposo o resistentes y permanecen viables en el suelo por largos periodos de tiempo. El patógeno puede estar en el suelo como saprófito durante muchos años sin un hospedante (Turlier et al., 1994).

2.4.4.7. Hospederos de *Fusarium* spp.

Según Revelo (1991) menciona que existen diferentes plantas hospederas que son atacadas por formas especiales o razas de *Fusarium oxysporium* f.sp tales como apio (*Apium graveolens* L.), espárragos (*Asparagus officinalis* L.), camote (*Ipomoea batatas* L.), remolacha (*Beta vulgaris* L.), cebolla (*Allium cepa* L.), crisantemo (*Crisantemo* L.), banano (*Musa paradisiaca* L.) heliconias (*Heliconia* L.), calabaza (*Cucurbita naxina* Duchesne Lam), claveles (*Dianthus caryophyllus* L.), palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jack.), haba (*Vicia faba* L.), fresa (*Fragaria* L.), lenteja (*Lens culinaris* L.), tabaco (*Nicotina petunoides* L.), maracuyá (*Passiflora edulis* Sims), soya (*Glycine max* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.) y algodón (*Gossypium herbaceum* L.).

2.4.4.8. Características culturales

En varios estudios se evalúan características culturales de las colonias de *Fusarium* spp: textura, el color del anverso y del reverso de las colonias, la pigmentación y velocidad de crecimiento en PDA. Para obtener resultados confiables y repetibles se requiere una rigurosa y cuidadosa preparación del medio de cultivo. Para evaluar las características culturales se deben preparar inóculos e incubarlos mediante el uso de procedimientos estandarizados. En ocasiones las características culturales pueden usarse con bastante éxito como criterio en la clasificación de algunas especies de *Fusarium*. Las colonias de *F. oxysporum* crecidas sobre PDA son altamente variables, pueden producir pigmentaciones sobre agar desde incoloras, violeta pálido, violeta oscuro a rojo. La textura puede ser flocosa, esparcida, en algunas ocasiones pueden mutar hacia colonias pionnotales o con la presencia húmeda del micelio el cual crece muy pegado al agar. El anverso de las colonias varía desde el anaranjado hasta el violeta (Leslie y Summerell, 2006).

2.4.4.9. Características morfológicas

Las especies de *Fusarium* son variables en su composición genética y en su respuesta adaptativa al medioambiente, que puede causar cambios morfológicos. La base en la identificación de especies de *Fusarium* son los macroconidios. No todas las especies de *Fusarium* producen microconidios, sin embargo, esta es una característica importante. Son producidos en el micelio aéreo, nunca en esporodoquios (Nelson et al., 1983).

Los macroconidios tienen forma de media luna o canoa y constan de una célula apical y una célula basal. Hay cuatro formas de células apicales: obtusa, papilada, gancho y elongada. La célula basal tiene cuatro formas: de pie, pie elongado, en forma de muesca y apenas muescado. La célula basal es la menos curvada de todas las células en los conidios, si esta es curvada el resto también. Los caracteres más importantes son los relacionados con la longitud y la forma de la célula, las células conidiogénicas en las cuales se forman, y su disposición alrededor de ellas son aspectos utilizados para el diagnóstico. Por lo general tienen de cero o uno septo, algunas especies tienen dos septos, pueden ser de forma oval, reniforme, truncada, piriforme, globosa, napiforme, esférica y fusiforme. Las clamidosporas son estructuras morfológicas importantes en la clasificación de especies de *Fusarium*, pueden ubicarse solas, en parejas, en grupo o en cadenas. Se encuentran en micelio aéreo o embebidas en el agar (Leslie y Summerell, 2006).

2.4.4.10. Medidas de control

Fusarium spp. es un hongo difícil de manejar; sin embargo, se puede integrar varios métodos:

Cultural. - Según, Martínez et al. (2015) menciona las medidas de control cultural: a) selección y preparación adecuada de un suelo; b) el uso de semilla certificada; c) empleo de variedades resistente; d) la rotación adecuada de cultivos; e) manejo eficiente del riego y la nutrición vegetal.

Físico. - La solarización es un método de control ya que los patógenos son afectados por altas temperaturas que se crean por el efecto invernadero del polietileno colocado sobre el suelo. Es una técnica empleada para el control de muchos patógenos y plagas del suelo que captura la energía solar de tal modo que provoca cambios físicos, químicos y biológicos en el suelo; para ello se coloca una cubierta de polietileno transparente sobre el suelo húmedo durante los meses más calurosos, con el fin de aumentar la temperatura del suelo a niveles letales para muchos fitopatógenos, semillas y plántulas de malezas (Pumisacho y Sherwood 2002).

La lámina de polietileno de baja permeabilidad a muchos gases, el CO₂ se acumula bajo la cubierta de plástico, hasta alcanzar concentraciones 35 veces mayores a las observaciones en un suelo no cubierto (Rebllon, 2003). La solarización del suelo también mejora la nutrición de las plantas al incrementar la disponibilidad de nitrógeno y otros nutrientes esenciales. Por otro lado, Bernal (1999) considera que la solarización es un método muy efectivo para el control de nematodos en el suelo, siendo necesario tomar en cuenta otro factor de importancia para tener éxito con la aplicación de esta técnica, que es el contenido de humedad del suelo al momento de cubrir con plástico el terreno. El suelo debe conservarse húmedo para incrementar la sensibilidad térmica de los fitopatógenos y facilitar la conducción del calor a través de los poros del suelo

Químico. - Gutiérrez (1991) menciona que en una plantación con síntomas de marchitamiento vascular se deben hacer aplicaciones de formaldehído 50 % para evitar contagio, así como también con tratamientos a base de Dazomet, Methan sodio, Metil isotiocianato, además de la aplicación de fungicidas sistémicos como Benomyl, Thiabendazol, Carbendazim y Metilthiofanato.

Biológico. - Pumisacho y Sherwood (2002) mencionan que el aporte de la microflora saprófita para el control de patógenos del suelo ha sido escasamente comprendido y explotado. Para el manejo de enfermedades presentes en el suelo con la introducción de

algún organismo benéfico, o indirectamente, modificando las condiciones del suelo a favor de los organismos antagónicos naturales. El problema central de los agentes biológicos (no de sus derivados) es que, como todo organismo vivo, necesitan de un ecosistema receptivo para realizar sus funciones; por lo tanto, su uso requiere consideraciones específicas, tanto para el control de la enfermedad como para la sobrevivencia del antagonista (Rebellon, 2003).

Existen controladores biológicos comerciales, entre ellos: *Trichoderma* spp, *Bacillus subtilis* Cohn, y *Burkholderia cepacia* Burkholder. Sin embargo, como control biológico, *Trichoderma* spp. y *Gliocladium* sp. han demostrado ser muy efectivos contra enfermedades causadas por hongos como *F. oxysporum* (Martínez et al., 2015).

CAPITULO III.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LOCALIZACIÓN DEL AREA DE ESTUDIO

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad Estatal Amazónica ubicada en el km 2,5, vía Puyo-Tena, cantón Pastaza, parroquia Puyo, provincia de Pastaza, Ecuador. Las condiciones ambientales en el laboratorio las condiciones fueron controladas con una temperatura estable de $23 \pm 1^\circ\text{C}$ y una humedad relativa de $85 \pm 5\%$.

3.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La investigación es de tipo experimental descriptiva, ya que se determinaron las características culturales, morfológicas y fisiológicas *in vitro* de *Fusarium* spp., agente causante del marchitamiento vascular de la pitahaya (*Hylocereus* spp.).

3.3. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

La metodología utilizada fue experimental y se detalla a continuación.

Análisis de la zona de estudio

Se seleccionaron ocho fincas de productores de pitahaya pertenecientes a la “Asociación de Pitahayeros” la cual está formada por 21 socios, 850 familias y 5 000 beneficiarios del Cantón Palora en la Provincia de Morona Santiago ubicado en la Región Amazónica Ecuatoriana (Figura 1). En las fincas mencionadas se realizó en muestreo dirigido a las plantas con síntomas de marchitez vascular, esta selección se realizó de manera aleatoria de las diferentes parroquias del cantón (Tabla 1).

Tabla 1. Plantaciones de producción de pitahaya muestreadas

Finca	Provincia	Cantón	Sector	Propietario
1	Morona Santiago	Palora	Comanche	Claus Díaz
2	Morona Santiago	Palora	Sangay	Jorge Hidalgo
3	Morona Santiago	Palora	Nuevo Amundalo	María Milán
4	Morona Santiago	Palora	16 de Agosto	Manuel Sarmiento
5	Morona Santiago	Palora	Nuevo Amundalo	Wilson Rivadeneira
6	Morona Santiago	Palora	Arapicos	Ana Rojas
7	Morona Santiago	Palora	Madre Selva	Gabriel Cruz
8	Morona Santiago	Palora	Paquisha	Hugo Quispe

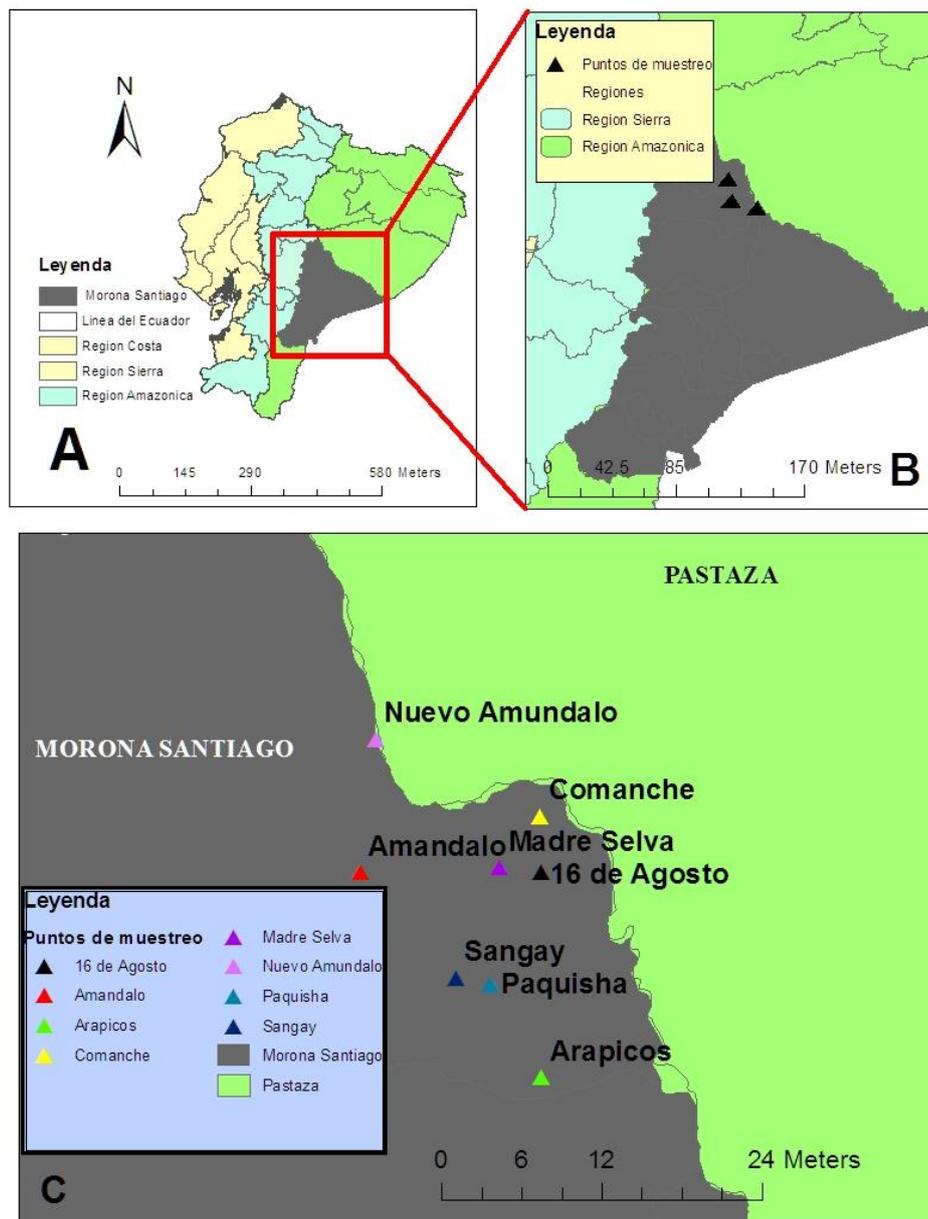


Figura 1. Mapas de: A) Ecuador, B) Provincia de Morona Santiago y C) Ubicación de las fincas muestreadas

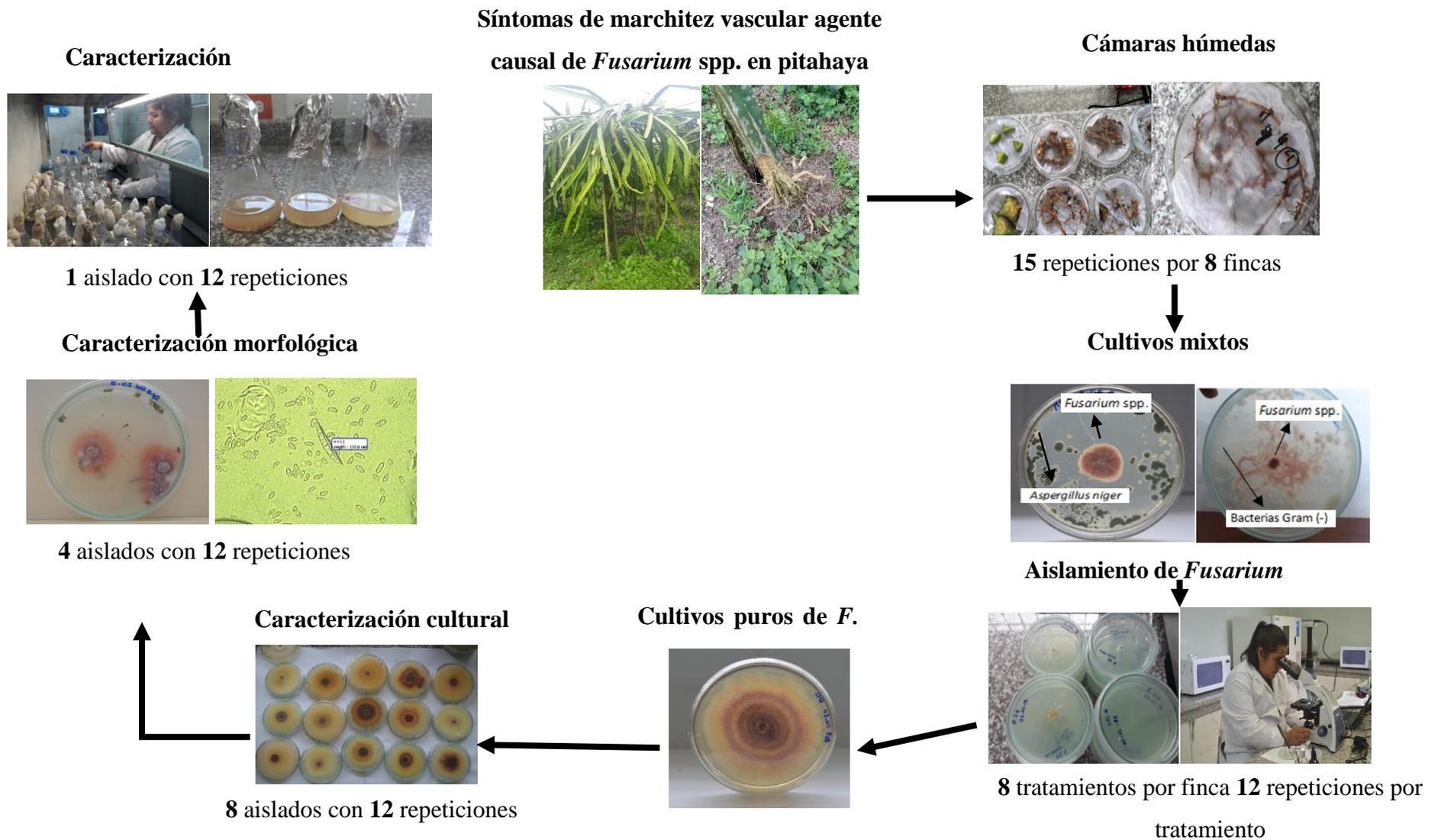


Figura 2. Diagrama de flujo para caracterización de *Fusarium* spp. de pitahaya.

Recolección de muestras con síntomas de marchitez vascular

Las muestras de pitahaya recolectadas fueron las que presentaban síntomas de marchitamiento vascular en pitahaya mediante un muestreo sistemático, de acuerdo con los criterios de Cerkauskas (2005).

Se recolectó una muestra por finca y se colocaron en bolsas de papel que fueron trasladadas al laboratorio, Dichas muestras fueron separadas según sus síntomas y fueron codificadas de acuerdo de la finca de procedencia.

Para dar cumplimiento a los postulados de Koch se propuso la siguiente metodología.

Aislamiento y obtención de cultivos puros de *Fusarium* spp.

Identificación de micobiota asociada a raíz de pitahaya

Se tomaron segmentos de raíz de 0,3 a 0,5 cm con partes de tejido enfermo y sano y se lavaron con agua corriente durante 5 min con el uso de un tamiz metálico. Los fragmentos se desinfectaron en agitación continua con alcohol al 70% durante 3 min y nuevamente se agitaron en un Erlenmeyer con agua estéril durante 2 min.

Los segmentos desinfectados se colocaron en cajas de Petri que contenían papel filtro humedecido con agua estéril. Dichas cajas de Petri conformaban las cámaras húmedas y se incubaron a 26 ± 2 °C durante 48 horas.

Transcurrido este tiempo se aislaron los hongos filamentosos por medio del examen bajo el microscopio óptico y la ayuda de un asa previamente esterilizada. Bajo el microscopio estereoscopio binocular se realizó la siembra directa en placas de Petri, que contenían 16 mL de medio de cultivo CLA. La identificación se realizó teniendo en cuenta los criterios morfológicos (conidias y clamidosporas) acorde a lo referido por Nelson et al. (1983) y Leslie y Summerell (2006). Para la observación de las estructuras morfológicas se usó un microscopio óptico, con un aumento de 100 X.

Se han obtenidos cultivos mixtos de hongos y bacterias que forman la microbiota de raíz de pitahaya.

Aislamiento de *Fusarium* spp.

A partir de cultivos mixtos se aislaron *Fusarium* spp. de cultivos previamente establecidos se tomaron esporas las cuales fueron colocados en placa de Petri que contenían 16 mL del medio de cultivo semisólido PDA y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 15 días, transcurrido este tiempo se seleccionaron las colonias típicas de *Fusarium* spp. mediante el uso de claves taxonómicas propuestas por Leslie y Summerell (2006).

Obtención de cultivos puros de *Fusarium* spp.

Se tomó una muestra de tejido vascular de cada finca siendo los tratamientos con 12 repeticiones a nivel de laboratorio para la caracterización cultural, morfológica y fisiológica; a los 21 días se observaron nuevamente en el microscopio óptico y se identificaron los aislados de *Fusarium* spp. Las colonias fueron purificadas en repiques consecutivos en cajas de Petri con medio semi sólido PDA. Una vez purificados los aislamientos fueron almacenados en incubadora a 25 ± 2 °C en medio de cultivo CLA, durante 15 días.

Conservación de *Fusarium* spp.

Los aislados de *Fusarium* spp fueron sembrados en cajas de Petri que contenían medio de cultivo semi-sólido PDA. Transcurridos 20 días de su crecimiento, se procedió a conservarlos. Se utilizaron 8 tubos Eppendorf de 2 mL por aislado. En autoclave, se esterilizó agua destilada y glicerol al 15%, a una temperatura de 121 °C y 1 atm por 15 min. Dentro de la cámara de flujo laminar se procedió a colocar 6 mL de agua destilada estéril con 6 mL de glicerol en 8 tubos Eppendorf.

Con la ayuda de un sacabocados de 4,30 mm de diámetro se colocó dos discos de micelio en cada Eppendorf y se los selló con parafilm. Se procedió a conservar los aislados a una temperatura de -4 ± 2 °C, posteriormente se pusieron en el ultra congelador temperatura de -80 ± 2 °C hasta su empleo.

3.3.1. Identificación de aislados de *Fusarium* spp.

Cada aislado monospóricos de *Fusarium* spp previamente obtenidos se subcultivó en cajas de Petri (90 mm Ø) contentivas de 16 mL de PDA (Leslie y Summerell, 2006), se inocularon en el centro de caja de Petri con un disco de micelio de 7 mm de cada uno de los aislados. Fueron incubados a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad, durante dos semanas.

La caracterización cultural se realizó por medio de un análisis cualitativo y cuantitativo. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado donde los aislados fueron ocho tratamientos con 12 repeticiones.

La evaluación del color del anverso y reverso de la colonia, bordes y textura, presencia de líquidos de transpiración se realizó por observación visual de las colonias según lo especificado en trabajos realizados por Wiwik et al. (2013) y Chehri et al. (2014). Las mediciones fueron registradas diariamente, hasta que la placa Petri estuvo completamente cubierta.

Se evaluó el crecimiento micelial (\emptyset de la colonia mm) con la ayuda de un calibrador digital mediante el cálculo de la tasa de crecimiento radial TCR (mm.día^{-1}) propuesta por Baldrian y Gabriel (2002) (ecuación 1).

$$TCR = \frac{(Df - Di)}{(Tf - Ti)} \quad (1)$$

DF: Diámetro final (mm); **Di:** Diámetro inicial (mm); **Tf:** Tiempo final (días); **Ti:** Tiempo inicial (días).

Para procesar la información de las variables color del anverso y reverso de la colonia, bordes, textura, presencia de líquido de transpiración, se utilizó la Estadística Descriptiva, y se realizaron gráficos de distribución de frecuencias.

La variable crecimiento micelial de las colonias (mm) se comparó entre los ocho tratamientos mediante ANOVA con la prueba Tukey ($P=0,05$), previa comprobación de los supuestos de normalidad de los datos y homogeneidad de varianzas demostrando independencia en las muestras. Para todos los análisis se utilizó el paquete estadístico *IBM SPSS Statistic* versión 21,0.

3.3.2. Caracterización aislados de *Fusarium* spp. en base a su morfología

Se cultivaron cuatro aislados que mostraron mayor crecimiento micelial en la caracterización cultural en medio de cultivo CLA se aforó a 500 mL de agua destilada, la solución se trasvasó a un Erlenmeyer de 1 000 mL para la esterilización en la autoclave a 121 °C y 1 atm por 15 minutos. Se realizaron 12 repeticiones que fueron colocados en la incubadora a temperatura de 25 °C durante 7 días, según lo sugerido por Leslie y Summerell (2006) y Chehri et al. (2015).

A partir de los 7 días, se iniciaron las evaluaciones con el microscopio óptico invertido, se tomaron imágenes digitales con la cámara acoplada. Se usó un aumento de 100X. Mediante esta técnica se determinaron las dimensiones (μm) de conidióforos, microconidias y macroconidios.

Para la caracterización morfológica de los aislados se observaron a través de la técnica de montaje mediante cinta adhesiva del aislado y se tuvieron en cuenta los criterios descritos por Leslie y Summerell (2006), para la identificación morfológica, Se midió el largo por la zona más gruesa (μm) de 150 estructuras tomadas aleatoriamente, de cada una de los aislados.

Para el conteo de las esporas, se adicionó 1 mL de agua estéril con 0,1 µL de Tween 80, en tubos de ensayo de 10 mL con un disco de micelio de 4,3 mm de cada caja de Petri. Inmediatamente después se colocaron en el agitador vórtex, hasta que la suspensión se dispersó completamente en el medio, luego se tomaron 20 µL con la pipeta y se colocaron en la Cámara de Neubauer, para determinar la concentración final de conidios por mL. La fórmula para el cálculo fue la reportada por Bastidas (2009).

$$C = \frac{\text{número de esporas} * 10\ 000}{\text{números de cuadros} * \text{disolución}} \quad (2)$$

C: concentración; **Número de esporas:** Suma de todas las células contadas en todos los cuadros; **10 000:** Numero constante; **Número de cuadros:** Cuadros de Cámara de Neubauer; **Disolución:** Para una dilución de 1: 10. Dilución = 0,1.

3.3.3. Caracterización para aislados de *Fusarium* spp. en base a su fisiología

Para la caracterización fisiológica, se utilizó el aislado que mostró mayor crecimiento micelial en la caracterización morfológica.

3.3.3.1. Influencia del pH en el crecimiento micelial de *Fusarium* spp.

El ensayo se realizó con el objetivo de determinar la influencia del pH de incubación sobre crecimiento de *Fusarium* spp. Se utilizó el medio de cultivo líquido PDB (Potato Dextrosa Broth), con una dosis de 3,6 g en 150 mL de agua destilada, que se dispensó en un Erlenmeyer de 500 mL y esterilizó en autoclave a 121 °C y 1 atm por 15 min. El medio fue vertido en Erlenmeyer de 100 mL de capacidad, bajo la cámara de flujo laminar. En este medio se sembraron discos de micelio con la ayuda de un sacabocados de 4 mm de diámetro y una aguja de inoculación, el ajuste del pH se realizó antes de esterilizarlo, se modificaron con HCl a 0,001 M, en un rango de pH desde 4 a 7 con una escala de 1 entre pH, con 12 repeticiones por aislado, y se mantuvieron en la incubadora a temperatura de 25 °C durante 21 días. Posteriormente el micelio crecido en medio líquido se filtró en papel filtro estéril y posteriormente se pesó el micelio, colocando en papel filtro para obtener el peso seco del micelio del aislado.

3.4. RECURSOS HUMANOS Y MATERIALES

Recursos humanos

Estudiante de posgrado de la maestría de Agronomía mención Sistemas Agropecuarios y Directora del proyecto de innovación.

Materiales

Tijeras de podar, fundas plásticas, bolsas de papel kraf, cajas Petri de 90 mm Ø, marca Senna modelo 3-61015, Erlenmeyer de 500 y 1 000 mL de marca CITOGLAS, lámpara de alcohol, sacabocados de 7 y 4 mm, embudo de malla artesanal, navaja, cuchillo, aza de inoculación, vasos de precipitación de 25 ml y 250 mL de marca OBEROI, porta objetos de marca ALFALAB, modelo CAT. NO.7105 y dimensiones de 76,2 X 25,4 mm (1"X3"), cubre objetos de marca B&C GERMANY, dimensiones 22 x 22 mm, probetas marca GLASSCO de 500 mL, frascos lavadores de 500 mL, bisturí # 20, calibrador pie de rey marca TRUPER, parafilm marca BEMIS, de dimensiones 4INx125 FT. ROLL, papel filtro marca WHATMAN de 125 mm Ø.

Equipos

Microscopio estereoscopio marca MOTIC, modelo DM143; microscopio óptico marca MOTIC , modelo Q720AD SERIES B1 con cámara digital incorporada con el software MOTIC images plus 2.0 ml, modelo MULTI LANGUAGE; cámara de flujo laminar LABCONCO; incubadora marca MEMMERT, modelo INB 400 , estufa marca MEMMERT; autoclave 121 °C (con una presión de 0.7–1 bar) marca WISE CLAVE; cámara de fotos marca CANNON; balanza analítica marca AE ADAM; plato agitador marca IKA; multiparametro marca SARTORIUS; ultra congelador marca Daihan Scientific; refrigerador de marca INDURAMA; computadora marca HP; cámara neubauer.

Medios de cultivos

Potato Destroxe agar (PDA) TMMEDIA, Potato Dextrose Broth (PDB) DIFCO.

Medio de cultivo Carnation Leaf-Piece Agar (CLA): 10 g de Agar (Difco), pedazos de hoja de clavel estéril, esto sea aforó a 500 mL de agua destilada.

CAPITULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Aislamiento de *Fusarium* spp.

Se obtuvo un total de ocho aislados que corresponden con el género *Fusarium* spp. procedentes de plantaciones de pitahaya del cantón Palora, provincia de Morona Santiago (Tabla 2).

Tabla 2 Procedencia de aislados de *Fusarium* spp.

Finca	Provincia	Cantón	Sector	Aislado
1	Morona Santiago	Palora	Arapicos	UEA-Fsp1
2	Morona Santiago	Palora	Comanche	UEA-Fsp2
3	Morona Santiago	Palora	Madre Selva	UEA-Fsp3
4	Morona Santiago	Palora	Paquisha	UEA-Fsp4
5	Morona Santiago	Palora	Numbayme	UEA-Fsp5
6	Morona Santiago	Palora	16 de agosto	UEA-Fsp6
7	Morona Santiago	Palora	Amundalo	UEA-Fsp7
8	Morona Santiago	Palora	Amundalo	UEA-Fsp8

Los aislados más frecuentes a partir de plantas afectadas fueron los de *Fusarium* spp. Estuvieron presentes en todas las de fincas objeto de estudio, donde se pudo identificar que las colonias de estos aislamientos presentaron coloraciones que variaron desde el rojo, rojo pálido, rojo amarillento hasta el rosa claro. Las mismas presentaron bordes regulares y textura algodonosa, con líquidos de transpiración (Figura 2).

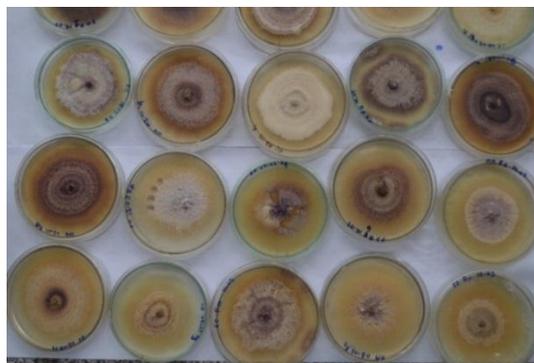


Figura 3. Aislados de *Fusarium* spp. en medio PDA obtenidos a partir de plantaciones de pitahaya

Los conidios fueron fácilmente separables y con paredes gruesas, de forma oval, elíptica, con un largo de 43,52 μm . Los aislados cumplieron los postulados de Koch, lo que evidenció su identidad (Figura 3).



Figura 4. Macroconidios y clamidosporas de *Fusarium* spp. micrografía con aumento de 1000X

Durante el aislamiento de *Fusarium* spp. se identificó el género de hongos anamorfos asociado a raíces enfermas con síntomas de marchitez vascular, correspondiente al género: *Aspergillus niger* (P.E.L.van Tieghem) procedentes del cantón Palora. De este hongo fue posible observar esporas e hifas septadas, no se determinaron las dimensiones de las estructuras (Figura 4a y 4b).

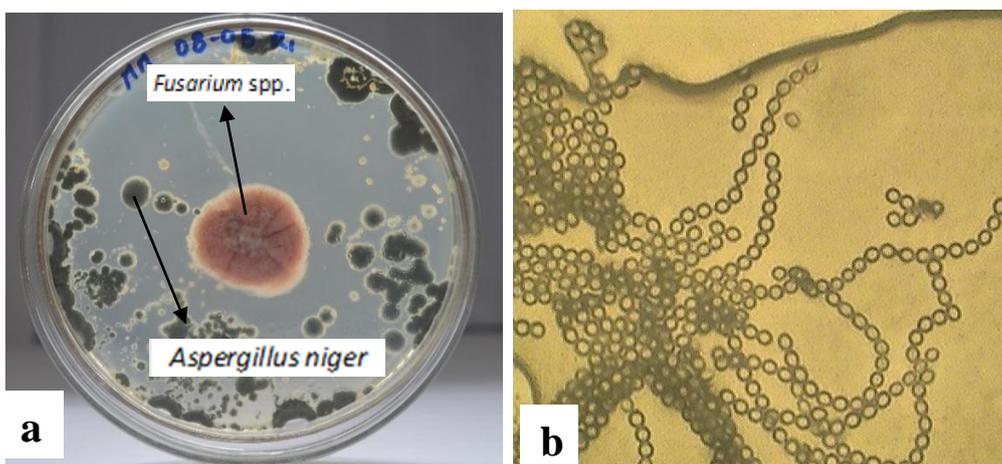


Figura 5 a. Esporas de *A. niger* en medio PDA **b.** microfotografía con aumento de 1 000X

Las características de *Fusarium* spp. y *A. niger*. coincidieron con las descritas por Duarte et al. (2016), quienes identificaron los géneros *Fusarium* y *Aspergillus* en la microbiota en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba.

En la microbiota asociada se pudo observar también la presencia de bacterias Gram (-), pues se identificaron colonias similares a puntos blancos incluidos en el medio de cultivo PDA, en las placas de Petri corroborando por lo descrito por Ríos et al. (1997) en el cultivo de *H. undatus* (Figura 5a y 5b).

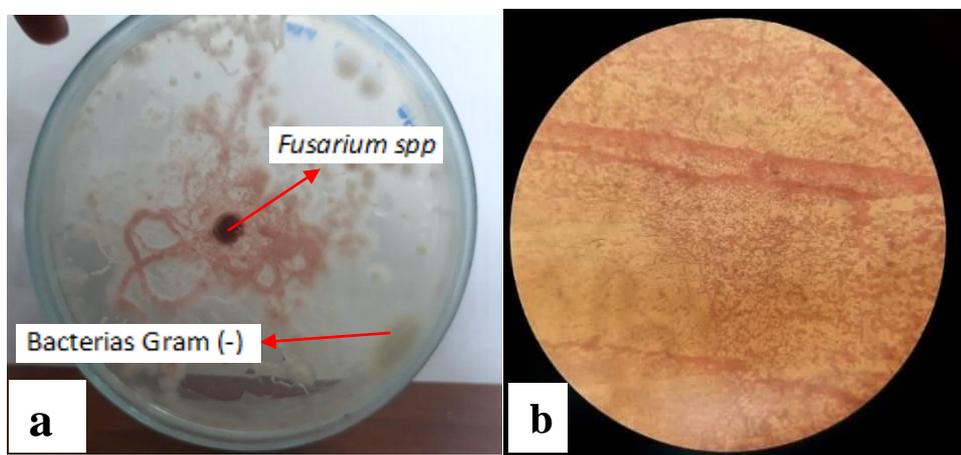


Figura 6. a) Bacterias en medio PDA. b) Bacterias Gram (-) coloreadas con tinción de Gram.

4.1. Identificación de aislados de *Fusarium* spp. en pitahaya en base a sus características culturales

Todas las colonias de los aislados fueron capaces de crecer de forma radial y sus características culturales fueron similares en medio PDA a 25 ± 2 °C. La velocidad de crecimiento radial fue de $2,8 \text{ mm.día}^{-1}$ presentando los aislados UEA-Fsp4 de Paquisha y UEA-Fsp6 de 16 de Agosto la mayor velocidad de crecimiento micelial a los 18 días de incubación difiriendo significativamente con los demás aislados.

A su vez los aislados UEA-Fsp1 Arapicos, UEA-Fsp2 Comanche y UEA-Fsp3 Madre Selva demostraron tener un crecimiento radial similar entre si finalizando su crecimiento a los 21 días en las mismas condiciones. Mientras que los aislados UEA-Fsp5 Numbayme, UEA-Fsp7 y UEA-Fsp8 Amundalo no pudieron colonizar en su totalidad la caja de Petri a los 21 días de incubación (Figura 6).

Estos resultados están cercanos a los informados por Wiwik et al. (2013), quienes determinaron que la velocidad de crecimiento radial fue de $3,74 - 4,45 \text{ mm}$ cada 3 días al estudiar el patógeno *Fusarium. solani* Mart., una enfermedad responsable de la podredumbre en *Hylocereus* spp. en Bali.

Difiriendo con lo reportado por Rodríguez (2013) quien obtuvo valores de 90 mm en 10 días de *Fusarium* spp proveniente de *Physalis peruviana* L. en medio PDA a 25 °C.

La velocidad de crecimiento de los aislados de *Fusarium* procedentes de pitahaya pudiera estar directamente relacionada con la colonización del suelo, aspecto que se debe esclarecer en investigaciones futuras.

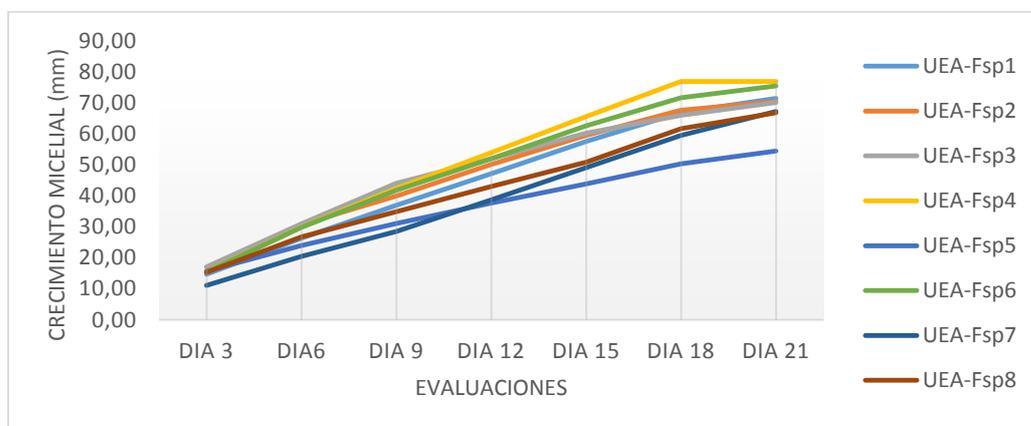


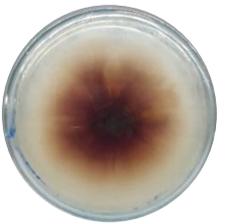
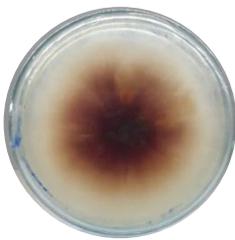
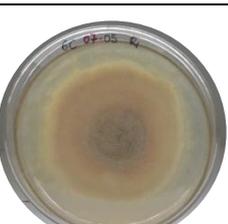
Figura 7. Crecimiento micelial de los diferentes aislados de *Fusarium* spp. en medio de cultivo PDA a 25 ± 2 °C.

Las tonalidades de colores observados en el anverso y reverso de los aislados tuvieron una considerable variabilidad que fue de rojo, rojo pálido, rojo amarillento hasta el rosa claro. Los pigmentos generales no son indicadores para determinar una especie, las colonias de este hongo fitopatógeno tienen una considerable variabilidad en cuanto a tonos de coloración de micelio que varía del rojo, marrón, violeta, naranja, amarillo hasta el blanco según lo manifestado por Nelson et al. (1983) y Leslie y Summerell (2006).

Concordando con los resultados de Madhukeshwara (2001) quien obtuvo coloraciones de rojo oscuro hasta amarillo pálido de *F. oxysporium* de *Cajanus cajan* L. (Huth). y Chandran et al. (2012) quienes obtuvieron coloraciones rosas pálido y rojo oscuro de *F. solani* en cítricos.

Los aislados UEA-Fsp2, UEA-Fsp4, UEA-Fsp6 y UEA-Fsp8 presentaron una tonalidad de color rojo pálido durante todo su crecimiento, mientras que los aislados UEA-Fsp1 y UEA-Fsp5 presentaron color rojo. A su vez el aislado UEA-Fsp7 presentó una coloración amarillo rojizo. El aislado UEA-Fsp3 inicialmente tuvo una coloración blanca y terminó su desarrollo con coloración rosa claro diferenciándose de los demás aislados, lo cual coincide con lo informado por Duarte et al. (2016) para *Fusarium* spp. en *Cicer arietinum* L. (Tabla 3).

Tabla 3. Color del anverso y reverso del micelio de las colonias de los aislados de *Fusarium* spp. de pitahaya en medio PDA a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ incubados durante 18 días

Código de la finca	Anverso	Reverso	Código de la finca	Anverso	Reverso
UEA-Fsp1			UEA-Fsp2		
UEA-Fsp3			UEA-Fsp4		
UEA-Fsp5			UEA-Fsp6		
UEA-Fsp7			UEA-Fsp8		

Todos los aislados de *Fusarium* spp. en pitahaya al finalizar su crecimiento presentaron bordes regulares, textura algodonosa y líquidos de transpiración los cuales fueron incoloros. Debido a la homogeneidad no se encontraron diferencias entre aislados. Característica descrita por Ochoa et al. (2000) quien al determinar el color de *F. oxysporum* en *Carica x heilbornii* var. *Pentagona*. Badillo, y Duarte et al. (2016) en *Fusarium* spp. de *Cicer arietinum* L. coinciden con los resultados de esta investigación al describir

coloraciones que variaron desde violáceo a ligeramente amarillenta, de blanquecino a rojo ladrillo.

Mientras que Lezcano et al. (2012) manifiesta que *Fusarium* spp posee un micelio aéreo y afelpado en *Leucaena leucocephala* Lam. de igual manera lo describe Shanhnazi et al. (2012) en *Piper nigrum* L.

4.2. Caracterización aislados de *Fusarium* spp. en pitahaya en base a su morfología

Los aislados UEA-Fsp2, UEA-Fsp4 y UEA-Fsp6 fueron los que presentaron mayor crecimiento micelial en la caracterización cultural de *Fusarium* spp. y fueron los que se emplearon para realizar la caracterización morfológica.

Los aislados presentaron microconidias, macroconidias y clamidosporas que corresponden con las características descritas por Nelson et al. (1983) y Leslie y Summerell (2006) para *Fusarium* spp.

Las características morfológicas de los aislados de *Fusarium* spp. en medio CLA fueron similares. En este medio se desarrollan tanto micelio como conidios para todos los aislados; similar a lo reportado por otros autores quienes en sus trabajos han usado este medio de cultivo (Schroers et al., 2009; Chehri et al., 2015).

Las microconidias tuvieron una forma ovalada, elíptica usualmente sin septos, sus células conidiogencias fueron monofiliales cortas, presentaron abundante micelio aéreo (Figura 7).

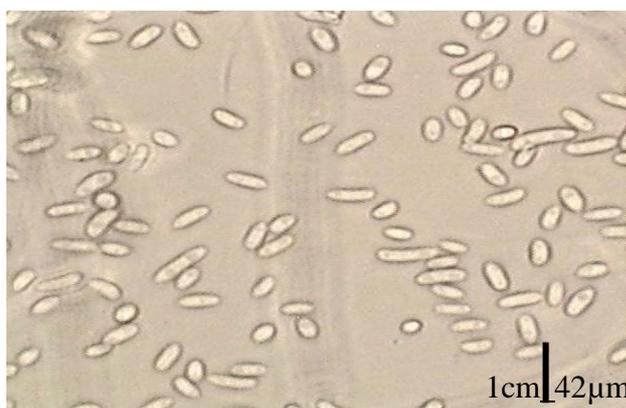


Figura 8. Microconidias de *Fusarium* spp. de forma ovalada y elíptica perteneciente al aislado UEA-Fsp4 en medio CLA a los 8 días de incubación microfotografía con aumento de 1000 X

Los macroconidios presentaron una morfología corta a media longitud, sus paredes fueron ligeramente curvadas, relativamente delgadas, sus formas apicales fueron curvas y a veces presentaron un ligero gancho, la morfología de células basales fueron de pie en forma

puntiaguda, generalmente presentaron tres a cuatro septos, se encontraron en hifas en crecimiento en la superficie del agar (Figura 8).

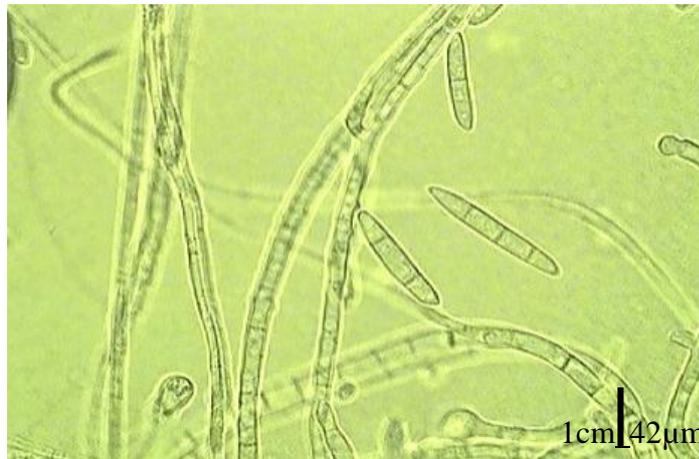


Figura 9. Macroconidios de *Fusarium* spp. del aislado UEA-Fsp4 en medio CLA a los 14 días de incubación, microfotografía con aumentos de 1 000X

Las clamidosporas son de paredes lisas, generalmente se encontraron en pares y en cadenas cortas, se encuentra intercaladas en hifas sumergidas y aéreas (Figuras 9 a y b).

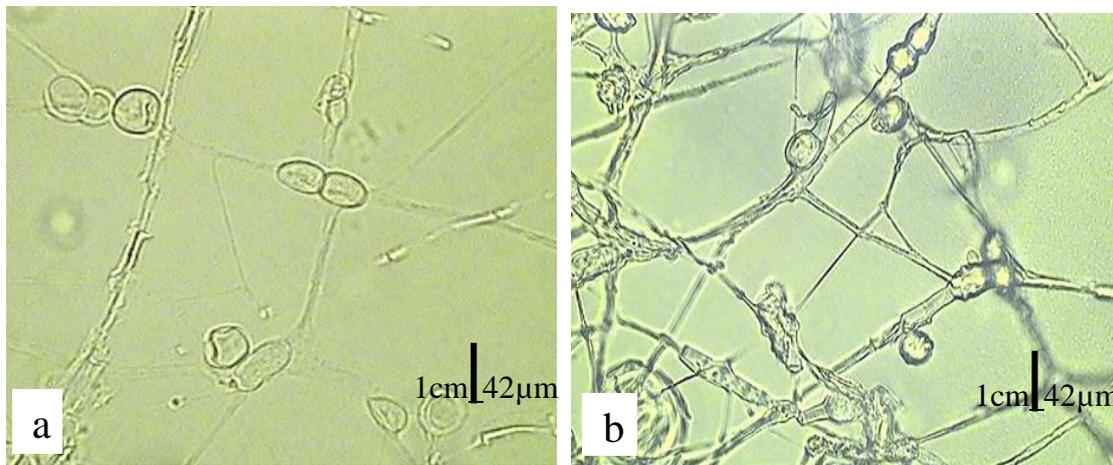


Figura 10 a. Clamidosporas de *Fusarium* spp del aislado UEA-Fsp4 y **b.** UEA-Fsp6 en medio CLA a los 18 días de incubación microfotografía con aumento de 1000 X

La mayoría de aislados produjeron microconidias de forma ovalada, elíptica (38 - 43 μm de largo), obtenidas en medio de cultivo CLA. Este resultado es confirmado por Schoers et al. (2009), Duarte et al. (2016) quienes describieron formas de microconidias de ovaladas y elípticas de *Fusarium* spp en medio de cultivo CLA.

Concordando con los resultados informados por Chenri et al. (2014) quienes presentan resultados similares al desarrollo de *Fusarium* spp en Malaysa con microconidias (20 μm) y macroconidias con tres septos (50 μm) y Dubey et al. (2010) describieron dimensiones cercanas en la descripción taxonómica de *F. oxysporum* f. sp. ciceris en medio de cultivo CLA en India con microconidias (30 μm) y macroconidias con tres septos de igual manera con la forma y dimensiones de microconidias y macroconidias de esta investigación.

En la Figura 10 se muestran las dimensiones correspondientes al largo promedio de las microconidias de los aislados obtenidos de *Fusarium* spp., donde se aprecia que el aislado que presentó la mayor longitud promedio de microconidias fue de UEA-Fsp6 con un valor de 43,52 μm seguido por UEA-Fsp2 con 43,31 μm estadísticamente similares, difiriendo significativamente del aislado UEA-Fsp4 que presentó el menor valor de 30,09 μm .

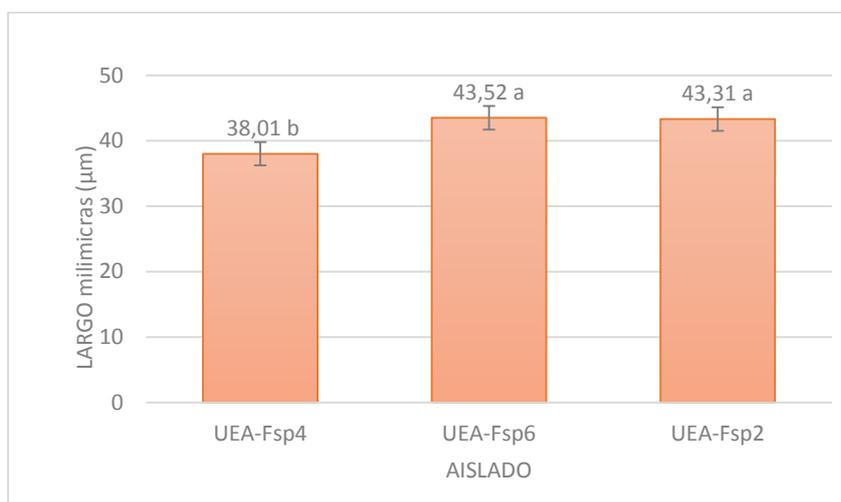


Figura 11. Largo promedio de microconidias producidos por aislados de *Fusarium* spp a los 7 días de incubación en medio CLA

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren según la Prueba de Tukey para $<0,05$.

Las dimensiones gráficas se muestran el largo promedio de las macroconidias de los aislados obtenidos de *Fusarium* spp, donde se aprecia que el aislado que presentó el mayor valor promedio para el largo de macroconidias promedio fue UEA-Fsp4 con un valor de 152,02 μm difiriendo significativamente de los aislados UEA-Fsp2 con un valor de 144,46 μm y UEA-Fsp6 con un valor de 145,79 (Figura 11).

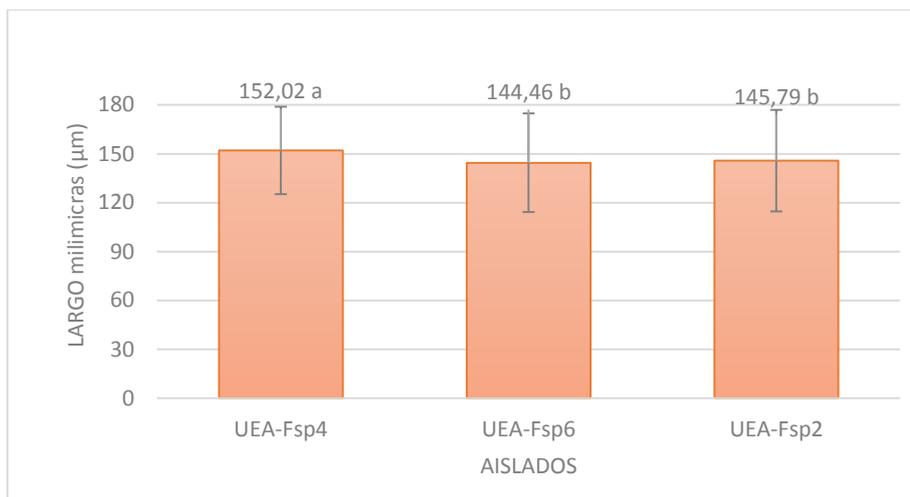


Figura 12. Largo promedio de macroconidias producidos por aislados de *Fusarium* spp. a los 14 días de incubación en medio CLA

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren según la Prueba de Tukey para <math><0,05</math>.

Las dimensiones gráficas muestran el largo promedio de las clamidosporas de los aislados de *Fusarium* spp. las que fueron estadísticamente diferentes, siendo el aislado UEA-Fsp2 con un valor de 71,71 µm el que presentó el mayor valor para el largo promedio de clamidosporas seguido por el aislado UEA-Fsp4 con un valor de 66,54 µm y del aislado UEA-Fsp6 con un valor de 59,18 µm (Figura 12).

Según Lezcano et al. (2012), en una caracterización de *Fusarium* de semillas de *Leucaena leucocephala*, en Perú, describieron macroconidias semi curvas con tres a cinco septos de 26,10 – 36,74 µm y microconidias ovaladas a elípticas con dimensiones de 3,58 – 4,06 µm lo que difiere con las dimensiones de las microconidias encontradas en esta investigación.

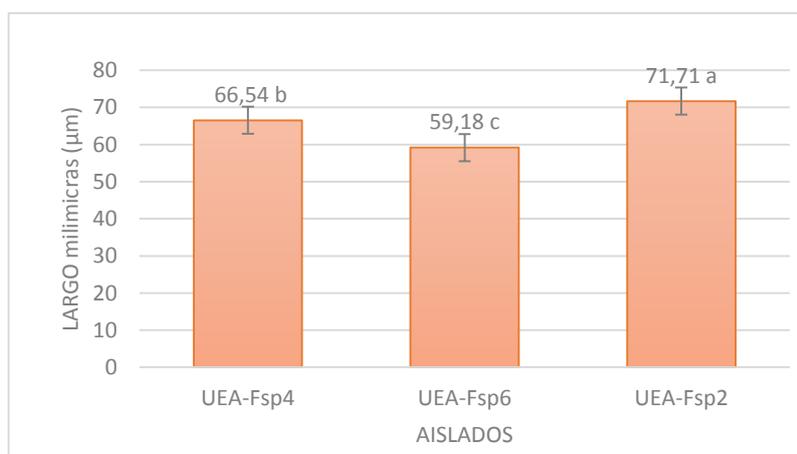


Figura 13. Largo promedio de clamidosporas producidos por aislados de *Fusarium* spp a los 14 días de incubación en medio CLA.

Medias con letras no comunes en una misma columna difieren según la Prueba de Tukey para <math><0,05</math>.

Duarte et al. (2016), obtuvieron valores medios para las macroconidias de *F. oxysporum* muy próximos a los del presente trabajo, en un aislado procedente del sector Paquisha. Las características de las microconidias y clamidosporas de los aislados corresponden con los descritos por Leslie y Sumer (2006) para la especie de *F. oxysporum* quienes describieron las microconidias de morfologías apicales curvas con tres septos y clamidosporas de paredes lisas.

Contrario a estos resultados Kawuri et al. (2012) verificaron que las microconidias presentaron 4,6 μm , macroconidias con 31 μm y clamidosporas de 5 - 15 μm en la caracterización morfológica de *F. oxysporum* en *Aloe barbadensis* en Indonesia. Al igual Wiwik et al. (2013) informa que *F. solani* en *Hylocereus* spp. presento macroconidias de 18,4 - 31,7 μm , curvadas con 3 septos y microconidias de 5,7 y 5,8 μm ovaladas ensayos realizados en medio de cultivo PDA.

Para la concentración de conidios existen diferencias significativas entre aislados teniendo que el aislado UEA-Fsp4 presentó mayor cantidad de conidios, seguido por los aislados UEA-Fsp2 y UEA-Fsp6.

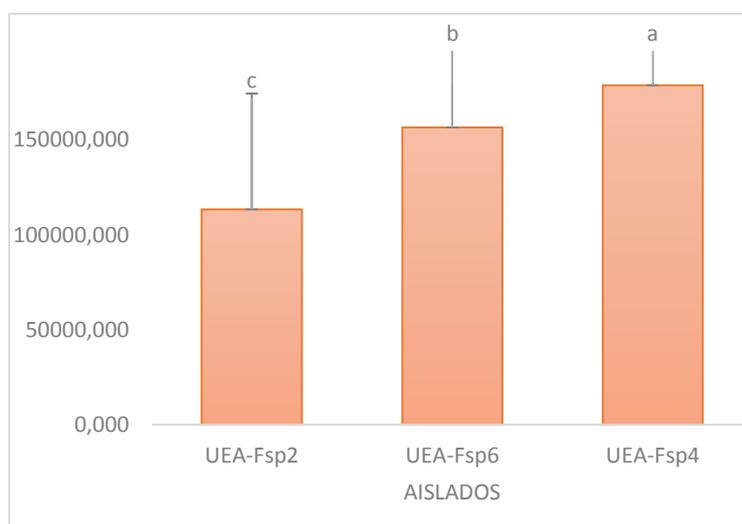


Figura 14. Concentración promedio de conidios de los aislados de *Fusarium* spp. en medio CLA a los 18 días de incubación
Medias con letras no comunes en una misma columna difieren según la Prueba de Tukey para $<0,05$.

Este planteamiento es confirmado por Leslie y Summerell (2006), quienes describen dimensiones cercanas en la descripción taxonómica de *F. oxysporium*.

4.3. Caracterización para aislados de *Fusarium* spp. en base a su fisiología

El aislado UEA-Fsp4 correspondiente a la finca del sector Paquisha fue el que presentó mayor crecimiento micelial en la caracterización cultural de *Fusarium* spp. y fue el seleccionado para realizar los ensayos de esta caracterización.

Influencia de pH en el crecimiento micelial

Se observó el crecimiento micelial del aislado UEA-Fsp4 en todos los valores de pH evaluados (desde 4,0 – 7,0), siendo el pH 7 que produjo mayor peso del micelio obtenido valores de 0,34 g, seguido del pH 6 con un valor de 0,30 g y el pH 4 y 5 con valores similares entre sí de 0,2 g. (Figura 14).

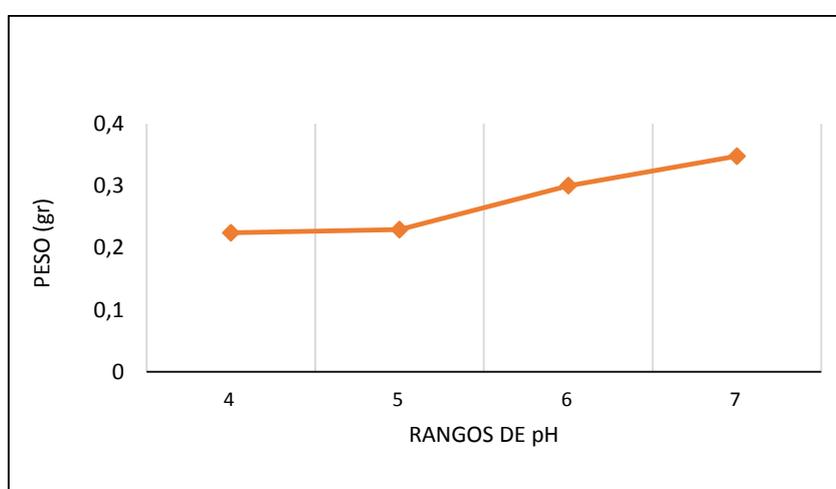


Figura 15. Dinámica de peso de micelio en diferentes pH de *Fusarium* spp. de pitahaya en medio de cultivo PDB a los 21 días de incubación a 25 ± 2 °C

Orozco et al. (1993) mencionaron que en condiciones controladas a *F. oxysporum* como agente causal del marchitamiento vascular del clave *Dianthus caryophyllus* L. creció fácilmente en un intervalo de pH entre 4,0 a 7,0. El desarrollo micelial necesita de pH entre 5,0 y 7,0 mientras que para la formación de conidios requiere pH 6,5 concordando por los resultados de la presente investigación.

CONCLUSIONES

1. Las características culturales, morfológicas y fisiológicas de los ocho aislados obtenidos con síntomas de Marchitez vascular de *Hylocereus* spp. se correspondieron al género *Fusarium* spp.
2. Los caracteres culturales de los aislados UEA-Fsp2, UEA-Fsp4 y UEA-Fsp6 demostraron óptimo crecimiento en medio de cultivo semisólido PDA a los 18 días de incubación, con una velocidad de crecimiento de $2,88 \text{ mm.día}^{-1}$. Las tonalidades del color de los aislados variaron según los días de crecimiento, observándose tonalidades de rojo a rosa claro, presentaron borde regular y textura algodonosa.
3. En los caracteres morfológicos se observó microconidios ovales, elípticos, sin septos; macroconidias con tres a cuatro septos y clamidosporas de paredes lisas intercaladas en hifas, con dimensiones promedio de 43,52, 152,02 y 71,71 μm respectivamente.
4. El óptimo pH para el desarrollo micelial fue de 7 en cuanto a sus caracteres fisiológicos.

RECOMENDACIONES

1. La velocidad de crecimiento de los aislados de *Fusarium* procedentes de pitahaya pudiera estar directamente relacionada con la colonización del suelo, aspecto que se debe esclarecer en investigaciones futuras.
2. Realizar pruebas de caracterización patogénica y molecular que permita identificar la especie de la variación genética y la agresividad entre los aislamientos de *Fusarium* spp del cultivo de pitahaya obtenidos de la sintomatología de marchitez vascular.
3. Continuar con las investigaciones para lograr obtener una colección de aislados monospóricos de *Fusarium* spp. en cultivo de pitahaya procedentes de la Amazonia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. (2005). Plant Pathology. 5th Edition. Published Elsevier. United States of America. 948.
2. Alarcón, J. y Chavarriaga, W. (2007). Diagnóstico precoz de la antracnosis (*colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz & Sacc. en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones. agron. 15(1): 89 - 102.
3. Anderson, E. (2001). The cactus family, Portland. Oregon. US. Timber Press. 20 (24).
4. Baldrian, P. y Gabriel, J. (2002). Intraspecific variability in growth response to cadmium of the wood-rotting fungus *Piptoporus betulinus*. *Mycologia*. 94 (3): 428-3.
5. Bastidas, O. (2009). Technical Note-Neubaver Chamber Cell Counting. 6 p
6. Bravo, H. y Arias, S. (2011). Cactaceae. En: Flora Mesoamericana. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 2 (1).
7. Bernal, J. (1999). Efecto de algunos tratamientos de desinfestación del suelo, de aplicaciones de materia orgánica y de hongos antagonistas sobre la marchitez vascular del clavel *Dianthus caryophyllus* causada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. 26 de septiembre de 2007.
8. Castaño, S. Rincón, A. Varon, F. (1989). Observación preliminares sobre el manejo de nematodos en pitahaya *Acatocereus pitahaya*, ASCOLFI Informa, 15 5. 48 - 49.
9. Cerkauskas, R. (2005). *Fusarium* wilt. (En línea). Disponible en <http://www.avrdc.org/pdf/tomato/fusarium.pdf>.
10. Chandran, Ravi. y Kumar, Reddi. (2012). Studies on cultural, morphological variability in isolates of *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., incitant of dry root-rot of Citrus. *Current Biotica*, 6 (2), 152 – 162.
11. Crane, J y Balerdi, B. (2005). The pitahaya (*Hylocereus undatus* and other spp.) in Florida. University of Florida. Florida. 2 (9).
12. Crous, P. Gams, W. Stalpers, V. Robert , V. y Stegehuis, G. (2004). Mycobank Fungal database nomenclature and species Banks online taxonomic novelties submission.
13. Chehri, Khosrow. Salleh, Baharuddin. y Zakaria, Latiffah. (2014). Morphological and Phylogenetic Analysis of *Fusarium solani* Specie Complex in Malaysia, *Microbial Ecology*, 69(3), 457-471.

14. De Granada, E. G. De Amezquita, M. Mendoza, G. y Zapata, H. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Acta biológica colombiana, 6(1), 7–25.
15. Dean, R. Van-Kan, J. Pretorius, Z. Hammond- Kosack, K. Di Prieto, A. Spanu, P. Rudd, J. Dickman, M. Kahman, R. Ellis, J. y Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 13 (4), 414 – 430.
16. Delgado, A. Kondo, T. Imbachi, K. Quintero, E. Manrique, M. y Medina, J. (2010). Biología y algunos datos morfológicos de la mosca del botón floral de la pitaya amarilla, *Dasiops saltans* (Townsend) (díptera: Lonchaeidae) en el Valle del Cauca. Boletín del Museo Entomológico de la Universidad del Valle 11(2). 1-10.
17. Dubey, S. C. Shingh, Sheo. Raj. y Shingh, Birendra. (2010). Morphological and pathogenic variability of India isolates of *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris causing chickpea wilt. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 43(2), 174-190.
18. Duarte, Yanisia. Echevarria, Anayza. y Martínez, Benedicto. (2016). Identificación y caracterización de aislamiento de *Fusarium* spp. presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. Revista Protección Vegetal, 31(3), 173-183.
19. García, Agilar; María de los Ángeles, M. de los, Terrazas, T. y Arias, S. (2009). Anatomía caulinar de tres especies del género *Hylocereus* (Berger) Britton & amp; Rose (cactaceae) en México. Revista Fitotecnia Mexicana, 32 (3), 201-208.
20. Gerlach, W. y Nirenberg, H. (1982). The Genus *Fusarium*-a Pictorial Atlas. Biologische Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft. Institut für Mikrobiologie, Berlin-Dahlem. Berlin. 345-349 p.
21. González, I., Yailén, A., y Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*–tomate. Revista de Protección Vegetal, 27(1). 1–7.
22. Gutiérrez, J. (1991). Como cultivar clavel *Dianthus caryophyllus* es para exportación. Manual práctico del cultivador. Escuela Superior Politécnica del Chimborazo, Riobamba Ecuador, 169.
23. Guzmán, O., Perez, L., Patiño, A. (2012). Reconocimiento de nematodos fitoparasitarios en pitahaya amarilla (*Selenicereus megalantus* HAW.). bol. Cient. Mus. Hist. Nat, 16 (2), 149-161.
24. He, P. Ho, H. Wu, H. M. y He, Y. (2012). *Bipolaris cactivora* causing fruit rot of dragon fruit imported from Vietnam. Plant pathology y Quarantine, 2, 31-35.

25. Hyo Won Choi, H., Min Chung, I., Yu Surk Kim, Jung-Bo Sim, Jin Won Kim, Ki Deok Kim y Se Chul Chun. (2007). The effect of spent mushroom saw dust compost mixes, calcium cyanamide and solarization on basal stem rot of the cactus *Hyalocereus trigonus* caused by *Fusarium oxysporum*. *Crop Protection* 26. 162-168 pp.
26. Hunt, D. R. (2006). *The New Cactus Lexicon*. International Cactaceae Systematics Group Milborne Port. Reino Unido.
27. Kawuri, R. D.N. Suprpta, Nitta, y T. Homma. (2012). Destructive Leaf Rot Disease Caused by *Fusarium oxysporum* on *Aloe barbadensis* Miller in Bali. *Agricultural Science Research Journal*, (2): 295–301.
28. Leslie, J y Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Editorial. United State of America. 387 p.
29. Lezcano, J., Martínez, B. y Alonso, O. (2012). Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. *Pastos y Forrajes*. 35 (2), 187-196.
30. Luc, M., Sikora, R., Bridge, J. (2005). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agricultura. *Londres*, 2, 871.
31. Madhukeshwara, S y Seshadri, V.S. (2001). Variation and management of *Fusarium* wilt of Pigeon Pea (*Cajanus cajan* (L.). *Tropical Agricultural Research*, 13, 380 – 394.
32. Martinez, Kenneth., Ceceña, Carlos., Gonzales, Daniel. y Juárez, Grimaldo. (2015). Control de la Marchitez *Fusarium oxysporum* f.sp. *medicaginis* en Alfalfa, *Medicago sativa* L. en el Valle de Mexicali, Baja California. Universidad Autonoma de baja California. California.
33. Melo, M. P. de. (2015). Especies biológicas e filogenéticas do complexo *Fusarium fujikuroi*. Tesis de Doctorado. Universidad Federal de Lavras. Brasil.
34. Medina, Salazar. Jorge. Alberto. (2015). Documentación de las relaciones hídricas y requerimientos nutricionales de la pitaya amarilla, *Selenicereus megalanthus* (K. Schum. ex Vaupel) Moran, en tres localidades del Valle del Cauca. Material no publicado.
35. Montesinos, Cruz, Josefina. A., Rodriguez, Llaramendi, Luis., Ortiz, Pérez, Rodobaldo., Fonseca, Flores, María., Ruiz, Herrera, Giovanni. y Guevara,

- Hernández, Francisco. (2015). Pitahaya (*Hylocereus* spp) un recurso filogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. *Cultivos Tropicales*, 36 (1), 67-76.
36. Murcia, N., Rojas, A., Orozco, M., Labrador, N y Medina, J. (2013). Enfermedades limitantes en el cultivo de pitaya amarilla. *Tecnología para el manejo de pitaya amarilla *Selenicereus megalantus* Moran en Colombia Palmira. Valle del Cauca. CORPOICA*,5, 78 – 85.
37. Nelson, P. E., Tousson, T.A y Marasas, W.F.O (1983). *Fusarium* species: An Illustrated Manual for Identification. University Park: Pennsylvania State University Press. 193p.
38. Nyffeler, R., Eggli, U. (2010). A farewell to dated ideas and concepts, molecular phylogenetics and revised suprageneric classification of the family cactaceae. *Schumannia*. 6. 109.
39. Ochoa J., Fonseca G. y Ellis, M. (2000). First report of *Fusarium* wilts of babaco of Babaco (*Carica x heilbornii* var. pentagona) in Ecuador. *Plant Disease*. 84: 199
40. Orozco de Amezquita, Martha., Garcés de Granada, Emira. y Arbelaz, German. (1993). Efecto de diferentes niveles de nitrógeno, potasio y pH en el desarrollo de *Fusarium oxysporium* f.sp. dianthi, agente causal del marchitamiento vascular del clave. *Agronomía colombiana*, 10(1), 90-102.
41. Peñuela A. (2004). Pitahaya amarilla (*Selenicereus megalanthus* Haw). Caracterización de los productos hortofrutícolas colombianos y establecimiento de las normas técnicas de calidad. Cenicafé, Federación Nacional de Cafeteros de *Coletombia*, SENA. 110 -115 pp.
42. Pit, J.I., y A.D. Hocking. (1997). *Fungi and Food Spoilage*. 2nd Edition. Blackie Academic and Professional Press.137-139.
43. Pozo, E. (2011). *Vamos a cultivar pitahaya*. Ecuador. ACRES. Conceptos, Recursos y Estrategias Agropecuarias. Quito. 7-20.
44. Pumisacho, M. Sherwood, S. (2002). *El cultivo de la papa en el Ecuador*. Quito-Ecuador, 85-97
45. Revelo, Jorge. (1991). *El hongo *Fusarium oxysporium**. Manual Técnico. INIAP. Quito-Ecuador.
46. Rebellon, D. (2003). *Manejo Integrado de *Fusarium**. 25 de septiembre de 2007.
47. Rodríguez, E. (2013). *Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de zonas productoras de uchuva (*Physalis peruviana*)*. (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Agronomía, Colombia.

48. Rios, 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 variedades del cultivo. Tesis de Ing.Agr. Managua, NI. Universidad Nacional Agraria.
49. Rodríguez, Canto. (1997). Guía Técnica para la producción de plantas de pitahaya en viveros. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo. México. 70.
50. Rojas, A. Rebolledo, A. Kondo, T. Toro, J. y Orozco, M. (2008). Cultivo, enfermedades y Plagas de la pitaya. Rumbo a la excelencia en frutales tropicales. Bogotá, CO. CORPOICA.
51. Santema, B. A. (2015). Control Biologico de *Fusarium* spp. en berenjena utilizando *Trichoderma harzianum* y *Bacillus sibtillis*. Universidad Rafael Landivar, Coatepeque. Guatemala.
52. Stella, R. Román, S. Caetano, C. Ramírez, H. y Gonzalo, Morales, J. (2012). Caracterización morfoanatómica y fisiológica de semilla sexual de pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt & Rose morphoanatomic and physiologic characterization of sexual seed from yellow pitahaya. Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, 1, 97-111.
53. Schoers, Hans-Josef. O`Donnel, Kerry. Lamprecht, Sandra., Kammeyer, Patricia. Sutton, Deanna. Rinaldi, Michael. Geiser, David. Summerbell, Richard. (2009). Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* specie group. Mycologia, 101 (1), 44-70.
54. Shahnazi, S., Meon, S., Vadamalai, G., Ahmad, K. y Nejat, N. (2012). Morphological and molecular characterization of *Fusarium* spp. associated with yellowing disease of black pepper (*Piper nigrum* L.) in Malaysia. *Journal of General Plant Pathology*. 78 (3),160-169.
55. Suárez, R. (2011). Evaluación de métodos de propagación en pitahaya amarilla *Selenicereus megalanthus* (Haw.) Britt& Rose y pitahaya roja *Hylocereus polyrhizus* (Haw.) Britt& Rose. Tesis de Magíster en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, CO, 45; 196 - 197
56. Tel, Z., N.; Abbo, S.; Bar, Z. D. y Mizrahi, Y. (2013). Clone identification and genetic relationship among vine cacti from the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* based on RAPD analysis. *Scientia Horticulturae*, 100 (1). 19.

57. Teixeira, L. M., Coelho, L., Tebaldi, N. D., Teixeira, L. M., Coelho, L., & Tebaldi, N. D. (2017). Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates and resistance of passion fruit genotypes to fusariosis. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39(3).
58. Turlier MF, Epavier A, Alabouvette C. (1994). Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f. sp. *lini* and the roots of *Linus usitatissimum* as revealed by transgenic *GUS*-marked hyphae. *Can J Bot*; 72, 1605-1612.
59. Valencia, Botín. Alberto., Hernandez, Cruz, Pablo. y Rodriguez, Canto, Adolfo. (2003). Avances en la etiología y manejo de la pudrición Blanda de tallos de pitahaya, *Hylocereus undatus* h. (cactaceae). *Fitosanidad*. 7 (2), 11-17.
60. Villa, A., Pérez, R., Morales, H., Basurto, M., Soto, J. y Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad anti fúngica de extractos vegetales. Universidad Nacional de Colombia, *Acta Agronómica*.
61. Wiwik, S., N. Dewa, S. Made. y I. Made. (2013). First report on *Fusarium solani*, a pathogenic fungus causing stem rot disease on dragon fruits (*Hylocereus* sp.) in Bali. *J. Biol. Agric. Healthcare* 3, 93-99.
62. Wright, E., Rivera, M. y Ghirlanda, A. (2007). Basal Rot of *Hylocereus undatus* Caused by *Fusarium oxysporum* in Buenos Aires, Argentina. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Avenida San Martín 4453 (1417), Buenos Aires, Argentina; and G. A. Lori, CIDEFICIC, Facultad Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. *Diseases notes*, March 2007, Vol. 91 (3):323.