



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

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.)  
Griffon & Maubl. EN PITAHAYA Y SENSIBILIDAD A  
FUNGICIDAS DE DIFERENTES MODOS DE ACCIÓN**

**Trabajo de Integración Curricular**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTOR:**

**NICOLE CAROLINA TORRES REVELO**

Riobamba – Ecuador

2023



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

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.)  
Griffon & Maubl. EN PITAHAYA Y SENSIBILIDAD A  
FUNGICIDAS DE DIFERENTES MODOS DE ACCIÓN**

**Trabajo de Integración Curricular**

**Tipo:** Proyecto de Investigación

Presentado para optar al grado académico de:

**INGENIERA AGRÓNOMA**

**AUTOR:** NICOLE CAROLINA TORRES REVELO

**DIRECTOR:** ING. PABLO ISRAEL ÁLVAREZ ROMERO PhD.

Riobamba – Ecuador

2023

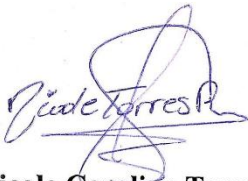
© 2023, Nicole Carolina Torres Revelo

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

Yo, Nicole Carolina Torres Revelo, declaro que el presente Trabajo de Integración Curricular es de mi autoría y los resultados del mismo son auténticos. Los textos en el documento que provienen de otras fuentes están debidamente citados y referenciados.

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

Riobamba, 11 de mayo de 2023


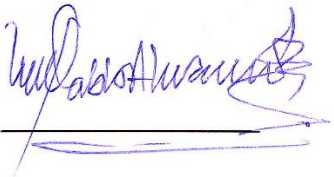
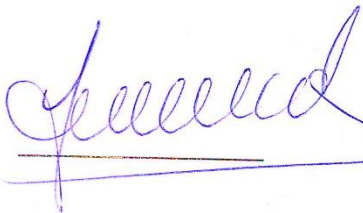
A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Nicole Torres Revelo', with a stylized flourish underneath.

**Nicole Carolina Torres Revelo**

**1726713777**

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

El Tribunal del Trabajo de Integración Curricular certifica que: El Trabajo de Integración Curricular; tipo: Proyecto de Investigación, **DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. EN PITAHAYA Y SENSIBILIDAD A FUNGICIDAS DE DIFERENTES MODOS DE ACCIÓN**, realizado por la señorita: **NICOLE CAROLINA TORRES REVELO**, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Integración Curricular, el mismo que cumple con los requisitos científicos, técnicos, legales, en tal virtud el Tribunal Autoriza su presentación.

	<b>FIRMA</b>	<b>FECHA</b>
Ing. Víctor Alberto Lindao Córdova PhD <b>PRESIDENTE DEL TRIBUNAL</b>		2023-05-11
Ing. Pablo Israel Álvarez Romero PhD <b>DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2023-05-11
Ing. Norma Soledad Erazo Sandoval PhD <b>ASESORA DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR</b>		2023-05-11

## **DEDICATORIA**

En este apartado dedico mi trabajo de integración curricular al altísimo que me ha dado el espíritu, la vida y salud para concluir con éxito mi trabajo , a mis amados padres Sergio Torres y Mercedes Revelo y a mi querida hermana Estefanny Torres por su paciencia, amor, entrega y apoyo constante, son las personas que más amo en el mundo y que sin lugar a dudas me han apoyado incondicionalmente, por ello, de manera muy especial, todo el esfuerzo en este trabajo no hubiera sido posible sin ustedes que han sido mi inspiración. También quiero dedicarlo a mis abuelitos Domingo, Francisca, Maglena y Luis que han sido mi refugio, siempre listos para recibirme con un abrazo que más allá de ser mis abuelitos han sido mis amigos y quiero que sepan que ocupan un lugar muy especial en mi corazón. Finalmente, a las criaturitas más lindas del mundo quienes en vida fueron: Cometa, Dayra, Reynaldo, Arti, Whenses, Eswin y Niñito Lindo que, a pesar de que ya no estén aquí en la tierra, me trajeron mucha felicidad y curaron mi tristeza haciéndome muy fuerte.

Nicole

## AGRADECIMIENTO

Agradezco enormemente a Dios por permitirme tener vida, salud, una familia ejemplar, maestros excelentes y rodearme de personas tan especiales durante mi vida académica, sin lugar a duda Dios me ha bendecido y estoy profundamente agradecida por eso. A mis padres, que todos los días pusieron sus esperanzas en mí y sacrificaron todo, poniéndome como prioridad, a mi hermana que con su alegría me animaba a seguir y nunca me dejó sola; a mis primas (Paola y Andrea) y tíos (Adriana, Anita, Remigio y Alberto) que siempre han confiado en mí, incluso cuando yo no me tenía ni fé. A mi mejor amigo Luis Miguel que me ayudo incondicionalmente en todo y a quien quiero muchísimo, de la misma forma a su familia Tenezaca Guamán quienes han sido muy generosos conmigo. Infinitas gracias a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, alma mater del conocimiento y morada de mis queridos maestros que han sido participes de mi formación académica en la Facultad de Recursos Naturales específicamente de la carrera de Agronomía. De manera muy especial al Ing. Pablo Álvarez PhD, que más allá de un excelente profesional y un ser humano altruista me acogió en el laboratorio de fitopatología como un padre, me ofreció su amistad y conocimiento de la forma más genuina, quien también decidió confiar en mi para culminar esta investigación; sin lugar a dudas estoy y estaré siempre agradecida por sus consejos, sus enseñanzas, su apoyo, su paciencia para responder mil preguntas más y por su cariño hacia mi persona, lo guardaré por siempre en mi corazón . Al Ing. Fernando Rivas PhD, por su cariño hasta el último día, dándome apoyo y deseándome lo mejor en todo momento. Al Ing. Álvaro Rivera, por incluirme en todo, por los días que se quedó hasta tarde esperándome, por su apoyo incondicional, su paciencia y sobre todo su confianza. Al Ing. Juan Guerra, por su paciencia infinita, apoyo, palabras de aliento, comprensión y su amistad. A la Ing. Norma Erazo por tomar la responsabilidad de ser mi asesora y brindarme ayuda inmediata en cuanto lo necesite. A mis amigos de laboratorio Claire, Jhoanna, Kevin, Dennys, Fernanda y María Fernanda con quienes conocí la amistad más sincera, siempre apoyándonos, quienes ahora puedo llamar mi familia adoptiva. También extendo mis agradecimientos a mis queridas amigas y a sus familias, Katheryn Caiza y Adriana Gadway, son espectaculares personas y las quiero mucho.

**Nicole**

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	XIV
ÍNDICE DE ANEXOS.....	XVI
RESUMEN.....	XVII
SUMMARY / ABSTRACT.....	XVIII
INTRODUCCIÓN.....	1

### CAPÍTULO I

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1 Planteamiento del problema.....	2
1.2 Objetivos.....	2
1.2.1 <i>General</i> .....	2
1.2.2 <i>Específicos</i> .....	2
1.3 Justificación.....	2
1.4 Hipótesis.....	3
1.4.1 <i>Nula</i> .....	3
1.4.2 <i>Alternativa</i> .....	3

### CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Diversidad genética.....	4
2.1.1 <i>Mecanismos evolutivos</i> .....	4
2.1.1.1 La variabilidad genética.....	4
2.1.1.2 Mutaciones.....	4
2.1.1.3 Recombinación genética.....	4
2.1.1.4 Deriva genética.....	5
2.1.1.5 Flujo génico.....	5
2.1.1.6 La selección natural.....	5
2.1.2 <i>Marcadores genéticos</i> .....	5
2.1.2.1 Los marcadores RAPDs.....	6
2.2 <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.....	6



2.2.1	<i>Taxonomía</i> .....	6
2.2.2	<i>Ciclo biológico</i> .....	7
2.2.3	<i>Síntomas y Signos</i> .....	7
2.2.4	<i>Especies Afectadas</i> .....	8
2.2.5	<i>Manejo integrado</i> .....	8
2.3	<b>Fungicidas</b> .....	9
2.3.1	<i>Clasificación de los fungicidas de acuerdo a la movilidad en la planta</i> .....	9
2.3.1.1	<i>Movimiento por el xilema</i> .....	9
2.3.1.2	<i>Anfimóviles o verdaderamente sistémicos</i> .....	9
2.3.1.3	<i>Fungicidas de contacto</i> .....	9
2.3.1.4	<i>Fungicidas sistémicos</i> .....	10
2.3.1.5	<i>Fungicidas translaminares</i> .....	10
2.3.2	<i>Clasificación de los fungicidas de acuerdo a los modos de acción según el comité de acción para la resistencia de fungicidas (FRAC)</i> .....	10
2.4	<b>Estudio de sensibilidad de fungicidas</b> .....	17
2.4.1	<i>Resistencia Cruzada</i> .....	17
2.4.2	<i>Resistencia Inducida</i> .....	17
2.4.3	<i>Sensibilidad y Resistencia a Fungicidas</i> .....	18
2.4.4	<i>Tebuconazol</i> .....	18
2.4.5	<i>Difenoconazol</i> .....	19
2.4.6	<i>Cyprodinil</i> .....	19
2.4.7	<i>Sulfato de cobre pentahidratado</i> .....	19
2.4.8	<i>Pyraclostrobin</i> .....	19
2.4.9	<i>Tiabendazol</i> .....	20
2.4.10	<i>Tiofanato metil</i> .....	20
2.4.11	<i>Dosis letal o Dosis Efectiva</i> .....	20
2.5	<b>Pitahaya</b> .....	20
2.5.1	<i>Taxonomía</i> .....	21
2.5.2	<i>Botánica</i> .....	21
2.5.3	<i>Condiciones Edafoclimáticas</i> .....	21
2.5.4	<i>Plagas y Enfermedades</i> .....	22
2.5.5	<i>Manejo integrado</i> .....	22
2.5.5.1	<i>Control de podredumbre blanda</i> .....	22
2.5.5.2	<i>Tratamiento de la antracnosis</i> .....	23
2.5.5.3	<i>Resistencia a la pudrición primaria de <i>Fusarium oxysporum</i></i> .....	23

## CAPÍTULO III

<b>3.</b>	<b>MARCO METODOLÓGICO .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Características del lugar .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Localización.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Características Geográficas.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2</b>	<b>Materiales y Equipos.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Materiales de laboratorio .....</b>	<b>24</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Equipos de laboratorio .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Reactivos e insumos.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.4</b>	<b>Material biológico.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Materiales de oficina .....</b>	<b>27</b>
<b>3.3</b>	<b>Metodología de la investigación.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Operacionalización de las variables .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1.1</b>	<b>Variables dependientes.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1.2</b>	<b>Variables independientes.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Diseño experimental.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2.1</b>	<b>Diversidad Genética.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2.2</b>	<b>Sensibilidad a Fungicidas .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Análisis funcional.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4</b>	<b>Manejo del ensayo de diversidad.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Reactivación de las cepas .....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Extracción de ADN.....</b>	<b>29</b>
<b>3.4.3</b>	<b>PCR.....</b>	<b>31</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Electroforesis .....</b>	<b>32</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Análisis de datos de diversidad.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5</b>	<b>Manejo del ensayo de sensibilidad .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Medio utilizado .....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Cálculos para determinar las concentraciones de los fungicidas.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Preparación de la solución stock.....</b>	<b>32</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Enmendado del medio de cultivo.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Siembra de discos de <i>Lasiodiplodia theobromae</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.6</b>	<b>Variables evaluadas.....</b>	<b>33</b>
<b>3.5.6.1</b>	<b>Tasa de Crecimiento Micelial (TCM).....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.6.2</b>	<b>Estimación de la dosis efectiva 50 (DE50).....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.6.3</b>	<b>Rango de sensibilidad.....</b>	<b>34</b>

3.5.7	<i>Análisis de datos de sensibilidad</i> .....	35
3.5.7.1	<i>Diagrama de caja y bigote (box-plot)</i> .....	35
3.5.7.2	<i>Diagrama barras</i> .....	35

## CAPÍTULO IV

4.	<b>MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS</b> .....	36
4.1	<b>Procesamiento, análisis e interpretación de resultados de sensibilidad</b> .....	36
4.1.1	<i>Tasa de crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de tiabendazol.</i> ....	36
4.1.2	<i>Tasa de crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de tebuconazol</i> .....	37
4.1.3	<i>Tasa de crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de tiofanato de metil</i> .....	39
4.1.4	<i>Tasa de crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de difenoconazol.</i> ....	40
4.1.5	<i>Tasa de crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de pyraclostrobin</i> .....	42
4.1.6	<i>Tasa de crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de sulfato de cobre pentahidratado</i> .....	43
4.1.7	<i>Tasa de crecimiento micelial de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de cyprodinil</i> .....	45
4.1.8	<i>Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de tiabendazol para diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de diferentes localidades</i> .....	46
4.1.9	<i>Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de tebuconazol para diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de diferentes localidades</i> .....	48
4.1.10	<i>Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de tiofanato de metil para diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de diferentes localidades</i> .....	50
4.1.11	<i>Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de difenoconazol para diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de diferentes localidades</i> .....	52
4.1.12	<i>Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de pyraclostrobin para diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de diferentes localidades</i> .....	54
4.1.13	<i>Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de sulfato de cobre pentahidratado para diferentes cepas de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> de diferentes localidades</i> .....	56

<i>4.1.14 Dosis Efectiva 50 (DE50) de cyprodinil para diferentes cepas de Lasiodiplodia theobromae de diferentes localidades.....</i>	<b>58</b>
<i>4.1.15 Análisis de riqueza de los genotipos de Lasiodiplodia theobromae de diferentes localidades. ....</i>	<b>60</b>
<b>4.2 Discusión de resultados .....</b>	<b>64</b>
<b>4.3 Comprobación de la hipótesis.....</b>	<b>68</b>

## **CAPITULO V**

<b>5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1 Conclusiones .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2 Recomendaciones.....</b>	<b>70</b>

## **GLOSARIO**

## **BIBLIOGRAFÍA**

## **ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 2-1:</b> Taxonomía de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon and Maubl .....	7
<b>Tabla 2-2:</b> Clasificación de los fungicidas de acuerdo a su modo de acción .....	11
<b>Tabla 2-3:</b> Clasificación de los fungicidas de acuerdo a su modo de acción .....	12
<b>Tabla 2-4:</b> Taxonomía de la pitahaya ( <i>Hylocereus</i> spp.) .....	21
<b>Tabla 3-1:</b> Características geográficas de la zona.....	24
<b>Tabla 3-2:</b> Material genómico para la diversidad .....	26
<b>Tabla 3-3:</b> Material biológico para la sensibilidad .....	27
<b>Tabla 3-4:</b> Primers RAPDs empleados para la diversidad genética.....	31
<b>Tabla 3-5:</b> Perfil térmico para PCR de marcadores Rapds .....	31
<b>Tabla 3-6:</b> Concentración del ingrediente activo para la preparación de la solución stock.....	33
<b>Tabla 3-7:</b> Escala de sensibilidad propuesta por Gudmestad (2019) .....	34
<b>Tabla 3-8:</b> Escala de sensibilidad propuesta por Liu (2020).....	34
<b>Tabla 4-1:</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con tiabendazol.....	36
<b>Tabla 4-2:</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con tebuconazol .....	38
<b>Tabla 4-3:</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con tiofanato de metil.....	39
<b>Tabla 4-4:</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con difenoconazol.....	41
<b>Tabla 4-5:</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con pyraclostrobin.....	42
<b>Tabla 4-6:</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con sulfato de cobre pentahidratado.....	44
<b>Tabla 4-7:</b> Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con cyprodinil.....	45
<b>Tabla 4-8:</b> Test de Kruskal Wallis 5% de la DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con tiabendazol.....	47
<b>Tabla 4-9:</b> Test de Kruskal Wallis 5% de la DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con tebuconazol. ....	48
<b>Tabla 4-10:</b> Test de Kruskal Wallis 5% de la DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con Tiofanato de metil. ....	50

<b>Tabla 4-11:</b> Test de Kruskal Wallis 5% de la DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con difenoconazol. ....	52
<b>Tabla 4-12:</b> Test de Kruskal Wallis 5% de la DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con pyraclostrobin. ....	54
<b>Tabla 4-13:</b> Test de Kruskal Wallis 5% de la DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con sulfato de cobre pentahidratado. ....	56
<b>Tabla 4-14:</b> Test de Kruskal Wallis 5% de la DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con cyprodinil.....	58
<b>Tabla 4-15:</b> DE <sub>50</sub> de los aislados de <i>L.theobromae</i> enmendado con diferentes fungicidas.....	59
<b>Tabla 4-16:</b> Conjunto A para el análisis de diversidad de los aislados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	60
<b>Tabla 4-17:</b> Conjunto B para el análisis de diversidad de los aislados de <i>Lasiodiplodia theobromae</i> .....	61
<b>Tabla 4-18:</b> Índice de riqueza de siete aislados de <i>L.theobromae</i> de distintas localidades .....	61
<b>Tabla 4-19:</b> Índice de riqueza de siete aislados de <i>L.theobromae</i> de distintas localidades .....	61
<b>Tabla 4-20:</b> Índice Shannon de siete aislados de <i>L.theobromae</i> de distintas localidades.....	62
<b>Tabla 4-21:</b> Índice de riqueza de ocho aislados de <i>L.theobromae</i> de distintas localidades.....	62
<b>Tabla 4-22:</b> Índice de Shannon de ocho aislados de <i>L.theobromae</i> de distintas localidades....	63

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1-4:</b> TCM de <i>L. theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con tiabendazol en diferentes dosis.....	36
<b>Ilustración 2-4:</b> TCM de <i>L. theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con tebuconazol en diferentes dosis.....	37
<b>Ilustración 3-4:</b> TCM de <i>L. theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con tiofanato de metil en diferentes dosis.....	39
<b>Ilustración 4-4:</b> TCM de <i>L. theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con difenoconazol en diferentes dosis.....	40
<b>Ilustración 5-4:</b> TCM de <i>L. theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con pyralostrobin en diferentes dosis.....	42
<b>Ilustración 7-4:</b> TCM de <i>L. theobromae</i> (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con cyprodinil en diferentes dosis.....	45
<b>Ilustración 8-4:</b> DE <sub>50</sub> de tiabendazol para diferentes cepas de <i>L.theobromae</i> de diferentes localidades.....	46
<b>Ilustración 9-4:</b> Frecuencia de los aislados de <i>L.theobromae</i> en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) estimadas para el principio activo tiabendazol.....	47
<b>Ilustración 10-4:</b> DE <sub>50</sub> de tebuconazol para diferentes cepas de <i>L.theobromae</i> de diferentes localidades.....	48
<b>Ilustración 11-4:</b> Frecuencia de los aislados de <i>L.theobromae</i> en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) estimadas para el principio activo tebuconazol.....	49
<b>Ilustración 12-4:</b> DE <sub>50</sub> de tiofanato de metil para diferentes cepas de <i>L.theobromae</i> de diferentes localidades.....	50
<b>Ilustración 13-4:</b> Frecuencia de los aislados de <i>L.theobromae</i> en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) estimadas para el principio activo tiofanato de metil.....	51
<b>Ilustración 14-4:</b> DE <sub>50</sub> de difenoconazol para diferentes cepas de <i>L.theobromae</i> de diferentes localidades.....	52
<b>Ilustración 15-4:</b> Frecuencia de los aislados de <i>L.theobromae</i> en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) estimadas para el principio activo difenoconazol.....	53
<b>Ilustración 16-4:</b> DE <sub>50</sub> de pyraclostrobin para diferentes cepas de <i>L.theobromae</i> de diferentes localidades.....	54
<b>Ilustración 17-4:</b> Frecuencia de los aislados de <i>L.theobromae</i> en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) estimadas para el principio activo pyraclostrobin.....	55

<b>Ilustración 18-4:</b> DE <sub>50</sub> de sulfato de cobre pentahidratado para diferentes cepas de <i>L.theobromae</i> de diferentes localidades .....	56
<b>Ilustración 19-4:</b> Frecuencia de los aislados de <i>L.theobromae</i> en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) estimadas para el fungicida sulfato de cobre pentahidratado .....	57
<b>Ilustración 20-4:</b> DE <sub>50</sub> de cyprodinil para diferentes cepas de <i>L.theobromae</i> de diferentes localidades .....	58
<b>Ilustración 21-4:</b> Frecuencia de los aislados de <i>L.theobromae</i> en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ) estimadas para el fungicida cyprodinil .....	59




## ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** CÁLCULOS PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES DE LOS FUNGICIDAS.
- ANEXO B:** PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK
- ANEXO C:** ENMENDADO DEL MEDIO DE CULTIVO Y REPIQUE
- ANEXO D:** CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* (PAT.) GRIFFON & MAUBL. QUE FUERON UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE SENSIBILIDAD IN VITRO A FUNGICIDAS
- ANEXO E:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON TIABENDAZOL.
- ANEXO F:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON TEBUCONAZOL
- ANEXO G:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON TIOFANATO DE METIL
- ANEXO H:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON DIFENOCONAZOL
- ANEXO I:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON PYRACLOSTROBIN
- ANEXO J:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON CYPRODINIL
- ANEXO K:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON SULFATO DE COBRE
- ANEXO L:** MICELIO DE *Lasiodiplodia theobromae* (PAT.) GRIFFON & MAUBL. QUE FUERON UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA
- ANEXO M:** EXTRACCIÓN DE ADN
- ANEXO N:** REHIDRATACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN
- ANEXO O:** REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)
- ANEXO P:** ELECTROFORESIS
- ANEXO Q:** CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN
- ANEXO R:** GRAFICA DE RIQUEZA

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue determinar la diversidad genética y la sensibilidad in vitro de *Lasiodiplodia theobromae*, a fungicidas de diferentes modos de acción; para lo cual se efectuó para la diversidad la extracción de ADN de 7 cepas de *Lasiodiplodia theobromae*, a través del empleo del Kit de Wizard y consecuentemente se procedió a realizar la PCR, la misma que utilizó como enzima Go-Taq Hot Star Master Mix con el perfil térmico apropiado para primers RAPDs y se elaboró electroforesis de 14 cepas separándolas en dos conjuntos A y B; Por otro lado para la sensibilidad se utilizaron siete principios activos: tiabendazol, tebuconazol, pyraclostrobin, cyprodinil, sulfato de cobre pentahidratado, difenoconazol y tiofanato de metil. Aplicados a 7 cepas de *L.theobromae* procedentes de distintas localidades de la provincia de Pichincha. Se preparó la solución stock de los fungicidas, se realizó diluciones seriadas de: 0,1; 1; 10 y 100ppm, se enveneno el medio PDA y se dispensó en cajas de Petri con 3 repeticiones para cada concentración, se sembró 2 discos de micelio y se evaluó el crecimiento. Para los análisis estadísticos se utilizó el programa R Studio en el cual se efectuó los análisis de riqueza y se determinó la TCM y DE50 con respecto a cada principio activo. Los resultados obtenidos fueron: Bonanza obtuvo en el conjunto A(3,38-2,52) y conjunto B(2,50-3,38), el tiabendazol(DE50:0,54-3,72ppm), tebuconazol(DE50:0,04-0,35ppm), cyprodinil(DE50:0,62-5,03ppm), pyraclostrobin(DE50:0,43-14,73ppm), sulfato de cobre pentahidratado(DE50:1,60-4,05ppm), difenoconazol(DE50: 0,07-16,65ppm) y tiofanato de metil(DE50: 0,54-3,72ppm). Se concluye que fue la localidad Bonanza la que presentó mayor número de genotipos multilocus en todos los conjuntos siendo la más diversa; con relación a la sensibilidad los principios activos eficientes sobre la TCM de *L. theobromae* fueron: tebuconazol, tiabendazol y tiofanato de metil, por ello se recomendó emplear en otro trabajo más aislados y otros productos.

Palabras clave: <*Lasiodiplodia theobromae*>, <*Hylocereus* spp>, <DIVERSIDAD GENÉTICA>, <DOSIS LETAL>, <SENSIBILIDAD>, <POLIMORFISMOS>

  
D. B. A. I.  
Castillo



1097-DBRA-UPT-2023

## SUMMARY / ABSTRACT

The aim of this study was to determine the genetic diversity and in vitro sensitivity of *Lasiodiplodia theobromae* to fungicides of different modes of action; for diversity, the extraction of DNA from 7 strains of *Lasiodiplodia theobromae* was carried out through the use of the Wizard Kit and consequently PCR was performed, using Go-Taq Hot Star Master Mix as enzyme with the appropriate thermal profile for RAPDs primers and electrophoresis of 14 strains separating them into two sets A and B; on the other hand, for sensitivity, seven active principles were used: thiabendazole, tebuconazole, pyraclostrobin, cyprodinil, copper sulfate pentahydrate, difenoconazole and thiophanate methyl. These were applied to 7 strains of *L. theobromae* from different localities in the province of Pichincha. The stock solution of the fungicides was prepared, serial dilutions of 0.1, 1, 10 and 100ppm were made, the PDA medium was poisoned and dispensed in Petri dishes with 3 replicates for each concentration, 2 mycelium discs were sown and growth was evaluated. For statistical analysis, the R Studio program was used to perform the richness analysis and determine the MCT and DE50 for each active principle. The results obtained were: Bonanza obtained in set A(3.38-2.52) and set B(2.50-3.38), thiabendazole(DE50:0.54-3.72ppm), tebuconazole(DE50:0.04-0.35ppm), cyprodinil(DE50: 0.62-5.03ppm), pyraclostrobin(DE50:0.43-14.73ppm), copper sulfate pentahydrate(DE50:1.60-4.05ppm), difenoconazole(DE50: 0.07-16.65ppm) and thiophanate methyl(DE50: 0.54-3.72ppm). It was concluded that the Bonanza locality was the one that presented the highest number of multilocus genotypes in all the sets, being the most diverse; in relation to the sensitivity, the efficient active principles on the MCT of *L. theobromae* were: tebuconazole, thiabendazole and thiophanate methyl, therefore, it was recommended to use more isolates and other products in other work.

Key words: <*Lasiodiplodia theobromae*>, <*Hylocereus* spp>, <GENETIC DIVERSITY>, <LETHAL DOSE>, <SENSITIVITY>, <POLYMORPHISM>.



Lcdá. Elsa Basantes A. Mgs  
C.I. 06035944409

1097-DBRA-UPT-2023

## INTRODUCCIÓN

Las plantaciones de pitahaya (*Hylocereus* spp.) son indispensables para el Ecuador cuya economía está basada en las exportaciones; durante el año 2021, se exportaron 17,895 toneladas de pitahaya, y, a pesar de que las cifras son alentadoras, debido a problemas fitosanitarios las pérdidas en producción se incrementan, al igual que la diversidad y resistencia de los microorganismos frente a productos para su control (AGROCALIDAD, 2022).

En el cultivo de pitahaya, el hongo fitopatógeno *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. se asocia a muerte regresiva, gomosis, mancha foliar, síntomas de pudrición del pedúnculo y pudrición del fruto del espécimen vegetal (Mbenoun et al., 2008: p. 381). Sin embargo, el conocimiento de la diversidad genética de un organismo patógeno es fundamental para en el futuro desarrollar estrategias que permitan su control (Ferreira, 2014: p. 22). A su vez las diversas técnicas de biología molecular han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de microorganismos, así como estimar su diversidad (Phillips & Mora, 1995: p.183).

*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. es un hongo necrótrofo, el cual se asocia a enfermedades que causan pérdidas económicas representativas (Salvatore et al., 2020: p. 230). En un inicio presentaba actividad endófito en tejido sano pasando a ser en la actualidad un patógeno oportunista cuando el huésped está bajo condiciones de estrés, lo cual se considera potencialmente una amenaza para una gran variedad de cultivos tropicales y subtropicales (Ali et al., 2019: p.39).

Ante esta problemática fitosanitaria el empleo de fungicidas es cada vez más frecuente, y el desconocimiento de parte de los agricultores ecuatorianos les obliga para mantener la producción, un uso excesivos de los mismos, lo mismo que ocasiona que el patógeno genere resistencia al fungicida, esta resistencia suele producirse debido a que el organismo en este caso evaluado presenta un cambio a nivel celular con relación al principio activo del fungicida, desencadenando así, generaciones que contienen esta nueva variante genética (Gisi et al, 2002; Fisher y Meunier, 2008; Ishii, 2010; Siertzki. H, 2015; citados en Carmona et al, 2018, p. 2).

Los fungicidas de contacto se consideran preventivos ya que contienen aquellos principios activos que al tener exposición directa con la planta genera resultados efectivos (Calvo, 2017: p. 1). Por otro lado, los fungicidas sistémicos son productos diseñados para ser absorbidos por las estomas o el sistema radicular, trabajando de forma interna dentro de las plantas (Sánchez, 2019: p. 2).

## CAPÍTULO I

### 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1 Planteamiento del problema

En la actualidad en el Ecuador no se disponen de estudios de diversidad genética de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl agente asociado al cancro del tallo en pitahaya *Hylocereus* spp y tampoco se dispone de estudios sobre la sensibilidad de este microorganismo con fungicidas, a pesar de ser el responsable de la disminución del rendimiento del cultivo y de su expansión progresiva en diversas zonas del país. Esto representa pérdidas económicas significativas a nivel nacional ya que la pitahaya es una fruta de exportación.

#### 1.2 Objetivos

##### 1.2.1 General

Determinar la diversidad genética de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl en pitahaya y su sensibilidad a fungicidas de diferentes modos de acción.

##### 1.2.2 Específicos

- Determinar la diversidad genética de los diferentes aislados de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, colectados en la provincia de Pichincha.
- Establecer la Dosis Efectiva 50 (DE50) de los fungicidas de diferente modo de acción en los aislados de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl, colectados en la provincia de Pichincha.

#### 1.3 Justificación

El microorganismo *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl se presenta como un reto para especialistas y aún más para el agricultor, debido a que desafortunadamente los estudios de diversidad genética son escasos en el mundo y en Ecuador casi inexistentes, representando un obstáculo para el desarrollo de estrategias de manejo y limitando la reducción del impacto de las enfermedades causadas por este patógeno, por tal motivo esta investigación pretende generar la información respectiva y conocimiento sobre la existencia de diferencias genéticas de

*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl entre localidades o características climáticas que hayan favorecido la variabilidad de la especie , para en consecuencia poder actuar en cada caso.

La evaluación de fungicidas con diferentes modos de acción, por otro lado, se realizó para la determinación del comportamiento del patógeno frente a los diferentes modos de acción de los fungicidas y las diferentes dosis, y así, establecer cuál fungicida con su modo de acción y su dosis, tendría el mejor efecto inhibitorio en el crecimiento micelial, dando a conocer la mejor opción en cuanto al manejo y control de este patógeno; mejorando los rendimientos del cultivo y consecuentemente la rentabilidad.

## **1.4 Hipótesis**

### **1.4.1 Nula**

Los aislados fúngicos no difieren genéticamente y los fungicidas de diferente modo de acción y dosis planteadas no presentan efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.

### **1.4.2 Alterna**

Al menos uno de los aislados fúngicos difiere genéticamente y al menos uno de los fungicidas de diferente modo de acción y una de las dosis presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Diversidad genética

##### 2.1.1 *Mecanismos evolutivos*

Los mecanismos evolutivos surgen de la necesidad de los organismos de cambiar ante la adversidad y por lo general, los microorganismos realizan cambios muy pequeños en su composición genética, pero a su vez muy significativo, pues son estos lo que les permite adaptarse al entorno en el que evolucionaron y mantenerse en ese entorno a lo largo del tiempo, creando variabilidad en los patrones genéticos y aumentando así su diversidad (Astorga et al., 2006: p.430).

##### 2.1.1.1 *La variabilidad genética*

La variabilidad genética se refiere a la cantidad de genotipos diferentes que existen en una población determinada, lo que hace que todos los individuos sean diferentes y tengan características diferentes (Baibakova et al., 2019: pp. 1-16). Esta diversidad es de naturaleza dinámica, donde las especies y sus poblaciones están en constante cambio, por lo que la situación actual es el resultado de los efectos combinados de divergencia y extinción (Astorga et al., 2006: p.430).

##### 2.1.1.2 *Mutaciones*

Las mutaciones son cambios que ocurren en el ADN de un organismo, y pueden afectar un solo nucleótido de ADN, un gen o un cromosoma completo; Estos cambios provocan que se expresen otras proteínas distintas y el individuo tenga otras características, se producen de forma aleatoria y pueden tener consecuencias positivas, neutras o negativas, por ello para Darwin, la mutación era la principal fuente de variación genética en una población, cabe destacar que estos cambios en el ADN son un proceso gradual, lento y continuo (Astorga et al., 2006: p.430).

##### 2.1.1.3 *Recombinación genética*

Durante la reproducción sexual, las crías son distintas entre sí y de sus padres, creando nuevos genotipos (combinaciones de genes) ya que durante la mitosis, las translocaciones de cromosomas homólogos ocurren y cuando se separan, llevan información genética de ambos padres, esta información se distribuye al azar de modo que cada gameto (haploide) contenga segmentos de los

cromosomas del padre y de la madre, por ello el cigoto llevará información genética diferente a la de los padres (Calvo, 2017: p. 8).

#### *2.1.1.4 Deriva genética*

La deriva genética ocurre cuando las proporciones de alelos cambian en una población, esto puede suceder cuando un grupo de individuos en una población se aísla del resto y forma una nueva población que puede tener una proporción de alelos diferente a la original (Astorga et al., 2006: p.430).

-Efecto fundador: Esto sucede cuando un pequeño grupo se separa y se aísla de la población original, es entonces cuando la variabilidad genética se reduce significativamente, entonces esta nueva generación será diferente tanto en genotipo como en fenotipo (Calvo, 2017: p. 8).

-Efecto cuello de botella: Esto ocurre poco después de que unos pocos individuos hayan sobrevivido o experimentado un evento de alta mortalidad, en donde como resultado, se reduce la variación genética (Calvo, 2017: p. 1).

#### *2.1.1.5 Flujo génico*

El flujo de genes ocurre cuando los alelos de un gen se transfieren de una población a otra, introduciendo alelos que no están presentes en la población que los acepta y creando nuevos fenotipos que pueden ser beneficiosos (Baibakova et al., 2019: pp. 1-16).

#### *2.1.1.6 La selección natural*

La selección natural es un proceso en el que se seleccionan las mejores características genéticas de la población para las condiciones ambientales en el lugar donde se desarrollan, por lo general determina características de adaptación de una descendencia, en donde el individuo tiende a desaparecer o prolongar su existencia (Sánchez, 2019: p. 2).

### *2.1.2 Marcadores genéticos*

La información genética que posee cada persona está determinada por el genotipo de ese organismo y está relacionada con toda o parte de la información genética de un organismo o ancestro pasado (Bergmann et al., 1989: p. 25). Cada locus implicado en la expresión fenotípica es un conjunto de genes presentes en los loci para las regiones codificantes y no codificantes del ADN (Gillet, 1996: p. 21).



Los marcadores genéticos representan la diferencia genética entre individuos o especies, actuando como una señal o signo ya que están cerca del genoma importante. La mayoría de ellos no afectan el fenotipo de las características interesantes, porque están cerrados o relacionados con genes que controlan otras características (Collard et al., 2005: p.170).

Actualmente, los marcadores genéticos se utilizan para la investigación básica, mejora, caracterización y conservación de plantas, apoyando la entrada de alelos favorables, donde prácticamente revelan sitios de variación dentro del ADN (Henry, 2001: p. 344).

#### *2.1.2.1 Los marcadores RAPDs*

Los marcadores RAPDs (Random Amplified Polimorphic DNA o fragmentos polimórficos amplificados al azar) fueron desarrollados como un método alternativo para la detección rápida de polimorfismos entre individuos, utilizando un solo cebador aleatorio y la amplificación de fragmentos de ADN aleatorios mediante la reacción en cadena de la polimerasa (Davila et.al.,2003: p. 262).

Los marcadores de este tipo tienden a predominar porque los polimorfismos se identifican por la presencia o ausencia de bandas y se asocian estrechamente con genes de resistencia a patógenos específicos de la raza, forman la base para la selección indirecta exitosa de un gen de resistencia importante (Davila et.al.,2003: p. 262).

### **2.2 *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.**

*Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. es una especie tipo del género *Lasiodiplodia* este es un hongo descrito por primera vez alrededor de 1890 que ataca las mazorcas de cacao (*Theobromae cacao*) en Ecuador (Crous y Palm, 1999: p. 170). Considerado un fitopatógeno de plantas hospederas leñosas y herbáceas de los trópicos y subtropicos (Picos, 2015: p. 59).

#### **2.2.1 *Taxonomía***

La taxonomía de *L. theobromae* ha mostrado avances significativos ya que al caracterizar regiones de espaciamiento intergénico y elongación 1 alfa, puede mejorar su posición filogenética y diferenciarla con especies ocultas, aumentando así el número de reportes de nuevas plantas hospederas (Picos, 2015: p. 59).

**Tabla 2-1:** Taxonomía de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl

<b>Súper reino:</b>	Eukaryota
<b>Reino</b>	Fungi
<b>Filo:</b>	Ascomycota
<b>Clase:</b>	Dothideomycetes
<b>Orden:</b>	Botryosphaeriales
<b>Familia:</b>	Botryosphaeriaceae
<b>Género:</b>	<i>Lasiodiplodia</i>
<b>Especie:</b>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> (Pat.) Griffon & Maubl.

Fuente: (NCBI, 2009)

Realizado por: Torres. N, 2023

### 2.2.2 *Ciclo biológico*

Su ascocarpo es morfológicamente marrón oscuro a negro, concentrado, de paredes gruesas, marrón oscuro y vítreo en las capas internas (Baibakova et al., 2019: pp. 1-16). Las esporas tienen forma subelíptica, con puntas anchas y redondeadas, inicialmente incoloras, y se vuelven de color marrón oscuro con la madurez (Phillips et al., 2008: p. 30).

Durante muchos años, la fisiología de los aislamientos dentro de la división de especies del género *Lasiodiplodia* ha sido objeto de controversia, por lo tanto, los marcadores fisiológicos tienen un valor limitado para determinar la segregación de especies, debido a la amplia variación en los marcadores fisiológicos entre especies, aislados de la misma especie (Phillips et al., 2008: p. 30).

### 2.2.3 *Síntomas y Signos*

Las lesiones causadas por *L. theobromae* en frutos tropicales son inicialmente difusas, se extienden como huellas dactilares, produciendo necrosis (Picos, 2015: p. 59). La principal vía de entrada de *L. theobromae* al huésped es a través de heridas provocadas por herramientas, insectos o causas naturales, gotas de lluvia y viento (Tanaka, Gonçalves, & Tiné, 2014: pp. 285-292).

El hongo sobrevive en tejido vegetal muerto o suelo y especialmente en frutos momificados y la prevalencia de *L. theobromae* depende de la temperatura (por encima de 30 °C), el estrés hídrico y la mala nutrición de las plantas (Tanaka, Gonçalves, & Tiné, 2014: pp. 285-292).

Al infectar la fruta de un árbol, el patógeno puede permanecer inactivo hasta que la fruta madure. Durante el período poscosecha, los frutos pueden infectarse al colocarlos en el suelo después de

la cosecha o por el contacto físico entre frutos sanos y enfermos (Picos, 2015: p. 59).

#### **2.2.4 Especies Afectadas**

*L. theobromae* ha estado implicada en la muerte y descomposición de frutas como mangos, uvas, papayas, rambutanes, nísperos y cítricos. Hay registros de infección por *L. theobromae* en aguacates, plátanos, rambutanes, lichis, guanábanas, anacardos y melocotones, y nuevos registros de pitahaya que muestran que la propagación de la enfermedad aumenta el número de huéspedes (Tanaka, Gonçalves, & Tiné, 2014: pp. 285-292)

#### **2.2.5 Manejo integrado**

*L. theobromae* es más virulenta que otros géneros y especies, causando más daño a los tallos trasplantados (Tovar et al., 2013: p. 235). En mango, *L. theobromae* fue moderadamente virulenta infectando las plantas de forma similar a los hongos de pudrición blanda, utilizando almidón y otros sacáridos presentes en el sustrato primario de madera para degradar celulosa y hemicelulosa, sin degradar la lignina (Tovar et al., 2013: p. 235).

Se han evaluado fungicidas contra *L. theobromae* y *Botryosphaeria dothidea*, que causan la enfermedad de las encías en melocotones y albaricoques, y se ha encontrado que los fungicidas de tiofanato-metilo inhiben el crecimiento y la germinación del micelio; También se ha informado que los fungicidas en aerosol tiofanato de metilo 70WP y carbendazim 50WP pueden usarse como terapia adyuvante para prevenir la invasión de patógenos (Picos, 2015: p. 59).

En un estudio que evaluó la susceptibilidad de *L. theobromae* a dos clases de fungicidas en 120 aislados de papaya eran sensibles a los componentes activos del grupo carbamato de la clase metilbencimidazol (benomil y tiabendazol) (Barbosa-Martínez et al., 2002: p.63).

Para los fungicidas con inhibidores de la desmetilación (imazalil, procloraz, tebuconazol), se encontró una gran diferencia en la sensibilidad de los aislados analizados, por lo que se puede concluir que *L. theobromae* es menos susceptible a este grupo (Barbosa-Martínez et al., 2002: p.63). Tras la cosecha se evaluaron los efectos del ozono, yodo y cloro en la germinación de *L. theobromae* se aisló de mango y encontró que cuando se usaba yodo (500 mg/l), la germinación de *L. teobromos* es 10%; y con ozono (2,2 mg.l-1) y cloro (360 mg.l-1). L-1) la tasa de germinación de esporas fue de 30 y 40%, respectivamente (Barbosa-Martínez et al., 2002: p.63).

La combinación de lavado y posterior aplicación de tiabendazol reducía la incidencia de *L.*

*theobromae* hasta en un 81% en trasplantes de sapote. Los fungicidas cyprodinil, fludioxinil, pyraclostrobin boscalid, prochloraz, tebuconazole e iprodione inhibieron eficazmente el crecimiento del micelio de *L. theobromae* in vitro (Tovar et al., 2013: p. 235).

## **2.3 Fungicidas**

Estos son productos de carácter químico que bien pueden inhibir el crecimiento de hongos y sus esporas, al igual que generar su muerte, esto con el único objetivo de mantener la integridad fitosanitaria de la planta (BasicFarm, 2020, p. 1). Los fungicidas son ampliamente utilizados debido a su eficacia impidiendo la expansión de enfermedades a nivel agrícola y atacando diferentes sitios celulares del patógeno (BasicFarm, 2020, p. 1).

### **2.3.1 Clasificación de los fungicidas de acuerdo a la movilidad en la planta**

#### **2.3.1.1 Movimiento por el xilema**

En gran parte los fungicidas de carácter sistémico se movilizan en la planta de manera más eficiente por el tejido xilemático mediante translocación (Almacellas y Marín 2013: p. 33). Cuando ingresan a la rizósfera, estos son absorbidos y su movimiento en la planta es generado por efecto de la transpiración (Liu et al., 2020: p.18). Los fungicidas atraviesan el xilema después de penetrar y se mueven desde allí gradualmente a otras partes de la planta como las hojas (Liu et al., 2020: p.18)

#### **2.3.1.2 Anfimóviles o verdaderamente sistémicos**

El movimiento anfibio dentro del árbol es cuando sucede en ambas direcciones el flujo de savia y el fungicida, el primero por el xilema cuya dirección es ascendente y el segundo por el floema cuya dirección es descendente (McGrath, 2014, p. 5). Se cree que estos fungicidas son verdaderamente sistémicos (Liu et al., 2020: p.18).

El sistema de motilidad del floema, o la forma en que viajan a los tejidos viejos y nuevos, representa la locomoción bidireccional, de una hoja a otra o a las raíces, logrando el movimiento de fluidos dentro del floema (Almacellas y Marín 2013, pp. 33). Los sistemas no retroceden después de su desplazamiento (McGrath, 2014: p. 5).

#### **2.3.1.3 Fungicidas de contacto**

Conocidos como protectores, existen en la superficie de los árboles (McGrath, 2014: p. 5). Según Almacellas y Marín (2013, p. 33) menciona que estos poseen la capacidad de crear protecciones a manera de pared evitando que el patógeno ingrese en este caso que forme esporas en la planta y se disemine, para que esto ocurra es necesario que estos fungicidas actúen sobre la externalidad del vegetal, estos químicos deben ser aplicados antes y durante la enfermedad siempre teniendo en cuenta las condiciones ambientales que pueden propiciar el progreso del patógeno, así como el estado fenológico de la planta (Bhale et al., 2013:p. 797-801).

#### *2.3.1.4 Fungicidas sistémicos*

Llamados invasores, son absorbidos por la planta (McGrath, 2014, p. 5). De acuerdo con Pérez (2014, p. 1), los fungicidas sistémicos son embebidos por la parte foliar y radicular repartiéndose por toda la planta. Sin embargo existen algunas combinaciones con este tipo de fungicidas, conocido como fungicidas translúcidos, estos tienen la característica de migración descendente en el área foliar sin ser de una hoja a otra (Bhale et al., 2013:p. 797-801).

Los fungicidas sistémicos afectan diferentes etapas de la vida fúngica (FRAC, 2019: pp.3- 5). Sin embargo poseen diferentes grados de acción o movimiento sistémico en la planta: desplazamiento, xilema y migración, o acción verdaderamente sistémica (Bhale et al., 2013:p. 797-801).

#### *2.3.1.5 Fungicidas translaminares*

Los fungicidas translaminares tienen una forma de movimiento que al contrario de los sistémicos estos pueden pasar de una parte específica de una hoja a otra (FRAC, 2019: pp.3- 5). Para alcanzar altos rendimientos es fundamental el empleo de fórmulas en cultivos bien cubiertos (FRAC, 2019: pp.3- 5). Estos fungicidas inhiben el crecimiento y esporulación fúngica de patógenos, los cuales se pueden lavar con precipitaciones al igual que algunos protectores (Bhale et al., 2013:p. 797-801).

De lo anterior se puede concluir que su actividad terapéutica es limitada, habitualmente a las 24 o 72 horas cuando ocurre la infección y pierden efectividad cuando empiezan a mostrarse síntomas (Almacellas y Marín 2013, p. 33).

### ***2.3.2 Clasificación de los fungicidas de acuerdo a los modos de acción según el comité de acción para la resistencia de fungicidas (FRAC).***

Los fungicidas inhiben el crecimiento de los hongos, lo que perturban los procesos a nivel celular mas relevantes (FRAC, 2019: pp.3- 5).

**Tabla 2-2:** Clasificación de los fungicidas de acuerdo a su modo de acción

<b>Modo de acción</b>	<b>Descripción</b>
<b>A. Metabolismo de ácidos nucleicos</b>	Dificultan la síntesis de ácidos nucleicos de ADN y ARN al reducir la producción de enzimas como la ARN polimerasa I, la adenosina deaminasa o la ADN topoisomerasa. Afectan en la división celular
<b>B. Proteínas motoras y del citoesqueleto</b>	La tubulina (microtúbulos-citoesqueleto), es una molécula esencial para la formación y segregación de los cromosomas durante la división celular; la alteración de la tubulina perjudica los niveles posteriores de la mitosis
<b>C. Respiración</b>	La respiración es un proceso de oxidación complejo que conserva la energía liberada durante la descomposición de las moléculas (por ejemplo, los hidratos de carbono) mediante la producción de ATP y ADP
<b>D. Síntesis de aminoácidos y proteínas</b>	Inhibición de la biosíntesis de la metionina (gen cgs) y de la secreción de las enzimas implicadas en la transferencia de información del ARN en la síntesis de una secuencia de aminoácidos
<b>E. Transducción de señales</b>	Está formado por sustancias que alteran la transducción de señales e inhiben los mecanismos metabólicos que permiten a las células adaptarse a su entorno. MAP/histidina-quinasa en la transducción de señales osmótica (OS-2, HOG1)
<b>F. Transporte o síntesis de lípidos/función o integridad de la membrana</b>	Alteran la síntesis de lípidos y la integridad de las membranas celulares. Afectan a la permeabilidad de la membrana al influir en la formación de glicolípidos
<b>G. Biosíntesis de esterol en las membranas</b>	Inhibidor de enzimas o procesos enzimáticos en la biosíntesis de esteroides. Los esteroides están presentes en las membranas celulares de algunos hongos (ascomycetos y basidiomycetos, pero no bacterias ni oomicetos) y confieren estabilidad y control de permeabilidad
<b>H. Biosíntesis de la pared celular.</b>	Evitan que la glucosamina se una a la quitina de la pared celular. La glucosamina es el principal componente estructural de la pared celular de los hongos; la inhibición de este componente conduce a una ruptura de la integridad de la pared celular
<b>P. Inducción de defensas en la planta huésped</b>	
<b>U. Modo de acción desconocido</b>	
<b>NC. No clasificado</b>	
<b>M. Productos químicos con actividad multi-sitio</b>	
<b>BM. Productos biológicos con múltiples modos de acción</b>	

Fuente: (FRAC, 2019: pp. 12-18)

Realizado por: Torres. N, 2023

**Tabla 2-3:** Clasificación de los fungicidas de acuerdo a su modo de acción

MdA	Código y punto de acción	Nombre grupo	Grupo químico	Nombre común	Código FRAC
A: Metabolismo de ácidos nucleicos	<b>A1:</b> ARN polimerasa I	fungicidas PA (fenilamidas)	acilalaninas	benalaxil benalaxil-M (=kiralaxil) metalaxil metalaxil-M (=mefenoxam)	4
	<b>A2:</b> adenosin desaminasa	hidroxi- (2- amino-) pirimidinas	hidroxi- (2- amino-) pirimidinas	bupirimato	8
	<b>A3:</b> síntesis de ADN/ ARN (propuesto)	heteroaromáticos	isoxazoles	himexazo	32
B: Proteínas motoras y del citoesqueleto	<b>B1:</b> ensamblaje de la $\beta$ -tubulina en mitosis	fungicidas <b>MBC</b> (Metil Benzimidazol Carbamatos)	benzimidazoles  tiofanatos	tiabendazol  metil tiofanato	1
	<b>B2:</b> ensamblaje de la $\beta$ -tubulina en mitosis	N-fenil carbamatos	N-fenil carbamatos	dietofencarb	10
	<b>B3:</b> ensamblaje de la $\beta$ -tubulina en mitosis	benzamidas	toluamidas	zoxamida	22
	<b>B4:</b> división celular (sitio desconocido)	fenilureas	fenilureas	pencicuron	20
	<b>B5:</b> deslocalización de proteínas tipo espectrina	benzamidas	Piridinilmetil- benzamidas	fluopicolida	43
	<b>B6:</b> función de la actina/miosina/ fimbrina	aril-fenil-cetonas	Benzofenonas  benzoilpiridinas	metrafenona  ( <i>piriofenona</i> )	50
C. Respiración	<b>C2:</b> complejo II: succinato deshidrogenasa	SDHI (Inhibidores de la Succinato deshidrogenasa)	fenil-benzamidas fenil-oxi-etil tiofeno amidas piridinil- etilbenzamidas Oxatin- carboxamidas pirazol-4- carboxamidas	flutolanil ( <i>isofetamid</i> )  fluopiram  carboxina  benzovindiflupyr bixafen fluxapyroxad	7

**D: síntesis de aminoácidos y proteínas**

			isopirazam pentiopirad	
		piridincarboxamid as	boscalida	
<b>C3:</b> complejo III: citocromo bc1 (ubiquinol oxidasa) en el sitio Qo (gen cit b)	fungicidas <b>QoI</b> (Inhibidores externos de la <b>Quinona</b> )	metoxi-acrilatos metoxi- carbamatos oximino-acetatos oxazolidina- dionas dihidro- dioxazinas imidazolinonas	azoxistrobin piraclostrobin kresoxim-metil trifloxistrobin amoladona fluoxastrobin fenamidona	11
<b>C4:</b> complejo III: citocromo bc1 (ubiquinona reductasa) en el sitio Qi	fungicidas <b>QiI</b> (Inhibidores internos de la <b>Quinona</b> )	ciano-imidazoles sulfamoil- triazoles	ciazofamida amisulbrom	21
<b>C5:</b> desacopladores de la fosforilación oxidativa		dinitrofenil crotonatos 2,6-dinitroanilinas	meptildinocap fluazinam	29
<b>C7:</b> transporte de ATP (propuesto)	tiofeno- carboxamidas	tiofeno- carboxamidas	siltiofam	38
<b>C8:</b> complejo III: citocromo bc1 (ubiquinona reductasa) en el sitio Qo, subsitio de unión de estigmatelina	fungicidas <b>QoSI</b> (Inhibidores externos de la <b>Quinona</b> , unión tipo estigmatelina)	triazolopirimidila mina	ametoctradin	45
<b>D1:</b> biosíntesis de metionina (propuesto) (gen cgs)	fungicidas <b>AP</b> (Anilino- <b>Pirimidinas</b> )	anilino- pirimidinas	ciprodinil mepanipirim pirimetanil	9



E: transducción de señales	<b>E1:</b>	aza-naftalenos	ariloxiquinolinas	quinoxifen	13	
	transducción de señales (mecanismo desconocido)		quinazolinonas	proquinazid		
E: transducción de señales	<b>E2:</b>	fungicidas <b>PP</b> (fenilpirroles)	fenilpirroles	fludioxonil	12	
	MAP/Histidinaquinasa en la transducción de señales osmótica (os-2, HOG1)					
F: transporte o síntesis de lípidos/ función o integridad de la membrana	<b>F1:</b>	anteriormente dicarboximidadas				
	<b>F3:</b>	fungicidas <b>AH</b> ( <b>H</b> idrocarburos <b>A</b> romáticos) (clorofenoles, nitroanilinas)	hidrocarburos aromáticos	metil tolclofos	14	
	peroxidación de la célula (propuesto)		heteroaromáticos	1,2,4-tiadiazol	etridiazol	
		<b>F4:</b>	carbamatos	carbamatos	propamocarb	28
	Permeabilidad de la membrana celular, ácidos grasos (propuesto)					
	<b>F5:</b>	anteriormente fungicidas CAA				
	<b>F6:</b> disruptores microbianos de las membranas celulares del patógeno	microbiano ( <i>Bacillus</i> sp.)	<i>Bacillus</i> sp. y los fungicidas lipopéptidos producidos	<i>Bacillus subtilis</i> syn. <i>B. amyloliquefaciens</i> * cepa QST 713 <i>B. amyloliquefaciens</i> cepa D747	44	
<b>F7:</b> disrupción de la membrana celular (propuesto)	extracto vegetal	hidrocarburos terpénicos, alcoholes terpénicos y fenoles terpénicos	Extracto de <i>Melaleuca alternifolia</i> (árbol del té) Aceites vegetales (mezclas): Eugenol, geraniol y timol	46		
<b>G</b>	<b>G1:</b>	fungicidas <b>DMI</b>	imidazoles	imazalil	3	

	C14- demetilasa en la biosíntesis de esteroides (erg11/cip51)	(Inhibidores de la demetilación) (SBI: Clase I)	triazoles	procloraz bromuconazol ciproconazol difenconazol epoxiconazol fenbuconazol flutriafol ipconazol metconazol miclobutanil penconazol propiconazol tebuconazol tetraconazol triadimenol triticonazol	
			triazolintionas	protioconazol	
	G2: $\Delta$ 14-reductasa y $\Delta$ 8 $\rightarrow$ $\Delta$ 7 - isomerasa en la biosíntesis de esteroides (erg24, erg2)	aminas (“morfolinas”) (SBI: Clase II)	morfolinas	fenpropimorf	5
			piperidinas	fenpropidin	
			spiroketal-aminas	spiroxamina	
	G3: 3-ceto reductasa, desmetilación C4 (erg27)	fungicidas <b>KRI</b> (Inhibidores de la ceto Reductasa) (SBI: Clase III)	hidroxianilidas	fenhexamida	17
			Amino-pirazolinona	fenpirazamina	
<b>H: biosíntesis de la pared celular</b>	<b>H5:</b> celulosa sintasa	fungicidas <b>CAA</b> (Amidas del Ácido Carboxílico)	amidas del ácido cinámico	dimetomorf	40
			valinamida	bentiavalicarb	
			carbamatos	iprovalicarb valifenalato	
			amidas del ácido mandélico	mandipropamida	
<b>P: inducción de defensas en la planta huésped</b>	<b>P1:</b> asociado al salicilato	benzo-tiadiazol BTH	benzo-tiadiazol BTH	acibenzolar-S-metil	P 01
	<b>P4:</b> polisacáridos elicitores	compuesto natural	polisacáridos	laminarin	P 04

	<b>P7: fosfonatos</b>	fosfonatos	etil fosfonatos	fosetil-Al ácido fosforoso y sus sales (fosfonato potásico)	P 07 (33)
<b>Modo de acción desconocido (los números U que no aparecen en la lista derivan de fungicidas reclasificados o que no están registrados en España)</b>	desconocido	cianoacetamidaox ima	cianoacetamidaox ima	cimoxanilo	27
	anteriormente fosfonatos (código 33), reclasificado a P07 en 2018				
	desconocido	fenil-acetamida	fenil-acetamidas	ciflufenamid	U 06
	disrupción de la membrana celular (propuesto)	guanidinas	guanidinas	dodina	U 12
<b>NC: no clasificado</b>	desconocido	diversos	diversos	aceites minerales, aceites orgánicos, sales inorgánicas, material de origen biológico	NC
<b>M: Productos químicos con actividad multi-sitio</b>	actividad de contacto multi-sitio	inorgánico (electrófilos)	inorgánico	cobre (diferentes sales)	M 01
		inorgánico (electrófilos)	inorgánico	azufre	M 02
		ditiocarbamatos y relacionados (electrófilos)	ditiocarbamatos y relacionados	mancozeb metiram tiram ziram	M 03
		ftalimidias (electrófilos)	ftalimidias	captan folpet	M 04
		cloronitrilos (ftalonitrilos) (mecanismo inespecífico)	cloronitrilos (ftalonitrilos)	clortalonil	M 05
		quinonas (antraquinonas) (electrófilos)	quinonas (antraquinonas)	ditianona	M 09

<b>BM: Productos biológicos con múltiples modos de acción</b>	Competencia, micoparasitismo, antibiosis, enzimas líticas y resistencia inducida	Microbiano ( <i>Trichoderma</i> spp.)	<i>Trichoderma</i> spp. y los metabolitos fungicidas producidos	<i>Trichoderma asperellum</i> Cepas: ICC012, T25, T34  <i>Trichoderma atroviride</i> Cepas: T11, SC1  <i>Trichoderma gamsii</i> Cepa: ICC080  <i>Trichoderma harzianum rifai</i> Cepa: T22	BM 02
---	--	---------------------------------------	---	--	-------

Fuente: (FRAC, 2019: pp. 12-18)

Realizado por: Torres. N, 2023

## 2.4 Estudio de sensibilidad de fungicidas

### 2.4.1 Resistencia Cruzada

La resistencia cruzada hace referencia a la capacidad de un organismo para resistir el efecto de un antibiótico después de haber desarrollado resistencia a otro antibiótico de la misma clase o con un mecanismo de acción similar (Luna et al., 2012: pp.844-853). La resistencia cruzada a los fungicidas es un problema común que puede limitar la eficacia de los tratamientos químicos en diversos cultivos importantes (Maldonado, 2018: p. 19).

El uso excesivo y la mala gestión de los fungicidas pueden aumentar el riesgo de resistencia cruzada en los patógenos fúngicos, lo que resulta en mayores costos para los productores (Luna et al., 2012: pp.844-853).

Para abordar este problema, se requiere un enfoque integral que incluya la gestión adecuada de los fungicidas, la mejora de la resistencia de las plantas y la adopción de prácticas agrícolas sostenibles (Fisher & Gollan, 2018: p.82).

### 2.4.2 Resistencia Inducida

La resistencia inducida es un proceso por el cual una planta puede activar sus propias defensas después de haber sido expuesta a un agente patógeno o estresante, lo que le permite protegerse de

futuras infecciones o daños (Luna et al., 2012: pp.844-853). Este proceso es una forma de inmunidad adquirida en las plantas y es similar al sistema inmunológico de los animales (Conrath, 2011: pp.524-531).

La resistencia inducida se puede activar a través de diversos mecanismos, como la producción de proteínas de defensa, la activación de genes de respuesta a estrés, la síntesis de hormonas de defensa y la acumulación de metabolitos protectores (Conrath, 2011: pp.524-531).

Esta estrategia de defensa ha sido objeto de estudio en la investigación agrícola debido a su potencial para reducir la dependencia de los cultivos de pesticidas químicos y mejorar la resistencia de las plantas a los patógenos y otros factores estresantes (Conrath, 2011: pp.524-531).

### **2.4.3 Sensibilidad y Resistencia a Fungicidas**

Cuando se exponen a sustancias tóxicas, los microorganismos desarrollan mecanismos de defensa como la sensibilización y la inmunidad; Cuando se usa un fungicida, el organismo fúngico reaccionará al fungicida cuando inhiba su crecimiento, es decir, se haya logrado el objetivo deseado; por otro lado, si el hongo desarrolla inmunidad, el fungicida no será adecuado para su propósito (Maldonado, 2018: p. 19).

Se ha mencionado que la resistencia a un determinado fungicida tiende a ser el resultado de un cambio a nivel celular que no responde al sitio de acción que maneja el fungicida (Koller, 2000; Damicon, 2004; citado en Escudero et al., 2009, p. 4774).

Este cambio es provocado por un rasgo heredable, es decir, en el mismo ADN y la resistencia a los fungicidas se demuestra en la modificación genética del hongo, lo que resulta en una sensibilidad reducida a la molécula química, lo que reduce la velocidad a la que el fungicida ingresa a la célula del patógeno, si no estuviera presente, interactuando químicamente con la molécula objetivo o desintoxicando el compuesto fúngico. Estos cambios a menudo se relacionan con la aparición de mutaciones genéticas que bien pueden ocurrir de forma natural o ser inducidas por factores externos, sometiendo al organismo a una presión de selección a nivel molecular (Koller, 2000; Damicon, 2004; citado en Escudero et al., 2009, p. 4774).

### **2.4.4 Tebuconazol**

**Triazoles:** estos fungicidas se absorben en la parte foliar y se van traslocando desde la base ascendiendo lentamente, también se los considera esencialmente translaminares, estos fungicidas

(IBE) son inhibidores de la síntesis del ergosterol (ergosta-5,7,22trien 3 $\beta$ -ol), el cual es un esteroide que forma parte de las membranas celulares de los organismos fúngicos, debido a este ataque se provocan cambios haciendo la membrana mucho más penetrable y alterando su rigidez; además los triazoles son considerados (DMI) un inhibidor de la desmetilación del C14 del lanosterol (FRAC, 2020; Klix et al., 2007; citados en Odintsova et al., 2020: p.3).

#### **2.4.5 Difenoconazol**

El difenoconazol es un fungicida de la familia de los triazoles que actúa como inhibidor de la biosíntesis de esteroides en hongos, impidiendo su crecimiento y reproducción Sandoval, et.al (2021). Ha demostrado ser efectivo en el control de algunas enfermedades, sin embargo, su uso excesivo y la mala gestión pueden llevar a la aparición de resistencia en los hongos, lo que reduce la eficacia del fungicida y aumenta la necesidad de su uso (Zhang et.al.,2020: p.137).

#### **2.4.6 Cyprodinil**

**Anilino pirimidinas:** El fungicida ciprodinil [4-ciclopropil-6-metil-2-(fenilamino) pirimidina] se encuentra fuertemente relacionado con la metionina (Zhang et.al.,2020: p.137). Inhibe la producción de esporas, la penetración dentro de la planta, así como también el desarrollo del tubo germinativo, y haustorios secundarios, micelio tanto externo e interno, impidiendo la esporulación y los procesos de transporte de la membrana plasmática Serrano et al (2018).

Actúa en el ciclo de vida de los hongos principalmente durante el proceso de penetración y el crecimiento del micelio dentro del tejido de la planta (Zhang et.al.,2020: p.137). Muestra una buena y rápida translocación acrópeta (sistema ascendente) dentro de las hojas y frutos, por ello es usado también por las plantas en la síntesis del etileno (Jeger et al., 2019: pp. 165-196)

#### **2.4.7 Sulfato de cobre pentahidratado**

**Inorgánico:** los fungicidas en base de cobre tienden a ir soltando consecutivamente los iones (Cu<sup>+</sup>), este ion al tener actividad en distintos sitios de la célula fúngica, provoca cambios drásticos en el sistema enzimático llevando a la aniquilación del hongo (Lesemann et al., 2006; citados en Baibakova et al. 2019).

#### **2.4.8 Pyraclostrobin**

**Metoxicarbamatos:** El pyraclostrobin es un fungicida perteneciente al grupo de los estrobilurinas, que actúa como inhibidor de la respiración mitocondrial en los hongos, impidiendo su crecimiento y reproducción Bhat et al., (2016). Perteneciente a la clase de los estrobilurinas, que actúan inhibiendo la respiración mitocondrial de los hongos específicamente, se une a la proteína citocromo bc1, que forma parte de la cadena de transporte de electrones en la mitocondria, y bloquea su función normal, esto interrumpe la producción de energía en los hongos, lo que a su vez impide su crecimiento y reproducción (Brunke et al., 2015: pp. 425-446).

#### **2.4.9 Tiabendazol**

**Bencimidazoles:** Es un fungicida de amplio espectro que actúa inhibiendo la síntesis de la pared celular del hongo y alterando su función mitocondrial, es absorbido por la cutícula y las raíces de las plantas y se transloca hacia los órganos en crecimiento, como hojas y brotes, donde actúa contra los hongos patógenos Gullino, et.al (2010). El mecanismo de acción del tiabendazol se basa en su capacidad para interferir con la síntesis de la pared celular del hongo, lo que resulta en una disminución de la estabilidad de la membrana celular y la liberación de enzimas hidrolíticas Khan,et.al (2013).

#### **2.4.10 Tiofanato metil**

**Bencimidazoles:** Funciona como inhibidor de la síntesis de la membrana celular fúngica, lo que provoca la disrupción del crecimiento y la muerte del hongo Khan,et.al (2013).

El tiofanato de metilo se aplica a menudo en forma de pulverización foliar o en el suelo, y se ha demostrado que es efectivo en una amplia variedad de cultivos, incluyendo frutas, hortalizas, cereales y plantas ornamentales (Kim et al.,2016: pp.254-259).

#### **2.4.11 Dosis letal o Dosis Efectiva**

Estas pruebas hacen relación a la susceptibilidad de los patógenos al ser expuestos a fungicidas con diferentes principios activos y concentraciones, esta concentración indica la inhibición del crecimiento micelial del hongo, en este estudio del 50% como la concentración inhibidora media (mg/L) (DE50) (Lovato et al., 2017: p. 71).

### **2.5 Pitahaya**

### 2.5.1 Taxonomía

La Pitahaya (*Hylocereus* spp.) es originaria de México y cultivada en algunos países tropicales y subtropicales, es una epífita facultativa que evolucionó en el piedemonte andino amazónico en Perú, Ecuador y Colombia (Verona et al., 2020: p. 442).

**Tabla 2-4:** Taxonomía de la pitahaya (*Hylocereus* spp.)

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophita
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Caryophyllales
<b>Familia:</b>	Cactaceae
<b>Género:</b>	<i>Hylocereus</i>
<b>Nombre Científico:</b>	<i>Hylocereus</i> spp.

**Fuente:** (Verona et al., 2020, p. 442)

**Realizado por:** Torres. N, 2023

### 2.5.2 Botánica

La pitahaya es una planta perenne, trepadora, epífita que crece comúnmente sobre árboles y piedra, porque no puede estar sola, actualmente, no hay suficientes descripciones anatómicas que le permitan apoyar su reconocimiento, sin embargo, se describe con hojas típicamente coníferas, ubicadas a lo largo de los bordes, formando racimos en los llamados directamente encima del tallo, son tubulares (Montesinos et al, 2015: p. 72).

Muy atractivo para los polinizadores principalmente murciélagos; se abren una sola vez por noche, suelen aparecer solitarias y tienen perianto irregular, su ciclo reproductivo masculino consta de muchos estambres en forma de espiral que producen polen en tres lóbulos, sin embargo el ovario con numerosos pistilos soldados y unicelulares fusionados en un patrón con protuberancias completamente verdes o verdes con bordes rojos y pétalos de color blanco, amarillo o rosa que contienen muchas semillas, con cordones largos ubicados en la placenta basal o parietal. La flor tiene una cámara de néctar y el fruto es esférico o hemisférico (Montesinos et al, 2015: p. 72).

### 2.5.3 Condiciones Edafoclimáticas

La pitahaya como especie de cactus tiene capacidad de adaptación a diferentes condiciones



ambientales le ha permitido ser introducida en países con diferencias significativas en clima y suelo, ha desarrollado mecanismos destinados a la absorción de agua (aparato radicular muy grande con gran crecimiento horizontal), evitando la pérdida de agua por transpiración, representado visualmente por la consistencia general casi carnosa de los órganos terrestres (Montesinos et al, 2015: p. 72).

#### **2.5.4 Plagas y Enfermedades**

Actualmente se han reconocido 17 géneros y 25 especies de fitopatógenos que infectan a la pitahaya y el rendimiento de la fruta de pitahaya se reduce debido a microorganismos como hongos, virus y bacterias, y también debido a la infestación poscosecha de algunos insectos, y para evitar estas pérdidas económicas se suele controlar enfermedades y plagas mediante el uso de pesticidas, fungicidas sintéticos como tiabendazol o imazalil. El Cáncer (*Neoscytalidium dimidiatum*), enfermedades virales (*Cactus virus X*), antracnosis (*Colletotrichum* spp.), pudrición de frutos y tallos (*B. cactus*) son las enfermedades más comúnmente reportadas son algunos ejemplos (Montesinos et al, 2015, p. 72).

Una de las enfermedades más dañinas para estos frutos es la podredumbre negra, especialmente el amarillamiento, causada por el hongo *Alternaria alternata*. Además, estas cepas patógenas infecta frutas distintas a la pitahaya. El hongo infecta las lesiones de frutos maduros poscosecha que se manifiestan como depresiones, manchas acuosas con manchas aceitunadas acompañadas de pudrición blanda (Montesinos et al, 2015:p. 72).

En un estudio realizado para reducir el daño causado por la podredumbre negra de *A. Alternata* pitahaya amarilla, se encontró que remojar la fruta en agua a 50 °C durante 2 minutos redujo efectivamente la podredumbre y el tratamiento, esto no ayuda. no afectó negativamente las propiedades fisicoquímicas y sensoriales del fruto (Verona et al.,2020: p. 442)

#### **2.5.5 Manejo integrado**

##### **2.5.5.1 Control de podredumbre blanda**

Prácticas culturales: establecer material de propagación saludable, desinfectar herramientas, prevenir daños a las plantas y evitar el exceso de humedad en el suelo, podas higiénicas periódicas para reducir la carga de patógenos, realizar el control de plagas, control oportuno de malezas y establecer el acceso al área. sala de desinfección de calzado (Verona et al.,2020: p. 442).

Control químico: El programa de aplicación debe realizarse de acuerdo con las especificaciones, alternando las sustancias activas y cumpliendo el período de carencia (Montesinos et al, 2015: p. 70).

#### 2.5.5.2 *Tratamiento de la antracnosis*

Medidas culturales: siembra de materiales sanos, implementación de podas de cuarentena animal y vegetal, recolección de restos de plantas y flores, desinfección regular del ganado, prevención de malezas a tiempo (Verona et al.,2020: p. 442).

Control químico: Este tipo de control debe utilizarse teniendo en cuenta las condiciones de umbral y circulación de los principios activos en el modo de acción y respetando los tiempos de espera (Montesinos et al, 2015: p. 70).

#### 2.5.5.3 *Resistencia a la pudrición primaria de *Fusarium oxysporum**

Cultural: Control oportuno de malezas, ajuste de planes de fertilización, limpieza de sitios de siembra, drenaje, siembra en terraplén, recolección de materiales de propagación libres de enfermedades, podas sanitarias y destrucción de plantas enfermas infectadas (Montesinos et al, 2015, p. 70).

Biológico: Al momento de la siembra, aplique agentes de control biológico a las raíces de las nuevas plantas, como algunas especies fúngicas. Químicos: si es necesario, el sitio de siembra se puede desinfectar con un conservante durante el período de formación, observando el período de escasez (Verona et al.,2020, p. 44)

## CAPÍTULO III

### 3. MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Características del lugar

##### 3.1.1 Localización

El presente trabajo de investigación se realizará en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

##### 3.1.2 Características Geográficas

Características y referencias de la zona

**Tabla 3-1:** Características geográficas de la zona

<b>Descripción de la zona</b>	
Lugar:	Riobamba, Chimborazo
Altitud:	2850 m. s. n. m.
<b>Coordenadas</b>	
Longitud:	78° 40' 59'' W
Latitud:	01° 38' 51'' S

**Fuente:** Estación Meteorológica ESPOCH, 2021

**Realizado por:** Torres N., 2023.

#### 3.2 Materiales y Equipos

##### 3.2.1 Materiales de laboratorio

- Botellas de vidrio de tapa roscable (500 mL y 100 mL)
- Sorbetes y palillos
- Puntas para micropipeta (10 µL, 100 µL y 1000 µL)
- Gradilla para puntas azules
- Papel film
- Jeringas (5 ml)
- Guantes de nitrilo
- Papel toalla

- Cinta masking
- Mascarilla
- Papel aluminio
- Cajas Petri (90 mm )
- Probeta (100 mL y 1000 mL)
- Micropipeta (10  $\mu$ L, 100  $\mu$ L y 1000  $\mu$ L)
- Vasos de precipitación (50 mL y 100 mL)
- Matraz Erlenmeyer (250 mL),
- Cucharas desechables
- Papel toalla
- Fundas plásticas transparentes de polietileno (20 x 30 cm)
- Microtubos (2 mL, 1,5 mL y 200  $\mu$ L)
- Morteros
- Pistilos

### **3.2.2 Equipos de laboratorio**

- Secador de vidrio (SELECTA 200038)
- Balanza de precisión (RADWAG AS220.R2)
- Autoclave (BIOBASE BKQ-B100II)
- Cámara de flujo laminar (OASIS 48)
- Cámara fotográfica (CANNON)
- Micropipeta (Eppendorf)
- Calibrador digital (VERNIER).
- Cámara de flujo laminar vertical (BIOBASE BSC1500IIA2-X)
- Incubadora (MEMMERT UN 30)
- Mechero de Bunsen
- Termobloque (HM100-PRO)
- Centrifuga (EPPENDORF 5424)
- Ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450)
- Microondas (PANASONIC 900W)
- Destilador de agua (BOECO WS 8000)
- Incubadora (J.P. SELECTA 2001249, FISHER)
- Agitador magnético (STABLE TEMP 03407-00)
- Vortex (QILINBEIER QL-901)
- Biospectrofotómetro (EPPENDORF Basic)

- Cuba electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB-SB-710)
- Fuente de poder para electroforesis (FISHER SCIENTIFIC FB300)
- Termociclador (EPPENDORF Vapo.protect)
- Transiluminador UV (FISHER SCIENTIFIC 88A)
- Destilador de agua (BOECO WS 8000)
- Microondas (Panasonic 900w)
- Refrigeradora (Durex).

### 3.2.3 *Reactivos e insumos*

- Agua destilada estéril
- Papa Dextrose Agar al 3.9% (PDA Difco™)
- Nitrógeno líquido
- Master Mix, 2X (Go Taq® Hot Star Green)
- Primers RAPDs (OPA01, OPA02, OPA04)
- Agua ultrapura
- Kit de extracción de ADN (PROMEGA Wizard® Genomic DNA)
- Cloroformo alcohol isoamílico (24:1)
- Isopropanol frío
- Etanol
- Intercalante (Diamond™ Nucleic Acid Dye)
- Tris-Borate-EDTA Buffer (SIGMA)
- 10X BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen)
- DNA Ladder Bench Top 100 kb (PROMEGA)

### 3.2.4 *Material biológico*

Las cepas de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. que fueron utilizadas para el estudio son aislados provenientes de cultivos de pitahaya de la provincia de Pichincha

**Tabla 3-2:** Material genómico para la diversidad

<b>Aislado</b>	<b>Código</b>	<b>Localidad</b>
PRY.1	PVLCE_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica
PGL2.3	PVLCE_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica
MX3.5	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza

MX2.5	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
GN.4	LB_	Los Bancos
GR.10	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
GR.16	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
CS9	PVCIS_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica/El Cisne
GR.4	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
NL.4	PVCIS_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica/El Cisne
PGL2.4	PVLCE_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica
MX3.4	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
GR.14	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
MX3.10	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
MX2.4	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza

---

Realizado por: Torres N., 2023

**Tabla 3-3:** Material biológico para la sensibilidad

Aislado	Código	Localidad
GR.4	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
NL.4	PVCIS_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica/El Cisne
PGL2.4	PVLCE_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica
MX3.4	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
GR.14	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
MX3.10	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
MX2.4	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza

---

Realizado por: Torres N., 2023.

### 3.2.5 *Materiales de oficina*

- Computadora
- Calculadora
- Papel Bond
- Flash memory
- Impresora
- Internet.

- Libreta de apuntes
- Cinta adhesiva
- Estilete
- Hojas de papel bond
- Marcador permanente

### **3.3 Metodología de la investigación**

#### **3.3.1 Operacionalización de las variables**

##### *3.3.1.1 Variables dependientes*

A. Diversidad genética

B. Sensibilidad

##### *3.3.1.2 Variables independientes*

A.1 Aislados de las localidades

A.2 Condiciones climáticas

B.1 Fungicidas Multi- sitio: Sulfato de cobre pentahidratado

B.2 Fungicidas sitio- específicos: Cyprodinil, Difenconazol, Tiofanato de metil, Pyraclostrobin, Tebuconazol, y Tiabendazol.

B.3 Dosis Fungicidas: 0; 0,1; 1; 10; 100 ppm.

#### **3.3.2 Diseño experimental**

Dentro del diseño experimental se tomará en consideración 7 cepas de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl de distintas localidades de Pichincha, las mismas que estuvieron presentes en las dos fases, mientras que para la diversidad se adicionaron 7 aislados de una colección de ADN:

##### *3.3.2.1 Diversidad Genética*

Se calculará el índice de diversidad (De riqueza y de Shannon)

### 3.3.2.2 *Sensibilidad a Fungicidas*

Se utilizará un Diseño completamente al azar (DCA 7 x 6) con tres repeticiones (Fungicidas Multi- sitio y sitio- específico)

-Fungicidas Multi- sitio: Sal de cobre

-Fungicidas sitio- específicos: Cyprodinil, Difenconazol, Tiofanato de metil, Pyraclostrobin, Tebuconazol, y Tiabendazol.

Se utilizaron diferentes dosis de fungicidas para conocer su efecto.

- Dosis Fungicidas: 0; 0,1; 1; 10; 100 ppm.

### 3.3.3 *Análisis funcional*

A aquellos resultados con respuesta significativa, se aplicó un análisis no paramétrico, donde la separación de medias se efectuó mediante el Test de Kruskal Wallis cuando existieron diferencias significativas menores al 5%.

## 3.4 **Manejo del ensayo de diversidad**

### 3.4.1 *Reactivación de las cepas*

En la cámara de flujo laminar, después de la desinfección en autoclave de las cajas Petri y el medio PDA se procedió a colocar en cada caja el medio y dejarlo gelificar, para esta reactivación se empleó medio V8 modificado después de ello se colocó uno o dos discos de las 7 cepas en cada caja, a fin que se reactive y crezcan como cultivo puro.

Cuando las cepas se encontraron reactivadas se procedió con la extracción de ADN siguiendo el protocolo ya dispuesto en el laboratorio de Fitopatología que consta de la lisis nuclear con alcoholes y el empleo de nitrógeno líquido.

### 3.4.2 *Extracción de ADN*



Se colocó aproximadamente 1 g de micelio en un mortero estéril, se adicionó nitrógeno líquido, con el pistilo se maceró hasta obtener un polvo fino, luego con la cuchara estéril se colocó en un microtubo de 2 mL y se guardó a -40 °C.

Seguidamente con el micelio macerado se utilizó el kit de extracción PROMEGA Wizard® Genomic DNA con las siguientes modificaciones del protocolo propuesto por el fabricante. Posteriormente se adicionaron 600 µL de solución de lisis nuclear agitándola en un vortex (QILINBEIER QL-901) por 3 s y después incubándola a 65 °C por 15 minutos, invirtiendo los tubos cada 5 min.

Consecutivamente se adicionaron 200 µL de solución de precipitado de proteínas, luego se llevó a un vortex por 20 s, posteriormente se centrifugó por 10 min a 14000 rpm.

El precipitado de proteínas formó un pellet, seguidamente se transfirió el sobrenadante conteniendo ADN para un nuevo microtubo (2 mL), a continuación, se añadieron 600 µL de cloroformo-alcoholisoamílico (24:1), se agitó en un vortex (QILINBEIER QL-901) por 20 s, luego se centrifugó por 8 min a 14000 rpm y finalmente se transfirió el sobrenadante ( $\pm$  600 µL) conteniendo el ADN para un nuevo microtubo (2 mL).

Luego se adicionaron 600 µL de isopropanol frío mezclando la solución invirtiendo los tubos, después se dejó la solución en el congelador por 10 min y finalmente se centrifugaron los tubos a 14000 rpm por 10 min.

Observando que ha existido la formación del pellet se descartó cuidadosamente el sobrenadante, finalmente se procedió a realizar dos lavados con etanol al 70% frío, en cada lavado se adicionaron 600 µL de etanol al 70% frío y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Luego se descartó el etanol y se dejaron los tubos de forma horizontal con tapa abierta sobre papel toalla para el secado del pellet.

Finalmente, después de aproximadamente 12 h, se resuspendieron los pellets con 50 µL solución Buffer (TE) y 2 µL de RNasa en cada tubo incubando a 37° C por 3 h, luego se almacenó el ADN en el ultracongelador (BIOBASE BDF-40V450) a -20 °C hasta su posterior uso.

Se comprobó en el Bioespectrofotómetro la calidad y cantidad de cada muestra (ANEXO Q)

### 3.4.3 PCR

Para la identificación molecular de los diferentes morfotipos obtenidos se empleó la técnica de la amplificación en cadena del ADN con los iniciadores

**Tabla 3-4:** Primers RAPDs empleados para la diversidad genética

PRIMER RAPDs
OPA-01 (5' CAGGCCCTTC 3')
OPA-02 (5' TGCCGAGCTG 3')
OPA-04 (5' AATCGGGCTG 3')

**Fuente:**( Sangeetha et al,2011)

**Realizado por:** Torres N., 2023.

Para la preparación de PCR se preparó 6,25 µL de Master Mix, 2X Go Taq® Green, 1 µL (1 pmol) primer 1 µL , 2,25 µL de agua ultrapura estéril y 2 µL (ng / µL) de ADN de cada uno de los aislados dando un total de 12,5 µL por cada reacción de PCR.

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador utilizando las siguientes condiciones:

**Tabla 3-5:** Perfil térmico para PCR de marcadores Rapds

Perfil térmico	
Desnaturalización Inicial	95 °C
Tiempo	5 min
Desnaturalización	95 °C
Tiempo	30 s
Ciclos	45
Anelamiento	39 °C
Tiempo	1 min
Extensión	72 °C
Tiempo	2 min
Extensión Final	72 °C
Tiempo	15 min

**Fuente:** (Hong et al.2016)

**Realizado por:** Torres N., 2023.

Los productos de amplificación fueron visualizados mediante electroforesis.

#### **3.4.4 Electroforesis**

El marcaje se realizó con colorante fluorescente de los fragmentos de PCR para cada locus, las muestras se prepararán en placas, y en cada placa se incluyó un control negativo el cual es de agua ultra pura. Posteriormente se empleó el marcador ladder de 100 kb en la electroforesis para determinar los tamaños de los fragmentos marcados con fluorescencia, consecuentemente se identificó si existieron diferencias genéticas entre las cepas.

#### **3.4.5 Análisis de datos de diversidad**

Para el análisis de los datos se empleó el programa informático R interface Rstudio versión 4.2.2, en donde se empleó la librería: library(poppr) la cual sirvió para calcular los índices de riqueza y de Shannon. A demás se emplearon otras librerías como: library(dplyr), library(mmod), library(vegan), library(iNEXT).

### **3.5 Manejo del ensayo de sensibilidad**

#### **3.5.1 Medio utilizado**

El medio de cultivo utilizado para la siembra fue medio PDA sin antibióticos (ANEXO A)

#### **3.5.2 Cálculos para determinar las concentraciones de los fungicidas**

Los cálculos para la obtención de la solución madre se realizaron de acuerdo a la concentración del ingrediente activo de cada fungicida, calculando las concentraciones con las cuales se va trabajar para enmendar el medio de cultivo (100, 10, 1, 0,1, 0,01 ppm) (ANEXO B).

#### **3.5.3 Preparación de la solución stock**

La solución stock se realizará dentro de la cabina de flujo, luego se tomará una pequeña cantidad del fungicida con una micropipeta, siempre que el fungicida sea de forma líquida (si son fungicidas sólidos, se pesó en una balanza analítica), y se colocara en un vaso de precipitación, luego se le agrega el agua destilada estéril faltante hasta completar los 10 mL, que es el volumen de la solución final, finalmente se obtiene la dosis 100 ppm.

**Tabla 3-6:** Concentración del ingrediente activo para la preparación de la solución stock

<b>Ingrediente activo</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Concentración del ingrediente activo</b>
Tiabendazol	Mertect 500 (SC)	500 g/L
Tebuconazol	Stratego® (SC)	430 g/L
Tiofanato de metil	NOVAK®	500 g/L
Pyraclostrobin	Comet®	250 g/L
Sulfato de Cobre	Phyton (SL)	240 g/L
Difenoconazole	Score (250)	250 g/L
Cyprodinil	ESCUDO®	750 g/kg

**Realizado por:** Torres N., 2023.

#### **3.5.4 Enmendado del medio de cultivo**

Para proceder al enmendado del medio, se basó en la metodología de Salazar et al. (2012, p. 57), para lo cual se disolvió 0,918 mL de la solución del fungicida de cada dosis en 45 mL de medio PDA para 3 repeticiones de cada una de las dosis en las que se trabajó (100; 10; 1; 0,1; 0,01ppm), dispensando 15 mL de medio enmendado en cada caja Petri, excepto el control en el que únicamente se dispensó medio sin fungicida.

Posteriormente se irá midiendo el crecimiento del micelio y se tomará registro del mismo.

#### **3.5.5 Siembra de discos de *Lasiodiplodia theobromae***

Se cortaron discos de micelio de *L.theobromae* con ayuda de sorbetes estériles de 5,13 mm de diámetro, mismos que fueron colocados en las cajas Petri con medio de cultivo enmendado, las mismas que fueron etiquetadas, selladas con papel film y llevadas a la incubadora en obscuridad a temperatura  $27\pm 2$  °C hasta que el control llenó la caja por completo.

#### **3.5.6 Variables evaluadas**

### 3.5.6.1 Tasa de Crecimiento Micelial (TCM)

Para la determinación de la TCM de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl. se tomará los datos de crecimiento en base al número de horas y será dividido para el número de días en que el micelio llene la caja totalmente.

$$TCM = \text{Crecimiento de micelio} / \text{Número de días}$$

### 3.5.6.2 Estimación de la dosis efectiva 50 (DE50)

Para la estimación de la dosis efectiva 50 (DE50), de las mediciones del diámetro de la colonia en los ensayos de crecimiento micelial, se usó para calcular el crecimiento o germinación relativa al testigo por cada dosis de fungicida y por cada aislamiento y calculó usando la regresión de los valores de la inhibición de crecimiento micelial versus el log 10 de la concentración de los fungicidas (Bueno et al, 1824; citado en Dialnet, 2018, pp. 185-203).

### 3.5.6.3 Rango de sensibilidad

Para la estimación del rango de sensibilidad se usó dos escalas: la primera correspondió a N. C. Gudmestad, (2019) con la que se evaluó todos los fungicidas tebuconazol, tiabendazol, pyraclostrobin, cyprodinil, tiofanato de metil y difenoconazol ; la segunda correspondió a Liu et,al (2020) con la que se evaluó la sal de cobre

**Tabla 3-7:** Escala de sensibilidad propuesta por Gudmestad (2019)

Sensibilidad	Rango
Muy sensible	<1,0 µg/ml
Sensible	1-5 µg/ml
Moderadamente resistentes	5-20 µg/ml
Resistencia alta	20-100 µg/ml
Muy alta resistencia	> 500 µg / ml

Realizado por: Torres N., 2023.

**Tabla 3-8:** Escala de sensibilidad propuesta por Liu (2020)

<b>Sensibilidad</b>	<b>Rango</b>
Muy sensible	<10 µg/ml
Sensible	10-20 µg/ml
Moderadamente resistentes	20-100 µg/ml
Resistencia alta	100-500 µg/ml
Muy alta resistencia	> 500 µg / ml

**Realizado por:** Torres N., 2023.

### 3.5.7 *Análisis de datos de sensibilidad*

Para el análisis de los datos se empleó el programa informático R interface Rstudio versión 4.2.2, en donde se empleó la librería: `library(ec50estimator)` la cual sirvió para calcular la dosis efectiva 50 o DE<sub>50</sub> de cada uno de los fungicidas empleados. Además, se emplearon otras librerías como: `library(readxl)`, `library(ggplot2)`, `library(drc)`, `library(magrittr)`, `library(cowplot)`, `library(gggridges)`, `library(agricolae)` y otras más.

#### 3.5.7.1 *Diagrama de caja y bigote (box-plot)*

Los diagramas de caja y bigote ayudaron a la observación gráfica de los resultados obtenidos en el análisis cuantitativo de inhibición como fueron la TCM y dosis efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) en cada una de las concentraciones estudiadas.

#### 3.5.7.2 *Diagrama barras*

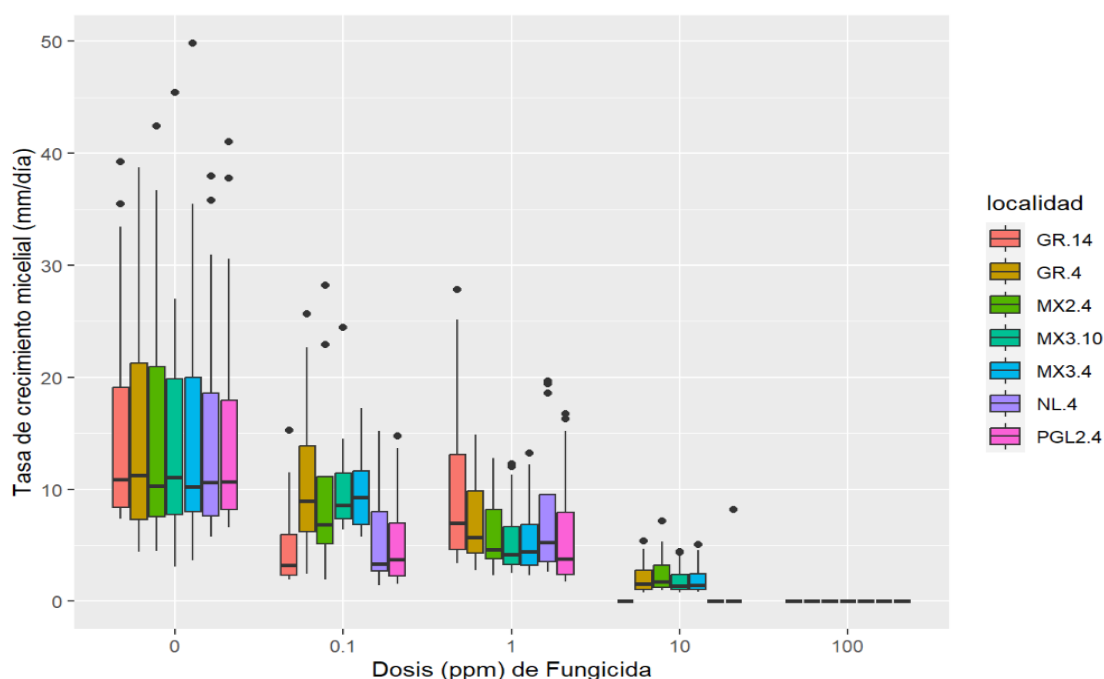
Los diagramas barras permitieron la visualización de los rangos que estaban ubicados los aislados con respecto a cada principio activo, permitiendo clasificarlos en un rango de sensibilidad

## CAPÍTULO IV

### 4. MARCO DE ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

#### 4.1 Procesamiento, análisis e interpretación de resultados de sensibilidad

##### 4.1.1 Tasa de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de tiabendazol.



**Ilustración 1-4:** TCM de *L. theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con tiabendazol en diferentes dosis

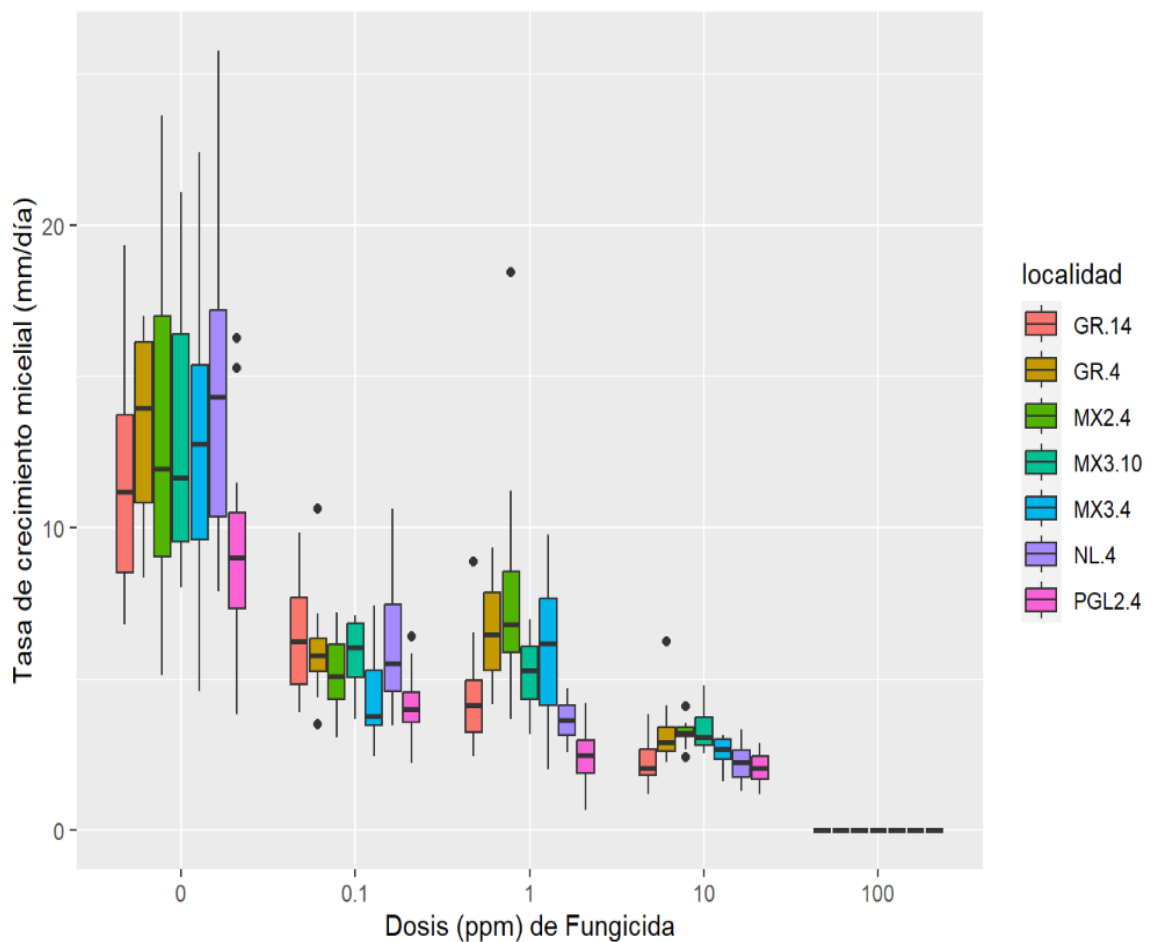
**Tabla 4-1:** Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de *L.theobromae* enmendado con tiabendazol

Cepa	% de inhibición del crecimiento			
	0,1	1	10	100
<b>GR.4</b>	30	55	86	100
<b>MX2.4</b>	41	61	83	100
<b>MX3.10</b>	31	62	87	100
<b>MX3.4</b>	38	63	87	100
<b>PGL2.4</b>	65	60	96	100
<b>NL.4</b>	63	49	100	100
<b>GR.14</b>	68	34	100	100

Realizado por: Torres N., 2023.

La TCM de las cepas de *Lasiodiplodia theobromae* fue inhibida en un 100% para todos los aislados en la dosis de 100 ppm. En cuanto a la dosis de 10 ppm el crecimiento fue inhibido en un 100 % para los aislados de las localidades 15 de mayo (GR.14) y El Cisne (NL.4) seguido de la localidad La Celica (PGL2.4) que inhibió el crecimiento en un 96%, sin embargo, los aislados de las localidades 15 de mayo (GR.4) y Bonanza (MX2.4, MX3.10 y MX3.4) presentaron la mayor tasa de crecimiento con un porcentaje promedio de inhibición del 86% con respecto al control en la dosis mencionada anteriormente. Para la dosis de 1 ppm se inhibió el crecimiento en un promedio del 55% con respecto al control. Finalmente, los aislados en la dosis de 0,1 ppm de las localidades 15 de mayo, El Cisne y La Celica (GR.14, NL.4 y PGL2.4) se mostraron más sensibles que el resto de los aislados ya que presentaron inhibición de la TCM en un promedio del 65%.

**4.1.2 Tasa de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de tebuconazol**



**Ilustración 2-4:** TCM de *L. theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con tebuconazol en diferentes dosis.



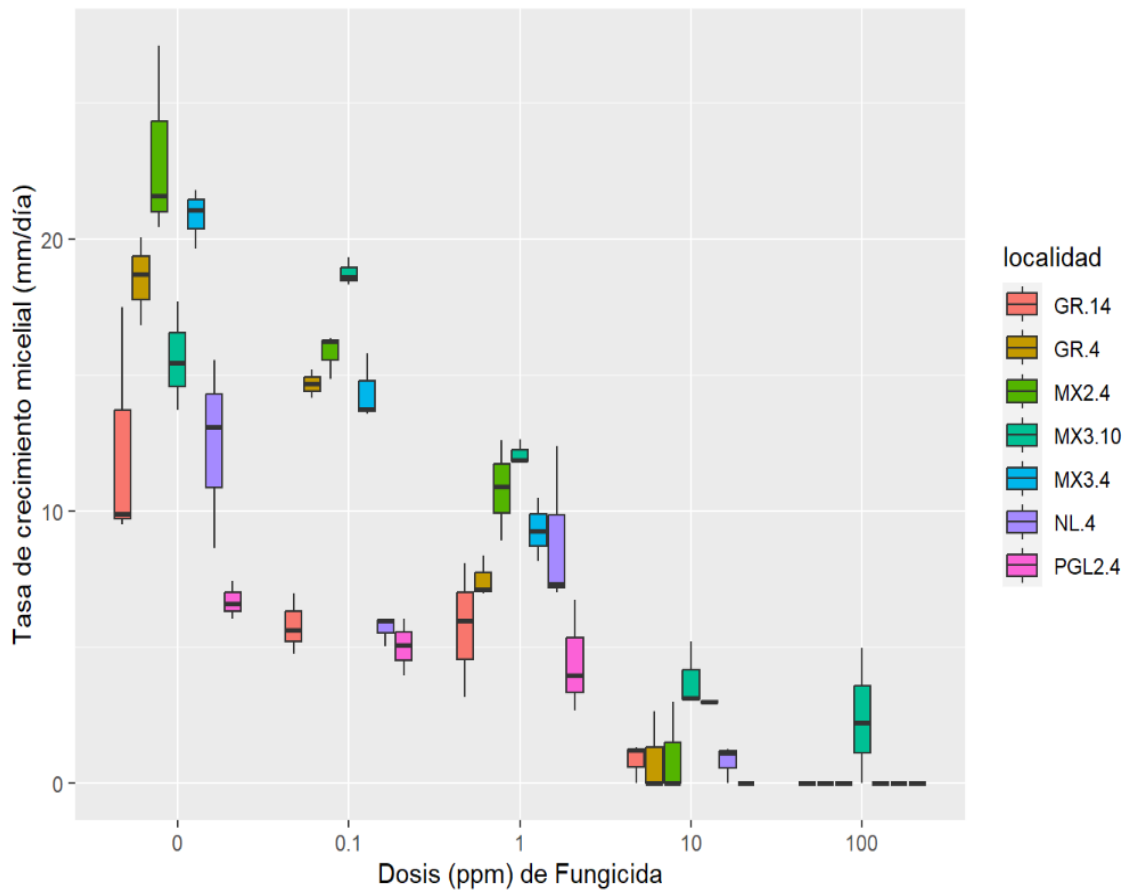
**Tabla 4-2:** Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de *L.theobromae* enmendado con tebuconazol

Cepa	% de inhibición del crecimiento			
	0,1	1	10	100
<b>GR.4</b>	56	52	76	100
<b>MX2.4</b>	61	41	76	100
<b>MX3.10</b>	56	61	75	100
<b>MX3.4</b>	66	55	80	100
<b>PGL2.4</b>	56	74	78	100
<b>NL.4</b>	57	75	84	100
<b>GR.14</b>	44	61	80	100

Realizado por: Torres N., 2023.

Las TCM de todos los aislados de *L.theobromae* fue inhibida en un 100% a una dosis de 100 ppm; Mientras que, para la dosis de 10 ppm la TCM fue inhibida en promedio en un 81% para las localidades 15 de mayo, El Cisne y La Celica (GR.14, NL.4 y PGL2.4) al contrario de la localidad Bonanza (MX3.10) que presentó una mayor TCM a esa misma dosis puesto que solo inhibió un 75%. Para la dosis 1 ppm se inhibió el crecimiento de los aislados en un 60% con respecto al control. Por otra parte la TCM a una dosis de 0,1 ppm fue mayor para el aislado de la localidad 15 de mayo (GR.14) que inhibió un 44% del crecimiento y menor para los aislados de las localidades Bonanza y La Celica (MX3.4 y PGL2.4) que presentaron un porcentaje de inhibición del 61% en consideración a sus medias respectivamente. Los aislados de la dosis de 10 ppm presentaron una tasa de crecimiento menor a las de las dosis 0,1 ppm y 1 ppm, inhibiendo el crecimiento de forma significativa en relación con el control con un promedio del 78%.

**4.1.3 Tasa de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de tiofanato de metil.**



**Ilustración 3-4:** TCM de *L. theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con tiofanato de metil en diferentes dosis.

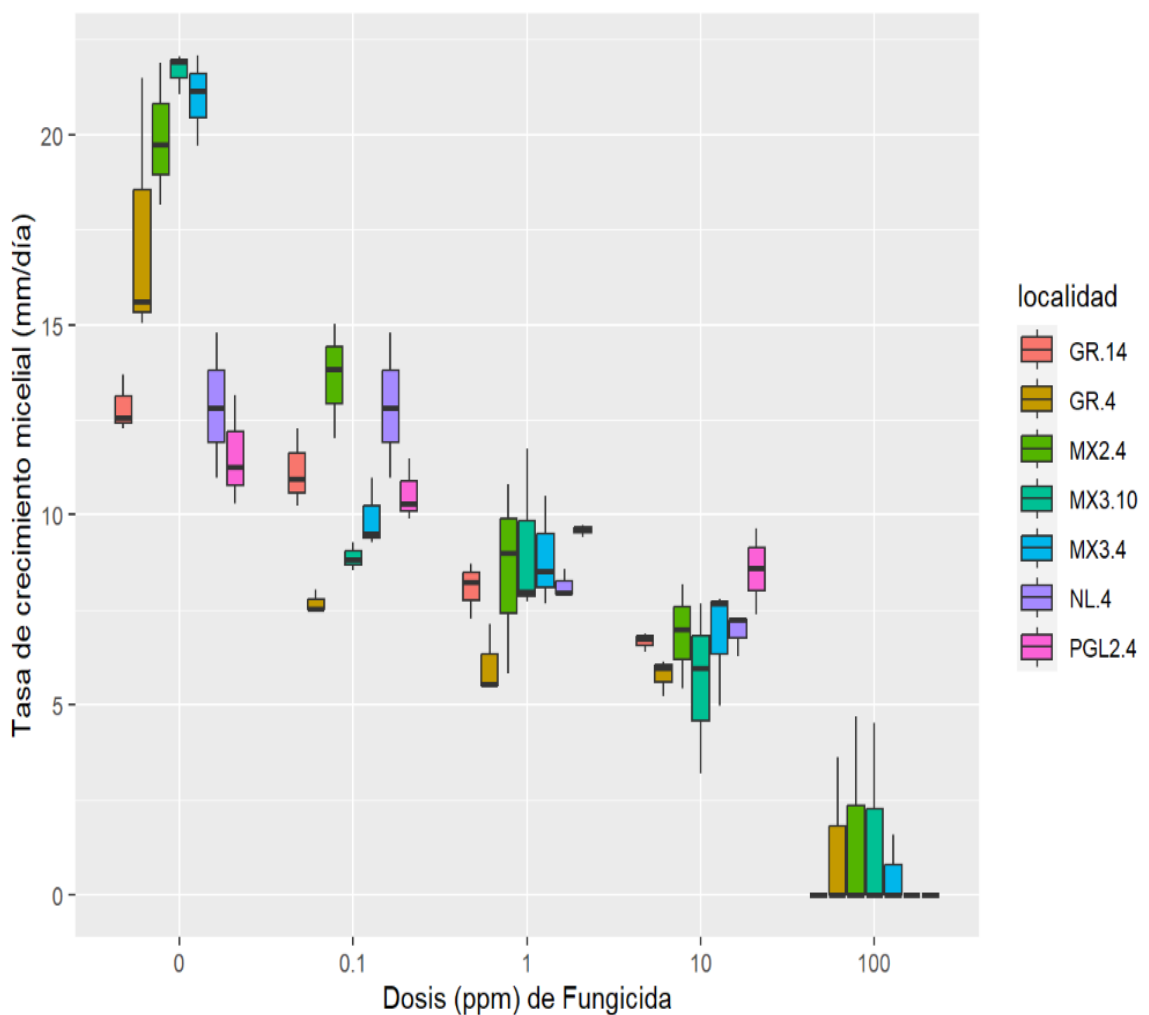
**Tabla 4-3:** Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de *L.theobromae* enmendado con tiofanato de metil

Cepa	% de inhibición del crecimiento			
	0,1	1	10	100
<b>GR.4</b>	21	60	95	100
<b>MX2.4</b>	31	53	96	100
<b>MX3.10</b>	20	23	76	85
<b>MX3.4</b>	31	55	86	100
<b>PGL2.4</b>	25	33	100	100
<b>NL.4</b>	54	28	94	100
<b>GR.14</b>	53	53	93	100

Realizado por: Torres N., 2023.

La TCM para la dosis de 100 ppm fue inhibida para todos los aislados en un 100% excepto el de la localidad Bonanza (MX3.10) que presentó un porcentaje de inhibición del 85%, consecuentemente para dosis de 10 ppm el mismo aislado de la localidad Bonanza (MX3.10) presentó una TCM mayor debido a que el porcentaje de inhibición fue de un 76% al contrario de la cepa de la localidad La Celica (PGL2.4) cuya TCM se inhibió en un 100%. Para la dosis 0,1 ppm la cepa de la localidad Bonanza (MX3.10) presentó nuevamente la mayor TCM con respecto a todas las demás localidades ya que inhibió el crecimiento en un 20% con relación al control, mientras que las cepas de las localidades 15 de mayo y el Cisne (GR.14 y NL.4 ) presentaron una TCM menor, ya que se inhibió el crecimiento en un promedio del 54% .

**4.1.4 Tasa de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de difenoconazol.**



**Ilustración 4-4:** TCM de *L. theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con difenoconazol en diferentes dosis

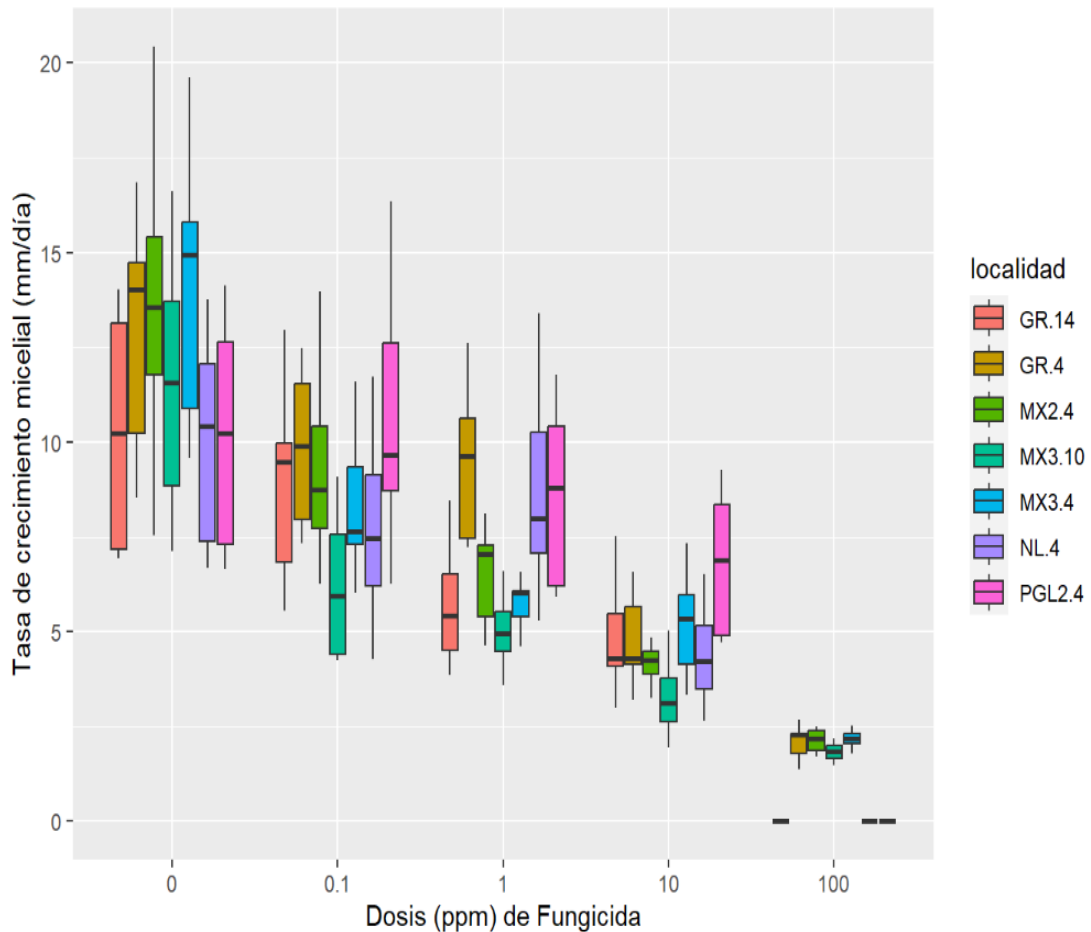
**Tabla 4-4:** Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de *L.theobromae* enmendado con difenoconazol

Cepa	% de inhibición del crecimiento			
	0,1	1	10	100
<b>GR.4</b>	56	65	67	93
<b>MX2.4</b>	32	57	66	92
<b>MX3.10</b>	59	58	74	93
<b>MX3.4</b>	53	58	68	97
<b>PGL2.4</b>	9	17	26	100
<b>NL.4</b>	0	37	46	100
<b>GR.14</b>	13	37	48	100

**Realizado por:** Torres N., 2023.

La TCM para la dosis de 100 ppm fue mayor en la cepas de las localidades 15 de mayo y Bonanza (GR.4, MX2.4, MX3.10 y MX3.4) con un promedio de inhibición del 94% , mientras que para las demás cepas se inhibió el 100% del crecimiento a esa misma dosis. Para la dosis 10 ppm el aislado de la localidad La Celica (PGL2.4) fue el mas resistente ya que su crecimiento fue inhibido en un 26% , por otra parte los aislados de las localidades 15 de mayo y Bonanza (GR.4, MX2.4, MX3.10 y MX3.4) fueron los mas sensibles ya que presentaron un porcentaje promedio de inhibicion del 68%. Para la dosis 1 ppm la cepa de la localidad La Celica (PGL2.4) presentó la mayor TCM ya que el porcentaje de inhibición fue del 17%, mientras que la cepa 15 de mayo (GR.4) presentó la menor inhibiendo el crecimiento en un 65%. Para la dosis 0,1 ppm la menor TCM la tuvo el aislado de la localidad Bonanza (MX3,10) inhibiendo un 59%, y la menor TCM la presentó el aislado de la localidad el Cisne que no inhibio el crecimiento en lo absoluto (NL.4).

**4.1.5 Tasa de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de pyraclostrobin.**



**Ilustración 5-4:** TCM de *L. theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con pyralostrobin en diferentes dosis

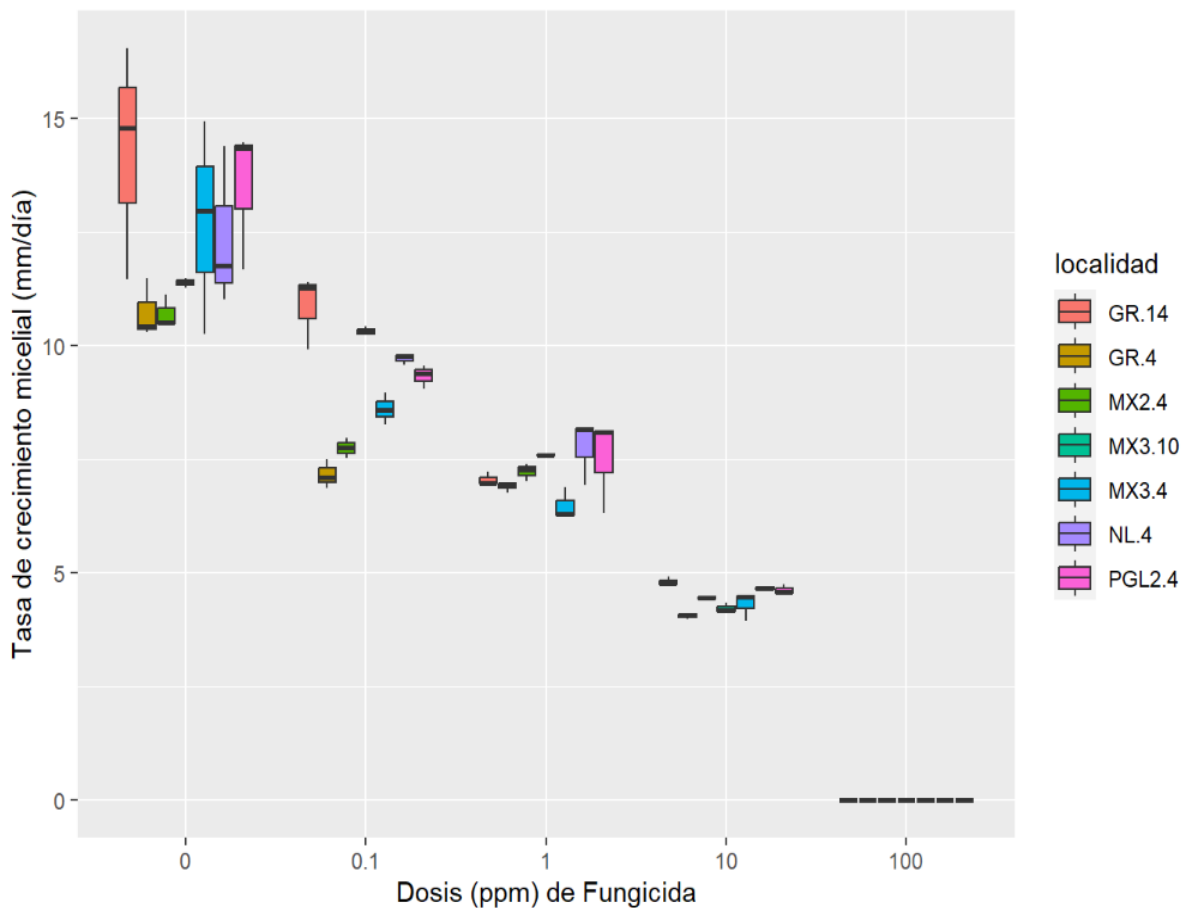
**Tabla 4-5:** Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de *L.theobromae* enmendado con pyraclostrobin

Cepa	% de inhibición del crecimiento			
	0,1	1	10	100
<b>GR.4</b>	23	26	62	84
<b>MX2.4</b>	34	52	70	84
<b>MX3.10</b>	45	56	71	84
<b>MX3.4</b>	42	58	63	84
<b>PGL2.4</b>	1	16	33	100
<b>NL.4</b>	21	14	58	100
<b>GR.14</b>	12	45	54	100

Realizado por: Torres N., 2023.

La TCM de *L.theobromae* en la dosis de 100ppm inhibió el crecimiento de las cepas de las localidades 15 de mayo, El Cisne, La Celica (GR.14, NL4 Y PGL2.4) en un 100% y para las cepas las demas localidades en un 84% con respecto al control . Por otra parte la dosis de 10 ppm inhibió el crecimiento de los aislados de las localidades Bonanza (MX2.4, MX3.10) en un promedio del 70%, mientras que el aislado de la localidad La Celica (PGL2.4) fue el que obtuvo la mayor TCM con un 33% de inhibición. Para la dosis 1 ppm la mayor tasa de crecimiento correspondió a la cepa de la localidad El Cisne (NL.4) con un 14% de inhibicion de crecimiento, mientras que la menor correspondió a la cepa de la localidad Bonanza (MX3.4) en un 58%. La cepa de la localidad La Celica (PGL2.4) a la dosis de 0,1 ppm tuvo la mayor TCM que las demás cepas con un porcentaje de inhibición del 1%, mientras que la menor TCM a la misma dosis la presentó el aislado de la localidad Bonanza (MX 3.10) inhibiendo un 45% del crecimiento.

**4.1.6 Tasa de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de sulfato de cobre pentahidratado**



**Ilustración 6-4:** TCM de *L. theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con sulfato de cobre pentahidratado en diferentes dosis

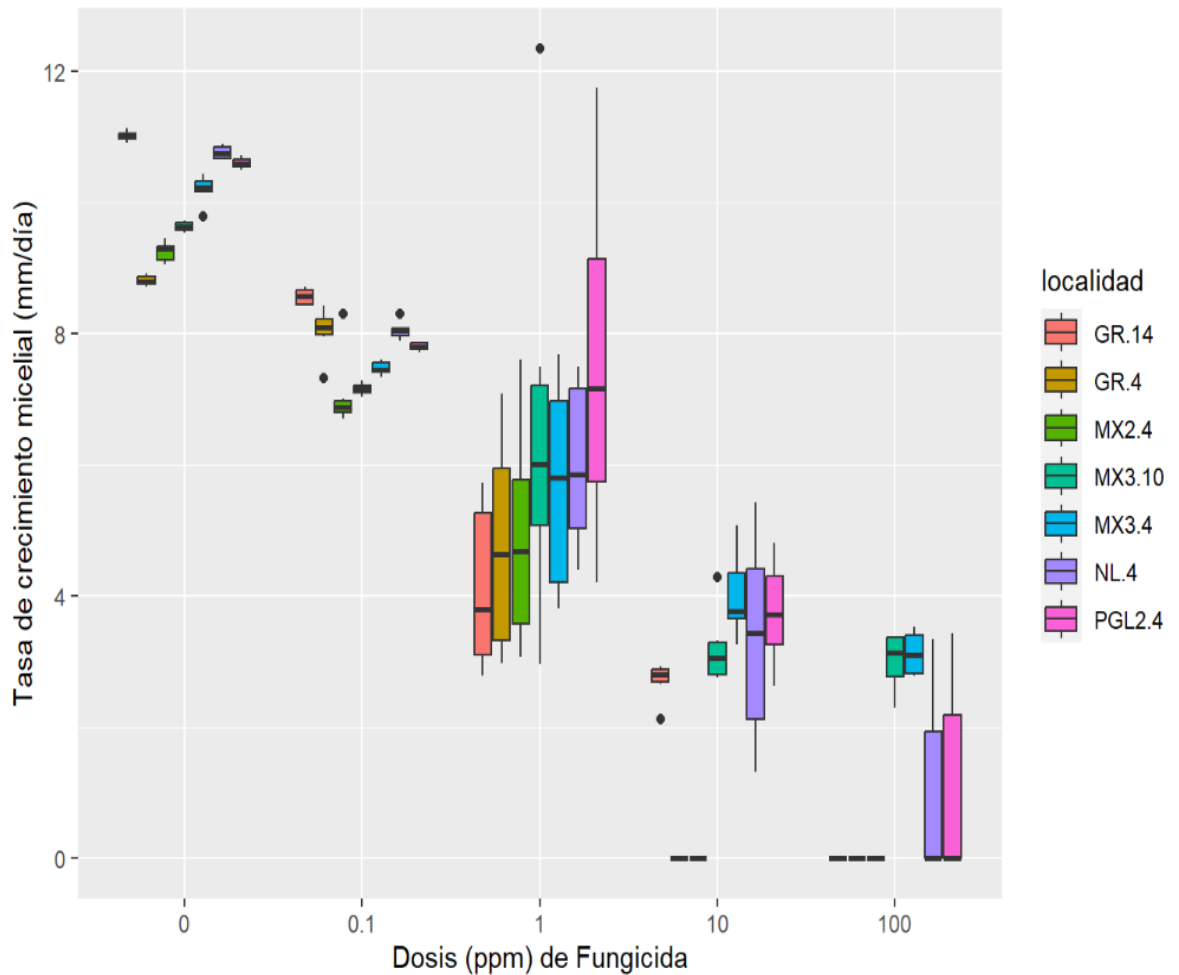
**Tabla 4-6:** Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de *L.theobromae* enmendado con sulfato de cobre pentahidratado

Cepa	% de inhibición del crecimiento			
	0,1	1	10	100
<b>GR.4</b>	33	36	62	100
<b>MX2.4</b>	28	32	58	100
<b>MX3.10</b>	5	33	63	100
<b>MX3.4</b>	32	49	66	100
<b>PGL2.4</b>	31	44	66	100
<b>NL.4</b>	22	37	62	100
<b>GR.14</b>	24	51	66	100

Realizado por: Torres N., 2023.

La TCM fue inhibida en un 100% para todos los aislados a una dosis de 100 ppm. Sin embargo para la dosis de 10 ppm el crecimiento fue inhibido en un 63% con relación al control, por otra parte para la localidad Bonanza (MX2.4) la tasa de crecimiento fue mayor que los demás aislados ya que inhibió un 58% del crecimiento. Para la dosis de 1ppm la menor TCM la presentaron los aislados de las localidades 15 de Mayo y Bonanza (GR.14 y MX3.4) con un porcentaje de inhibición de 51 % y 49% respectivamente, mientras que la mayor TCM correspondió a la cepa de la localidad Bonanza (MX2.4) con un porcentaje de inhibición de 32%. Para la dosis 0,1ppm, la mayor TCM fue presentado por el aislado de la localidad Bonanza (MX3.10) con un 5% de inhibición de crecimiento y la menor fue presentado por otro aislado de la localidad 15 de mayo (GR.4) con un 33% de inhibición.

**4.1.7 Tasa de crecimiento micelial de *Lasiodiplodia theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en PDA enmendado con diferentes dosis de cyprodinil**



**Ilustración 7-4:** TCM de *L. theobromae* (obtenida de diferentes localidades) en medio PDA enmendado con cyprodinil en diferentes dosis

**Tabla 4-7:** Porcentaje de inhibición de crecimiento de los aislados de *L.theobromae* enmendado con cyprodinil

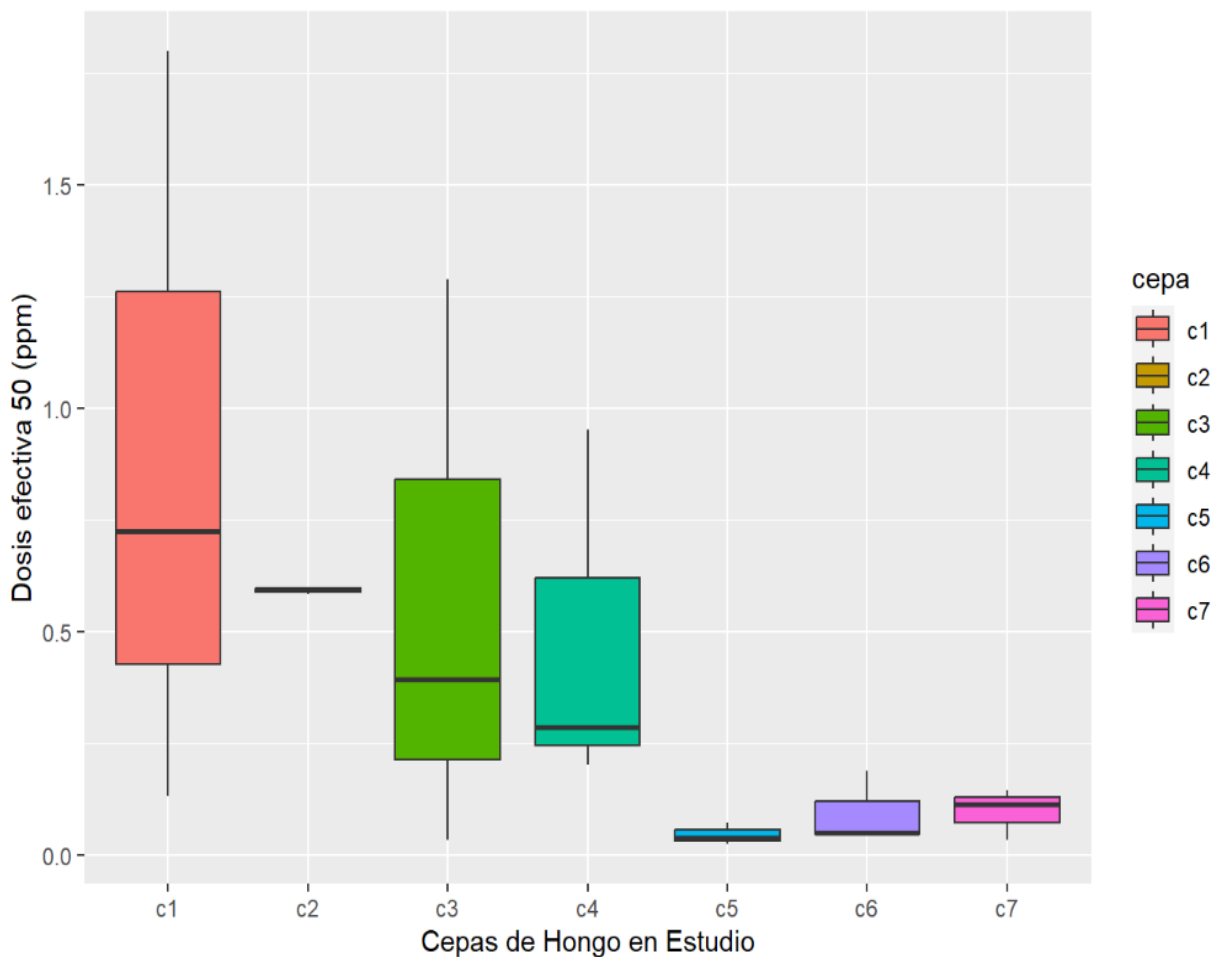
Cepa	% de inhibición del crecimiento			
	0,1	1	10	100
<b>GR.4</b>	9	46	100	100
<b>MX2.4</b>	23	47	100	100
<b>MX3.10</b>	26	31	67	69
<b>MX3.4</b>	27	44	61	69
<b>PGL2.4</b>	26	29	65	90
<b>NL.4</b>	25	44	69	91
<b>GR.14</b>	22	63	76	100

Realizado por: Torres N., 2023.



La TCM para la dosis 100 ppm fue mayor en las cepas de las localidades Bonanza en un 69% de inhibición (MX3.4 y MX3.10), de igual manera para las cepas El Cisne, 15 de Mayo en un promedio del 90% (NL.4 y PGL2.4), sin embargo el crecimiento fue inhibido totalmente para las cepas de las localidades 15 de mayo y Bonanza (GR.14, GR.4 y MX2.4) en un 100%. Para la dosis 10 ppm el crecimiento fue mayor para la cepa de la localidad Bonanza (MX3.4) inhibiendo el crecimiento en un 61% y menor en los aislados de las localidades 15 de mayo y Bonanza (GR.4 y MX2.4) con una inhibición del crecimiento del 100%. Para la dosis 1 ppm la TCM fue mayor en el aislado de la localidad La Celica (PGL2.4) ya que solo se inhibió un 29% del crecimiento y menor para otro aislado de la localidad Bonanza (MX2.4) que inhibió un 46% del crecimiento. Por otra parte para la dosis 0,1 ppm la mayor TCM correspondió a la cepa de la localidad 15 de mayo (GR.4) con un porcentaje de inhibición del 9% y la menor corresponde a la cepa de la localidad Bonanza (MX3.4) en un 27%.

**4.1.8 Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de tiabendazol para diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.**



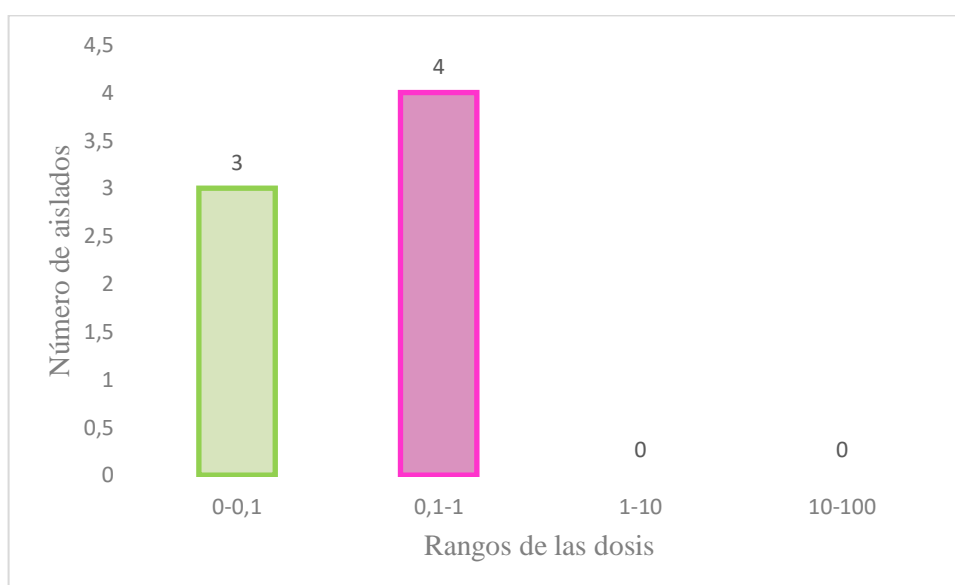
**Ilustración 8-4:** DE<sub>50</sub> de tiabendazol para diferentes cepas de *L.theobromae* de diferentes localidades

**Tabla 4-8:** Test de Kruskal Wallis 5% de la DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con tiabendazol

Cepa	Media (ppm)	Grupo <sup>1</sup>
C1	0,89	a
C2	0,59	a
C3	0,57	ab
C4	0,48	ab
C7	0,10	ab
C6	0,10	ab
C5	0,05	b

<sup>1</sup>Letras iguales denotan medidas que no son significativamente diferentes estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis

Realizado por: Torres N., 2023.

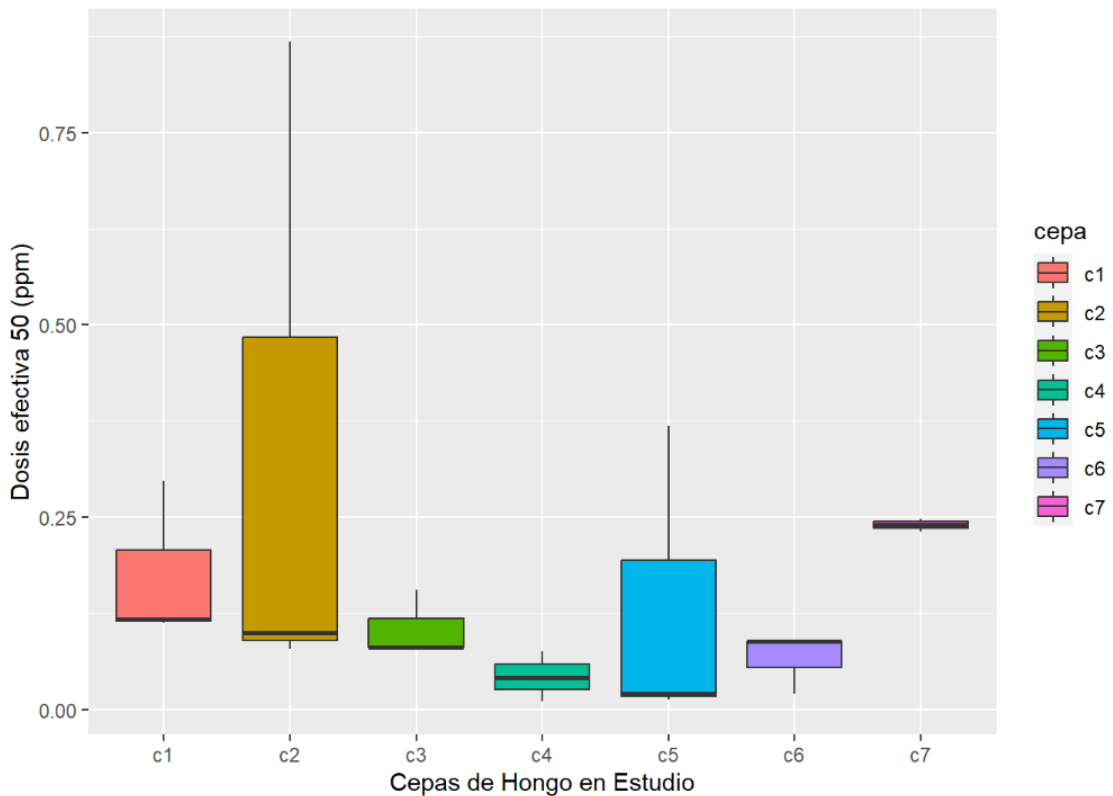


**Ilustración 9-4:** Frecuencia de los aislados de *L.theobromae* en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) estimadas para el principio activo tiabendazol

De acuerdo al test de Kruskal Wallis al 5% la DE<sub>50</sub> de los aislados para el principio tiabendazol fueron significativamente diferentes, dividiéndose en dos grupos a y b (Tabla 4-8). Con relación al principio activo tiabendazol la cepa 1 de *L. theobromae* correspondiente a la localidad 15 de Mayo presentó la mayor DE<sub>50</sub> equivalente a 0,89 ppm (Ilustración 8-4), sin embargo la cepa 5 correspondiente a la localidad La Celica presentó la menor DE<sub>50</sub> equivalente a 0,5 ppm. Los datos de la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se agruparon en dos rangos, el primer rango correspondió a 4 aislados de *L.theobromae* que presentaron sensibilidad a la dosis entre 0,1-1 ppm y otro grupo con 3 aislados de *L.theobromae* cuya sensibilidad se presentó a la dosis entre 0-0,1ppm; Para este ensayo no hubo Dosis Efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) cuyos rangos sobrepasaran el 1 ppm, por dicha razón

la sensibilidad de *L.theobromae* con relación al principio activo empleado es afectada entre rangos de 0-1 ppm (Ilustración 9-4).

**4.1.9 Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de tebuconazol para diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.**



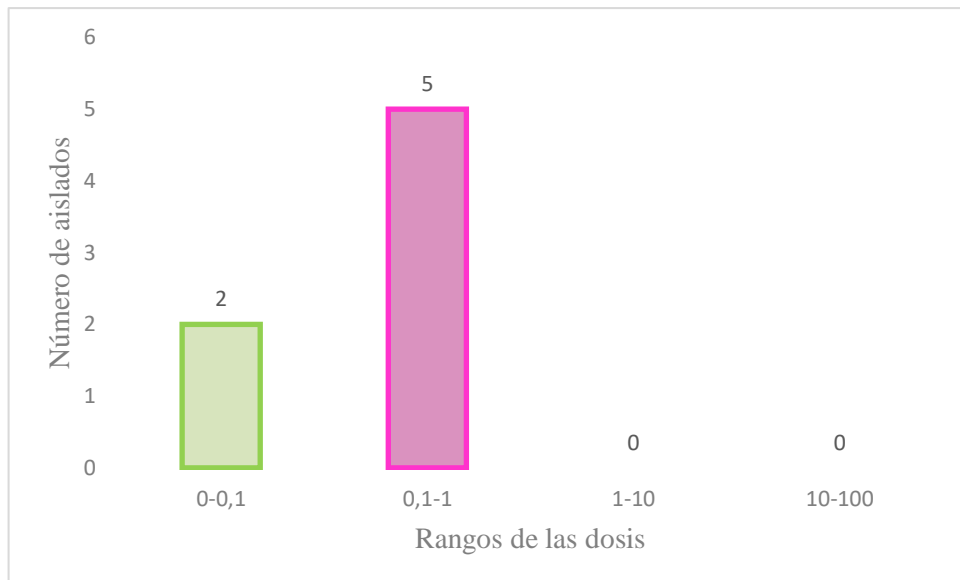
**Ilustración 10-4:** DE<sub>50</sub> de tebuconazol para diferentes cepas de *L.theobromae* de diferentes localidades

**Tabla 4-9:** Test de Kruskal Wallis 5% de la DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con tebuconazol.

Cepa	Media (ppm)	Grupo <sup>1</sup>
<b>C2</b>	0,35	a
<b>C7</b>	0,24	a
<b>C1</b>	0,18	a
<b>C5</b>	0,13	ab
<b>C3</b>	0,11	ab
<b>C6</b>	0,07	ab
<b>C4</b>	0,04	b

<sup>1</sup>Letras iguales denotan medidas que no son significativamente diferentes estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis

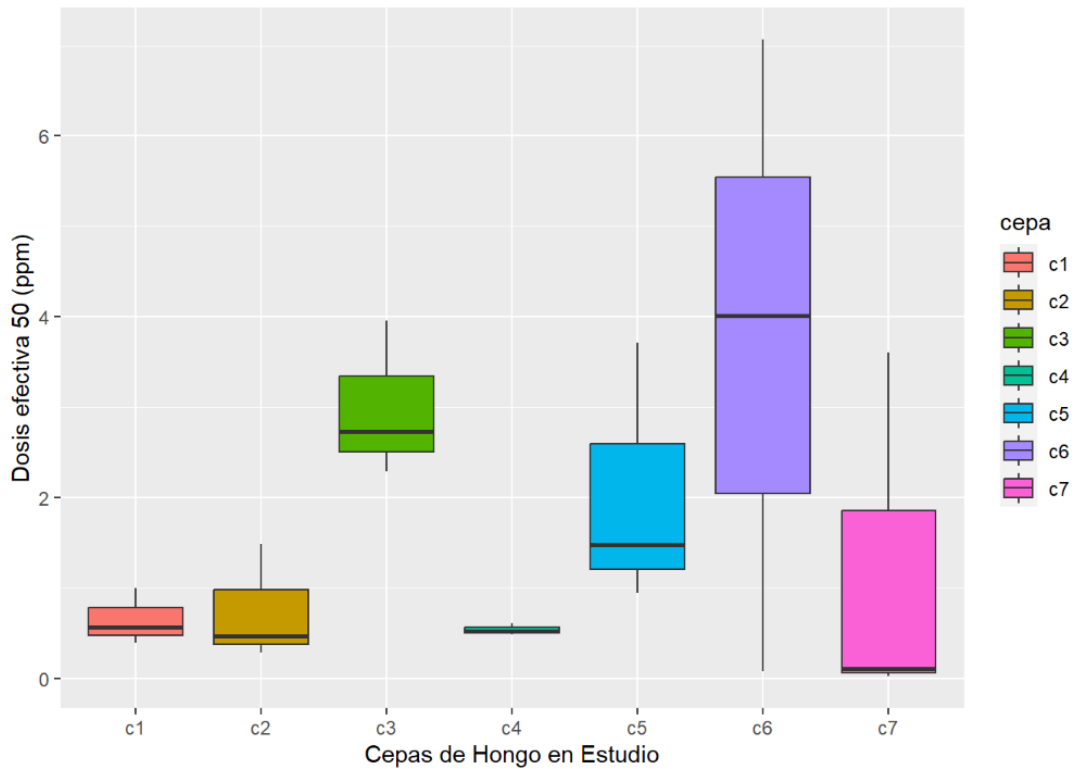
Realizado por: Torres N., 2023.



**Ilustración 11-4:** Frecuencia de los aislados de *L.theobromae* en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) estimadas para el principio activo tebuconazol

De acuerdo al test de Kruskal Wallis al 5% % la DE<sub>50</sub> de los aislados para el principio tebuconazol fueron significativamente diferentes, dividiéndose en dos grupos a y b (Tabla 4-9). Con relación al principio activo tebuconazol cepa 2 de *L. theobromae* correspondiente a la localidad Bonanza presentó la mayor DE<sub>50</sub> con un valor de 0,35 ppm (Ilustración 10-4), por otra parte, la cepa 4 correspondiente también a la localidad Bonanza presentó la menor DE<sub>50</sub> con un valor de 0,04 ppm (Ilustración 10-4). Los datos de la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se agruparon en dos rangos, el primer rango correspondió a 5 aislados de *L.theobromae* que presentaron sensibilidad a la dosis entre 0,1-1ppm y otro grupo con 2 aislados de *L.theobromae* cuya sensibilidad se presentó a la dosis entre 0-0,1ppm; Para este ensayo no hubieron Dosis Efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) cuyos rangos sobrepasaran los 10 ppm. Por dicha razón la sensibilidad de *L.theobromae* con relación al principio activo empleado es afectada entre rangos de 0-1 ppm (Ilustración 11-4).

**4.1.10 Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de tiofanato de metil para diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.**



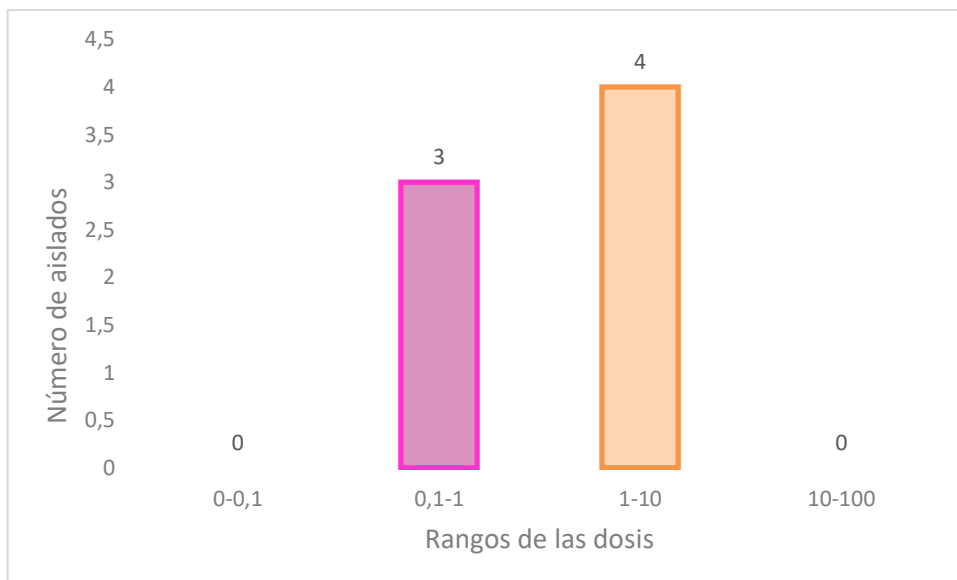
**Ilustración 12-4:** DE<sub>50</sub> de tiofanato de metil para diferentes cepas de *L.theobromae* de diferentes localidades

**Tabla 4-10:** Test de Kruskal Wallis 5% de la DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con Tiofanato de metil.

Cepa	Media (ppm)	Grupo <sup>1</sup>
C6	3,72	a
C3	2,99	a
C5	2,04	a
C7	1,24	a
C2	0,75	a
C1	0,65	a
C4	0,54	a

<sup>1</sup>Letras iguales denotan medidas que no son significativamente diferentes estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis

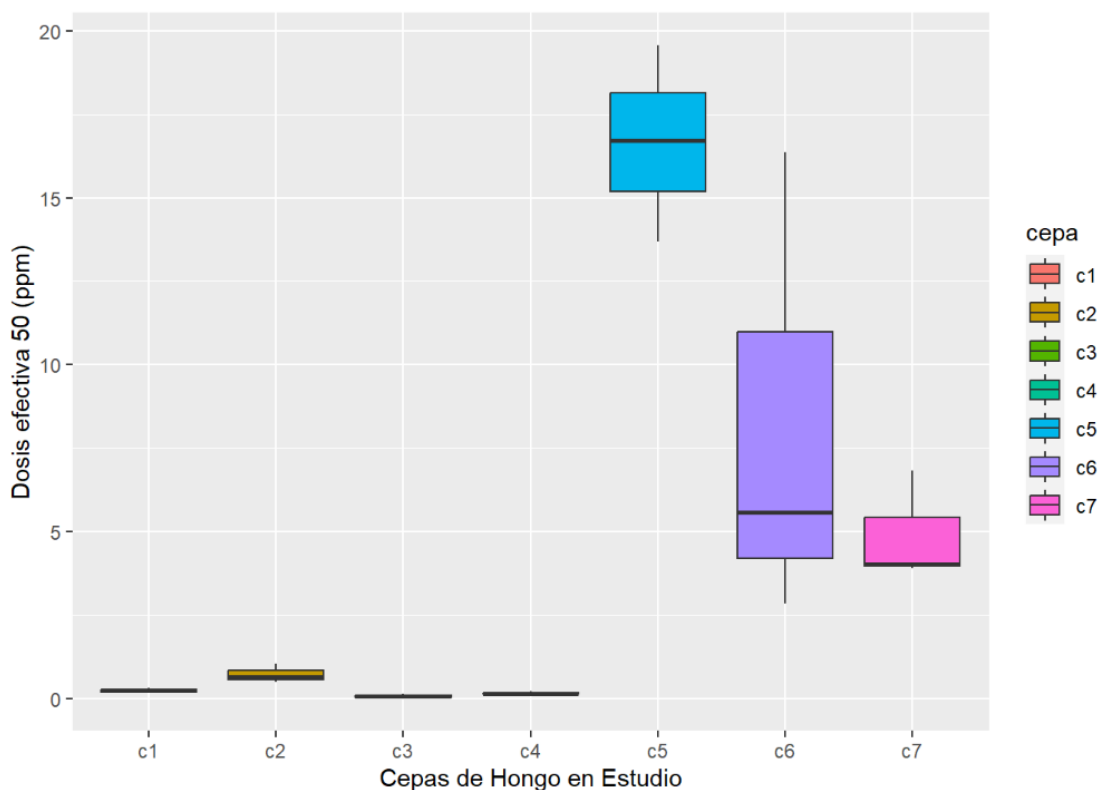
Realizado por: Torres N., 2023.



**Ilustración 13-4:** Frecuencia de los aislados de *L.theobromae* en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) estimadas para el principio activo tiofanato de metil

De acuerdo al test de Kuskal Wallis al 5 % las medias no fueron significativamente diferentes ya que los aislados se mantuvieron en un solo grupo a (Tabla 4-10). La cepa 6 de *L. theobromae* correspondiente al aislado de la localidad el Cisne presentó la mayor DE<sub>50</sub> con el valor de 3,72 ppm (Ilustración 12-4). Por otro lado, la cepa 4 correspondiente a la localidad Bonanza presentó la menor DE<sub>50</sub> con el valor de 0,54 ppm (Ilustración 12-4). Los datos de la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se agruparon en dos rangos, el primer rango correspondió a 4 aislados de *L.theobromae* que presentaron sensibilidad a la dosis entre 1-10 ppm y otro grupo con 3 aislados de *L.theobromae* cuya sensibilidad se presentó a la dosis entre 0,1-1ppm; Para este ensayo no hubieron Dosis Efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) cuyos rangos sobrepasaran los 10 ppm, pero tampoco que fueran menores a 0,01 ppm (Ilustración 13-4).

**4.1.11 Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de difenoconazol para diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.**



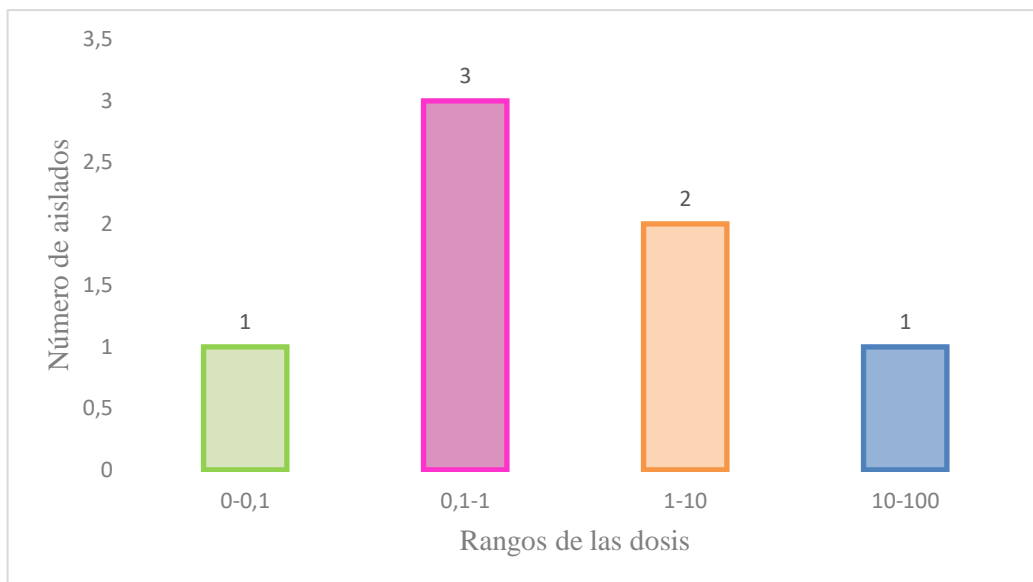
**Ilustración 14-4:** DE<sub>50</sub> de difenoconazol para diferentes cepas de *L.theobromae* de diferentes localidades

**Tabla 4-11:** Test de Kruskal Wallis 5% de la DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con difenoconazol.

Cepa	Media (ppm)	Grupo <sup>1</sup>
C5	16,65	a
C6	8,26	b
C7	4,92	b
C2	0,72	c
C1	0,24	cd
C4	0,16	de
C3	0,07	e

<sup>1</sup>Letras iguales denotan medidas que no son significativamente diferentes estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis

Realizado por: Torres N., 2023.

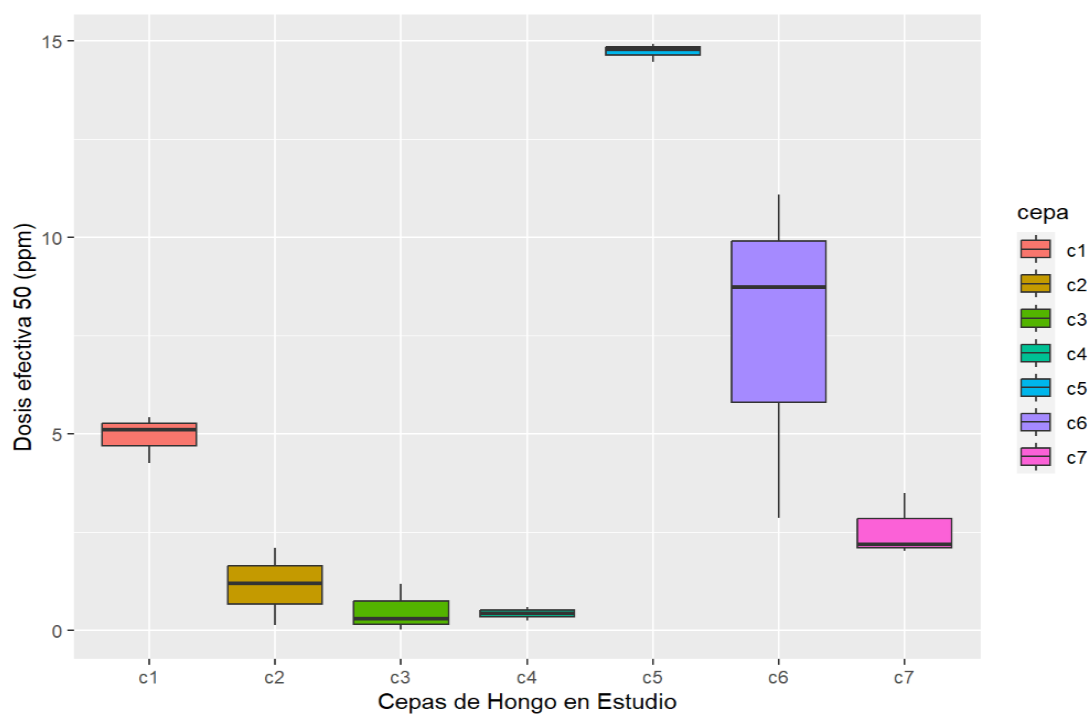


**Ilustración 15-4:** Frecuencia de los aislados de *L.theobromae* en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) estimadas para el principio activo difenoconazol

Los aislados de acuerdo al test de Kruskal Wallis fueron significativamente diferentes, formando cinco grupos a, b, c, d y e (Tabla 4-11). Con respecto al principio activo difenoconazol la cepa c5 de *L. theobromae* correspondiente al aislado de la localidad La Celica presentó la mayor DE<sub>50</sub> con un valor de 16,65 ppm (Ilustración 14-4). Por otro lado, la cepa c3 que corresponde al aislado de la localidad Bonanza presentó la menor DE<sub>50</sub> con un valor de 0,07 (Ilustración 14-4). Los datos de la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se agruparon en cuatro rangos, el primer rango correspondió a un aislado que presentó sensibilidad a una dosis entre 10-100 ppm, posteriormente 2 aislados de *L.theobromae* que presentaron sensibilidad a la dosis entre 1-10 ppm y otro grupo con 3 aislados de *L.theobromae* cuya sensibilidad se presentó a la dosis entre 0,1-1 ppm y finalmente un aislado que presentó sensibilidad a una dosis entre 0-0,1 ppm. Para este hubieron Dosis Efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) cuyos rangos sobrepasaron los 10 ppm, pero también menores a 0,01 ppm. Esta estadística puede inferir que el microorganismo presentó frente al principio activo, un aislado con sensibilidad y con otro aislado resistencia (Ilustración 15-4).



**4.1.12 Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de pyraclostrobin para diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.**



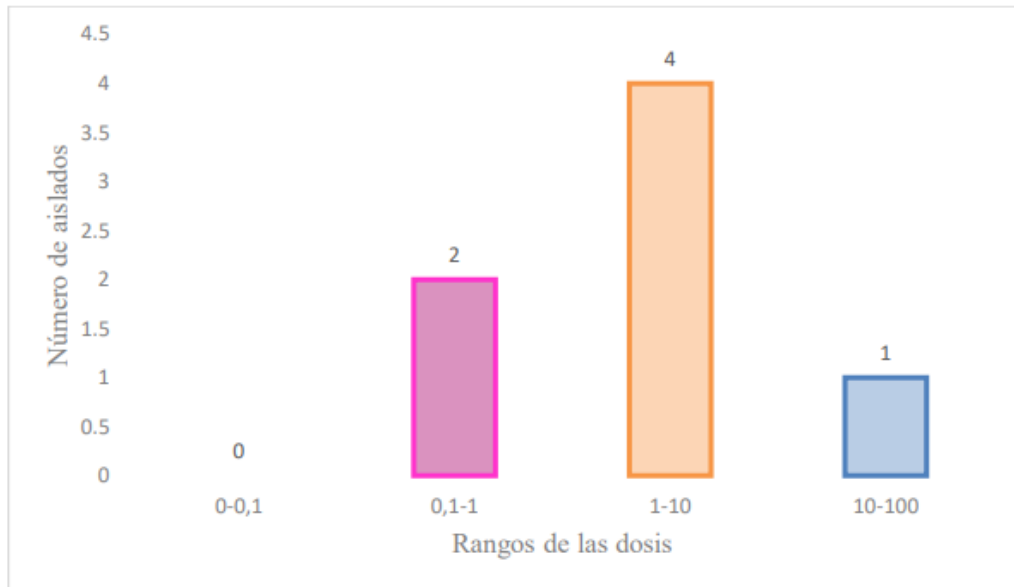
**Ilustración 16-4:** DE<sub>50</sub> de pyraclostrobin para diferentes cepas de *L.theobromae* de diferentes localidades

**Tabla 4-12:** Test de Kruskal Wallis 5% de la DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con pyraclostrobin.

Cepa	Media (ppm)	Grupo <sup>1</sup>
C5	14,73	a
C6	7,56	ab
C1	4,93	bc
C7	2,57	cd
C2	1,14	de
C3	0,50	e
C4	0,43	e

<sup>1</sup>Letras iguales denotan medidas que no son significativamente diferentes estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis

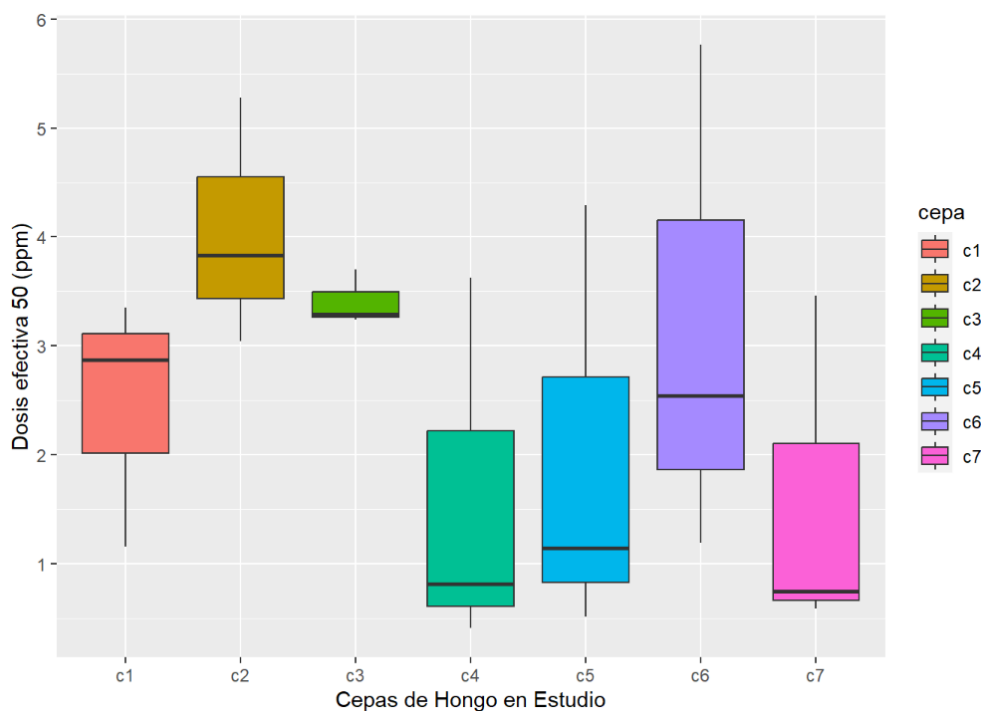
Realizado por: Torres N., 2023.



**Ilustración 17-4:** Frecuencia de los aislados de *L.theobromae* en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) estimadas para el principio activo pyraclostrobin

Los aislados de *L.theobromae* de acuerdo al test de Kruskal Wallis las DE<sub>50</sub> de los aislados fueron significativamente diferentes, dividiéndose en cinco grupos a, b, c ,d ,e (Tabla 4-12). La cepa c5 de *L. theobromae* correspondiente al aislado de la localidad La Celica presentó la mayor DE<sub>50</sub> con un valor de 14,73 ppm (Ilustración 16-4). Por otro lado, la cepa c3 y c4 de *L. theobromae* correspondiente al aislado de la localidad Bonanza presentó la menor DE<sub>50</sub> con un valor de 0,43 ppm (Ilustración 16-4). Los datos de la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se agruparon en tres rangos, el primer rango correspondió a un aislado de *L.theobromae* que presento sensibilidad a una dosis entre 10-100ppm, el cual podría asociarse a una resistencia al principio activo, por otra parte también se obtuvo 4 aislados de *L.theobromae* que presentaron sensibilidad a la dosis entre 1-10 ppm y otro grupo con 2 aislados de *L.theobromae* cuya sensibilidad se presentó a la dosis entre 0,1-1ppm; Para este ensayo no hubieron Dosis Efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) cuyos rangos fueran menores a 0,01 ppm (Ilustración 17-4).

**4.1.13 Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) de sulfato de cobre pentahidratado para diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.**



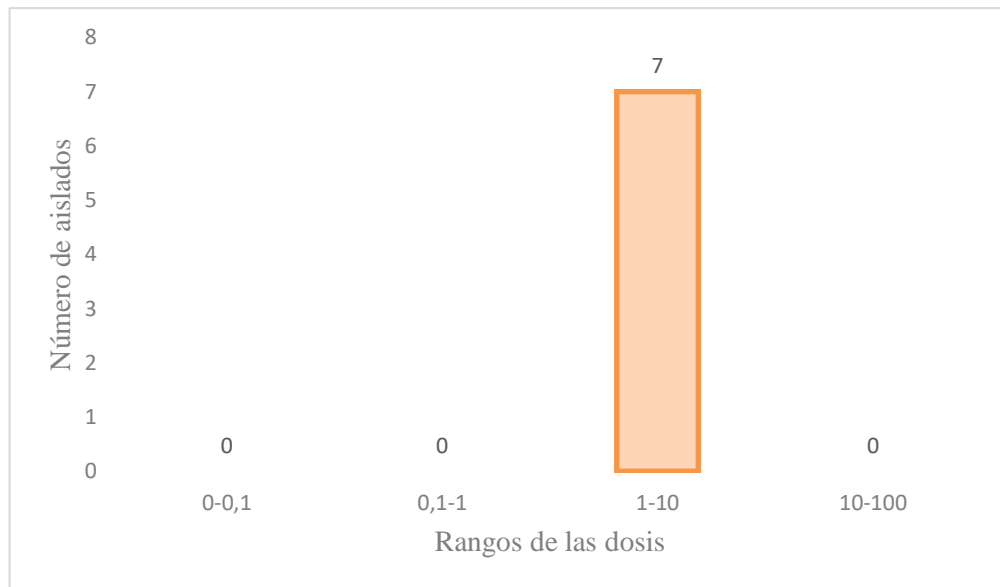
**Ilustración 18-4:** DE<sub>50</sub> de sulfato de cobre pentahidratado para diferentes cepas de *L.theobromae* de diferentes localidades

**Tabla 4-13:** Test de Kruskal Wallis 5% de la DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con sulfato de cobre pentahidratado.

Cepa	Media (ppm)	Grupo <sup>1</sup>
<b>C2</b>	4,05	a
<b>C3</b>	3,41	a
<b>C6</b>	3,17	a
<b>C1</b>	2,46	a
<b>C5</b>	1,98	a
<b>C4</b>	1,61	a
<b>C7</b>	1,60	a

<sup>1</sup>Letras iguales denotan medidas que no son significativamente diferentes estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis

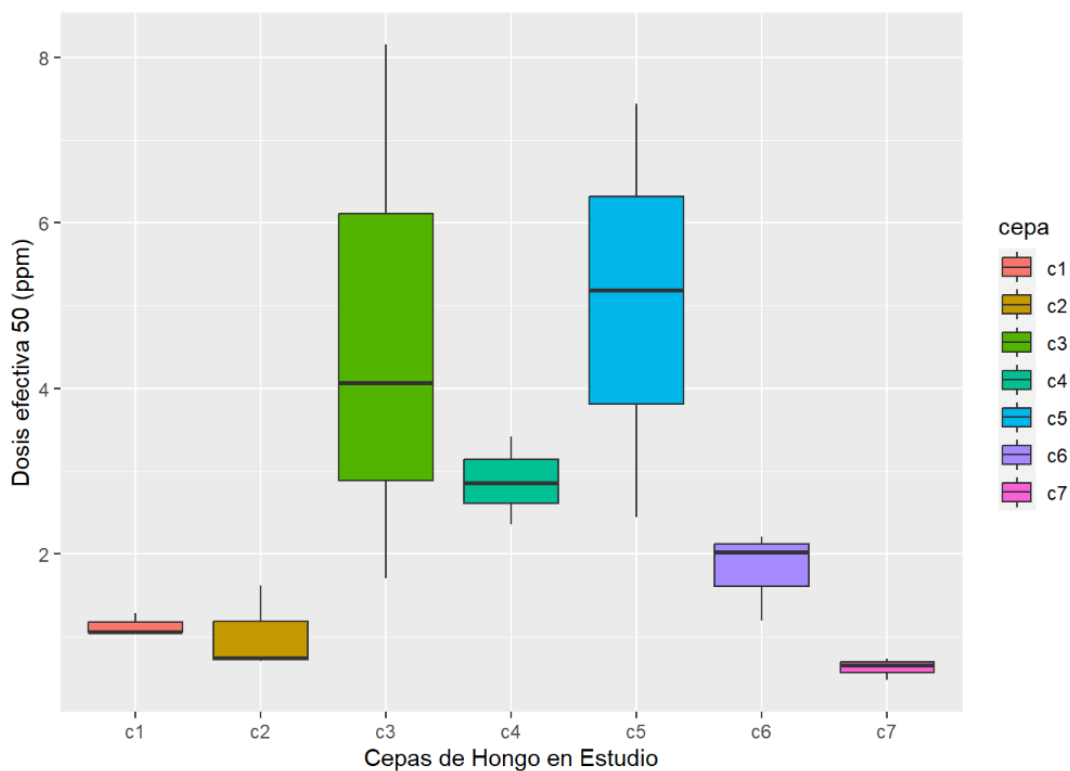
Realizado por: Torres N., 2023.



**Ilustración 19-4:** Frecuencia de los aislados de *L.theobromae* en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) estimadas para el fungicida sulfato de cobre pentahidratado

Los aislados de acuerdo al test de Kruskal Wallis, no fueron significativamente diferentes y denotaron un solo grupo a (Tabla 4-13). Con respecto al principio activo sulfato de cobre pentahidratado la cepa c2 de *L. theobromae* correspondiente al aislado de la localidad Bonanza presentó la mayor DE50 con un valor de 4,05 ppm (Ilustración 18-4). Por otro lado, la cepa c7 de *L. theobromae* correspondiente al aislado de la localidad 15 de Mayo presentó la menor DE50 con un valor de 1,60 ppm (Ilustración 13-4). Los datos de la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se agruparon en un solo rango que correspondió a los 7 aislados de *L.theobromae* que presentaron sensibilidad a la dosis entre 1-10 ppm; Para este ensayo no hubieron Dosis Efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) cuyos rangos sobrepasaran los 10 ppm, pero tampoco que fueran menores a 0,1 ppm. En este ensayo se puede mostrar como todos los aislados presentaron sensibilidad a un rango en específico (Ilustración 19-4)

**4.1.14 Dosis Efectiva 50 (DE50) de cyprodinil para diferentes cepas de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.**



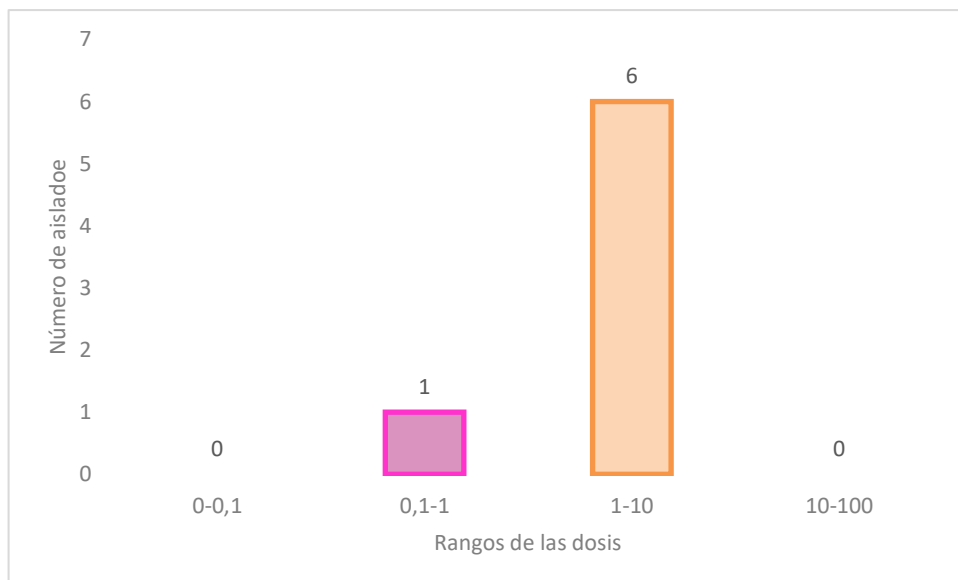
**Ilustración 20-4:** DE<sub>50</sub> de cyprodinil para diferentes cepas de *L.theobromae* de diferentes localidades

**Tabla 4-14:** Test de Kruskal Wallis 5% de la DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con cyprodinil.

Cepa	Media (ppm)	Grupo <sup>1</sup>
C5	5,03	a
C3	4,65	a
C4	2,88	ab
C6	1,81	bc
C1	1,13	cd
C2	1,03	cd
C7	0,62	d

<sup>1</sup>Letras iguales denotan medidas que no son significativamente diferentes estadísticamente según la prueba de Kruskal Wallis

Realizado por: Torres N., 2023.



**Ilustración 21-4:** Frecuencia de los aislados de *L.theobromae* en diferentes clases de Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) estimadas para el fungicida cyprodinil

Los aislados de acuerdo al test de Kruskal Wallis fueron significativamente diferentes, presentaron cuatro grupos con las letras a, b, c y d (Tabla 4-14). Con relación al principio activo cyprodinil la cepa c5 de *L. theobromae* correspondiente al aislado de la localidad La Celica presentó la mayor DE<sub>50</sub> con un valor de 5,03 ppm (Ilustración 20-4). Por otro lado, la cepa c7 que corresponde al aislado de la localidad 15 de Mayo presentó la menor DE<sub>50</sub> con un valor de 0,62 ppm (Ilustración 4-14). Los datos de la Dosis Efectiva 50 (DE<sub>50</sub>) se agruparon en dos rangos, el primer rango correspondió a 6 aislados de *L.theobromae* que presentaron sensibilidad a la dosis entre 1-10 ppm y otro grupo con un solo aislado de *L.theobromae* cuya sensibilidad se presentó a la dosis entre 0,1-1pp; Para este ensayo no hubieron Dosis Efectivas 50 (DE<sub>50</sub>) cuyos rangos sobrepasaran los 10 ppm, pero tampoco que fueran menores a 0,01 ppm (Ilustración 21-4).

**Tabla 4-15:** DE<sub>50</sub> de los aislados de *L.theobromae* enmendado con diferentes fungicidas

Fungicidas	EC <sub>50</sub> valores (µg mL <sup>-1</sup> )			
	N <sup>2</sup>	Mínimo	Máximo	Promedio
Cyprodinil	7	0,62	5,03	2,45
Pyraclostrobin	7	0,43	14,73	4,55
Tebuconazol	7	0,04	0,35	0,16
Difenoconazol	7	0,07	16,65	4,43
Tiabendazol	7	0,05	0,89	0,40
Tiofanato de metil	7	0,54	3,72	1,70
Sulfato de cobre	7	1,60	4,05	2,61

Realizado por: Torres N., 2023

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio se observó que las DE<sub>50</sub> obtenidas a través de la TCM de las siete cepas de *Lasiodiplodia theobromae*, varían dependiendo el principio activo y de las concentraciones a las que están presentes en el ensayo. Estos resultados se clasificaron de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por N. C. Gudmestad,(2019) para los fungicidas tebuconazol, tiabendazol, tiofanato metil, cyprodinil, difenoconazol y pyraclostrobin, mientras que para el sulfato de cobre se empleó la escala de Liu, J. et.al (2020), obteniendo la siguiente información: al utilizar el tiabendazol y tebuconazol todos los aislados (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7) ingresaron en la categoría de “Muy sensible” (<1,0 µg/mL); en el caso de tiofanato de metil cuatro de los aislados (C3, C5, C6, C7) ingresaron en la categoría de “Sensible” (1-5 µg/ml) y tres aislados (C1,C2 y C4) ) ingresaron en la categoría de “Muy sensible” (<1,0 µg/ml); con respecto al difenoconazol dos aislados (C5 y C6) ingresaron a la categoría “Moderadamente resistente” (5-20 µg/ml ) tres aislados (C1, C2 y C7) a la categoría “Sensible” (1-5 µg/ml) y dos aislados (C3 y C4) a la categoría “Muy sensible” (<1,0 µg/ml); en tanto que para el principio cyprodinil seis aislados (C1,C2,C3,C4,C5 y C6) pertenecieron a la categoría “Sensible” (1-5 µg/ml) y un aislado (C7) a la categoría “Muy sensible” (<1,0 µg/ml); por otro lado, con relación al pyraclostrobin dos aislados (C5 y C6) ingresaron a la categoría “Moderadamente resistente” (5-20 µg/ml ) tres aislados (C1,C2 y C7) ingresaron a la categoría “Sensible” (1-5 µg/ml) y dos aislados (C3 y C4) ingresaron la categoría de “Muy sensible” (<1,0 µg/ml) y finalmente, en las sales de cobre las siete cepas (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7) ingresaron a la categoría “Muy sensible” (<10 µg/ml).

#### 4.1.15 Análisis de riqueza de los genotipos de *Lasiodiplodia theobromae* de diferentes localidades.

**Tabla 4-16:** Conjunto A para el análisis de diversidad de los aislados de *Lasiodiplodia theobromae*

Aislado	Código	Localidad
GR.4	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
NL.4	PVCIS_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica/El Cisne
PGL2.4	PVLCE_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica
MX3.4	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
GR.14	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
MX3.10	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
MX2.4	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza

Realizado por: Torres., N.2023

**Tabla 4-17:** Conjunto B para el análisis de diversidad de los aislados de *Lasiodiplodia theobromae*

<b>Aislado</b>	<b>Código</b>	<b>Localidad</b>
PRY.1	PVLCE_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica
PGL2.3	PVLCE_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica
MX3.5	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
MX2.5	PVBO_	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza
GN.4	LB_	Los Bancos
GR.10	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
GR.16	PV15M_	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo
CS9	PVCIS_	Pedro Vicente Maldonado/La Celica/El Cisne

Realizado por: Torres N., 2023

**Tabla 4-18:** Índice de riqueza de siete aislados de *L.theobromae* de distintas localidades

<b>Riqueza</b>			
<b>Localidad</b>	<b>Estimación</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
PV15M_	2,50	2,00	3,88
PVBO_	3,38	2,00	4,65
PVCIS_	1,00	1,00	1,00
PVLCE_	1,00	1,00	1,00

Realizado por: Torres N., 2023

**Tabla 4-19:** Índice de riqueza de siete aislados de *L.theobromae* de distintas localidades

<b>Riqueza</b>			
<b>Localidad</b>	<b>Estimación</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
PV15M_	2,50	2,00	3,88
PVBO_	3,38	2,00	4,65
PVCIS_	1,00	1,00	1,00



PVLCE\_ 1,00 1,00 1,00

Realizado por: Torres N., 2023

**Tabla 4-20:** Índice Shannon de siete aislados de *L.theobromae* de distintas localidades

<b>Riqueza de Shannon</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Estimación</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
PV15M_	3,38	1,19	5,56
PVBO_	2,51	0,00	6,14
PVCIS_	1,00	1,00	1,00
PVLCE_	1,00	1,00	1,00

Realizado por: Torres N., 2023

Tomando en cuenta la riqueza, la localidad Pedro Vicente Maldonado – Bonanza (PVBO\_) obtuvo mayor número de genotipos que las demás localidades, por otra parte la localidad Pedro Vicente- El Cisne y La Celica obtuvieron los índices de riqueza más bajos.

De acuerdo con el índice de Shannon la localidad con mayor riqueza fue Pedro Vicente Maldonado – Los Bancos (PVBO\_) obtuvo mayor número de genotipos que las demás localidades, seguido de la localidad 15 de Mayo (PV15M\_) sin embargo, para las localidades el Cisne (PVCIS\_) y La Celica (PVLCE\_) el índice de riqueza fue bajo.

**Tabla 4-21:** Índice de riqueza de ocho aislados de *L.theobromae* de distintas localidades

<b>Riqueza</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Estimación</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
LB_	1,00	1,00	1,00
PV15M_	2,50	2,00	3,85
PVBO_	2,50	2,00	3,95
PVCIS_	1,00	1,00	1,00

PVLCE_	2,50	2,00	3,88
--------	------	------	------

**Realizado por:** Torres N., 2023

**Tabla 4-22:** Índice de Shannon de ocho aislados de *L.theobromae* de distintas localidades

<b>Riqueza de Shannon</b>			
<b>Aislado</b>	<b>Estimación</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
LB_	1,00	1,00	1,00
PV15M_	3,38	1,23	5,52
PVBO_	3,38	1,01	5,68
PVCIS_	1,00	1,00	1,00
PVLCE_	3,38	1,19	5,56

**Realizado por:** Torres N., 2023

Tomando en consideración el índice de riqueza, la localidad Pedro Vicente Maldonado – Bonanza (PVBO\_) obtuvo mayor número de genotipos que las demás localidades como en el caso anterior, por otra parte, la riqueza para la localidad 15 de mayo (PV15M\_) en este caso incrementó, al igual que para la localidad La Celica (PVLCE\_); Sin embargo, para las localidades El Cisne (PVCIS\_) y Los Bancos (LB\_) el índice de riqueza fue bajo.

De acuerdo con el índice de Shannon la localidad con mayor riqueza fue Pedro Vicente Maldonado – Los Bancos (PVBO\_) obtuvo mayor número de genotipos que las demás localidades, seguido de la localidad 15 de Mayo (PV15M\_) y La Celica (PVLCE\_) sin embargo, para las localidades el Cisne (PVCIS\_) y Los Bancos (LB\_) el índice de riqueza fue bajo

## 4.2 Discusión de resultados

El principio activo tiabendazol logró inhibir en un 75% el crecimiento de los aislados de *L.theobromae* a partir de la dosis de 1ppm ingresando a la categoría “Muy sensible” (<1,0 µg/mL) de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por N. C. Gudmestad,(2019); por otra parte la DE<sub>50</sub> obtuvo un valor promedio de 0,40 ppm entre rangos de 0,05 y 0,89 ppm siendo uno de los fungicidas con la DE<sub>50</sub> más baja, lo cual pondría en evidencia que este fungicida aun genera inhibición efectiva en el crecimiento y que podría utilizarse dentro de un calendario de aplicaciones para el control de *L.theobromae*, estos resultados contradicen con los resultados reportados por El-Naggar, S. M., & El-Saadani, M. A. (2017), quienes mencionan que tiabendazol mostró efectividad sobre *L.theobromae in vivo* a una concentración de 500 ppm. Así mismo, contradice el estudio realizado por Adesina, J. M., & Akintobi, A. O. (2012) se informó que a una concentración de 100 ppm de tiabendazol se redujo el crecimiento de *L. theobromae* en un 33.3%, mientras que una concentración de 1000 ppm logró una inhibición del 100% del crecimiento del hongo, las cuales son concentraciones del fungicida altas en comparación a lo obtenido en este estudio, además, el tiabendazol a pesar de ser uno de los fungicidas sistémicos del grupo de los Benzimidazoles más comúnmente utilizados en la actualidad en algunos estudios se ha demostrado la existencia de resistencia a este fungicida en específico. Un estudio realizado por Tefera et al. (2015) registró que ciertas cepas de *Lasiodiplodia theobromae* aisladas en Sudáfrica eran resistentes al tiabendazol y a otros fungicidas. Esta resistencia al tiabendazol y otros fungicidas del grupo de los benzimidazoles en hongos fitopatógenos puede ser causada por mutaciones en el gen de la β-tubulina durante la mitosis. En la mayoría de los casos, los cambios de codón implican sustituciones de aminoácidos, especialmente en el codón Glu198Val, aun así los hongos pueden mostrar variaciones en su comportamiento y resistencia a los benzimidazoles debido a cambios en una o varias posiciones de los aminoácidos en los codones Asp285Ser y Leu240Phe. Estas mutaciones se han reportado en estudios previos realizados por Baraldi et al. (2003), Malandrakis et al. (2013), y Sholberg et al. (2005b), tal como lo mencionan Samaras et al. (2020) en su trabajo. Así mismo se hace mención a que la resistencia al tiabendazol en algunos hongos patógenos se debe a una mutación que ocurre en el codón TTT que codifica para la fenilalanina en la posición 200 cambiando el codón a TTC o TAT, codificando para tirosina o histidina, respectivamente, lo que conduce a la resistencia del hongo al tiabendazol según lo menciona Cools, H. J., & Fraaije, B. A. (2013).

Ahora tomando el principio activo tiofanato de metil que es otro benzimidazol se reporta que se logró inhibir en un 50% el crecimiento de los aislados de *L.theobromae* a partir de la dosis de 10 ppm ingresando a las categorías “Muy sensible” (<1,0 µg/mL) y “Sensible” (1-5 µg/mL) de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por N. C. Gudmestad,(2019); por otra parte la DE<sub>50</sub> obtuvo

un valor promedio de 1,70 ppm entre rangos de 0,54 y 3,72 ppm, lo cual pondría en evidencia que este fungicida aun genera inhibición efectiva en el crecimiento, que no se ha generado resistencia cruzada entre fungicidas y que podría utilizarse dentro de un calendario de aplicaciones para el control de *L.theobromae*, cabe mencionar que el aislado C3 perteneciente al cantón Pedro Vicente Maldonado, recinto Bonanza no presentó dicha sensibilidad con relación a los demás aislados ya que a diferentes dosis siguió manteniendo los porcentajes más bajos de inhibición con respecto a las otras cepas, inclusive de aquellas que fueron colectadas en la misma zona. Este resultado puede deberse a que a diferencia de otras fincas de donde se hizo la colecta, la finca del señor Moscoso presentaba más de 8 años en producción de pitahaya, edades diferentes del cultivo y un área aproximada de 22 hectáreas, en donde para mantener la sanidad del mismo son más frecuentes las aplicaciones químicas, lo cual pudo haber desencadenado dicha resistencia; estos resultados se comparan con los registrados por Canto-Flick et al. (2017) el cual reporta que una aplicación de tiofanato de metilo a una concentración de 0.4% fue efectiva en la reducción de la incidencia de la enfermedad causada por *Lasiodiplodia theobromae* en pitahaya. Chen et al. (2013) mencionan en su estudio que se ha reportado resistencia al tiofanato de metil en diferentes especies de hongos fitopatógenos, y que esto puede deberse a mutaciones en el gen de la beta-tubulina y a la sobreexpresión de enzimas desintoxicantes. Además, los autores encontraron que una cepa de *Fusarium graminearum* aislada de trigo en China presentaba una resistencia moderada al tiofanato de metil, con un factor de resistencia de 5,9 en comparación con la cepa sensible al fungicida.

En el caso del principio activo tebuconazol logró inhibir en un 85% el crecimiento de los aislados de *L.theobromae* a partir de la dosis de 0,1ppm ingresando a la categoría “Muy sensible” (<1,0 µg/mL) de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por N. C. Gudmestad,(2019); por otra parte la DE<sub>50</sub> obtuvo un valor promedio de 0,16 µg/mL entre rangos de 0,04 y 0,35 µg/mL siendo el fungicida con la DE<sub>50</sub> más baja, lo cual significaría que este fungicida genera inhibición efectiva en el crecimiento y que podría utilizarse dentro de un calendario de aplicaciones para el control de *L.theobromae*, estos resultados contradicen con los reportados por Jang et al. (2018) en el cual se probó la eficacia de tebuconazol contra *Lasiodiplodia theobromae* in vitro y encontraron que la concentración inhibitoria mínima (MIC) de tebuconazol varió de 1,56 a 3,13 µg/mL, según la cepa del hongo. Por otra parte también existió un reporte en la que a una concentración de 12,5 µg/mL de tebuconazol se inhibía completamente el crecimiento, así mismo, los resultados también difieren con los de con que a una concentración de 4 µg/mL de tebuconazol se puede inhibir el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* in vitro en ciertas condiciones (Wang et al., 2017; Zhou et al., 2021). Sin embargo, se sabe que la resistencia a este fungicida ha sido reportada en otros hongos fitopatógenos, como *Fusarium* spp. y *Botrytis cinerea*, y puede deberse a

mutaciones en el gen de la C14-alfa-demetilasa del citocromo P450 que es el sitio de acción del fungicida, y a la sobreexpresión de enzimas desintoxicantes lo cual lleva a una interrupción del crecimiento normal del hongo debido a la acumulación de precursores del ergosterol y ácidos grasos libres.

Por otra parte el principio activo difenoconazol que es otro triazol logró inhibir en un 50% el crecimiento de los aislados de *L.theobromae* a partir de la dosis de 10 ppm ingresando a las categorías “Muy sensible” (<1,0 µg/mL), “Sensible” (1-5 µg/mL) y “Moderadamente Resistente” (5-20 µg/mL) de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por N. C. Gudmestad,(2019); la DE<sub>50</sub> obtuvo un valor promedio de 4,43 µg/mL entre rangos de 0,07 y 16,65 µg/mL, lo que representaría: inhibición efectiva, y ausencia de resistencia cruzada entre fungicidas, pero debería considerarse su empleo en calendarios para el control de *L.theobromae*, ya que cabe mencionar que el aislado C5 (PGL2.4) perteneciente al cantón Pedro Vicente Maldonado, recinto La Celica no presentó dicha sensibilidad ya que a diferentes dosis siguió manteniendo los porcentajes más bajos de inhibición con respecto a las otras cepas; estos resultados contradicen con un estudio en árboles de mango infectados con *L. theobromae* que en una concentración de 1,0 mg/L redujo significativamente la gravedad de la enfermedad y aumentó la producción de frutos en comparación con los árboles no tratados (Chitarra et al., 2011). Así mismo otro estudio en vides infectadas con *L. theobromae* encontró que difenoconazol a una concentración de 0,5 mg/L controló efectivamente la enfermedad y aumentó la calidad de la fruta (Sarruge et al., 2015).

Una de las partes más comunes asociadas a la resistencia al difenoconazol es la sustitución de la alanina por la treonina en la posición 379 (A379T) del gen CYP51. Esta mutación ha sido identificada en diversos hongos fitopatógenos (Cools y Fraaije, 2013).

De acuerdo en este caso al principio activo pyraclostrobin logró inhibir en un 59% el crecimiento de los aislados de *L.theobromae* a partir de la dosis de 10 ppm ingresando a las categorías “Muy sensible” (<1,0 µg/mL), “Sensible” (1-5 µg/mL) y “Moderadamente Resistente” (5-20 µg/mL) de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por N. C. Gudmestad,(2019); por otra parte la DE<sub>50</sub> obtuvo un valor promedio de 4,55 µg/mL entre rangos de 0,43 y 14,73 µg/mL siendo el fungicida con la DE<sub>50</sub> más alta, lo cual haría referencia a que en estos aislados ya se está generando algún tipo de resistencia o que por otro lado, debido a que este principio activo inhibe la respiración, el hongo en estudio este empleando una ruta alterna de respiración como vía metabólica alternativa para la producción de energía, así por ejemplo en un estudio realizado con *Candida albicans*, se empleó otra forma de respiración utilizando la activación de la vía de fermentación de la glucosa como una ruta alternativa para generar energía (Brunke et al., 2015). De manera similar, otro estudio

en *Aspergillus fumigatus* activó la vía de la glicólisis y la fermentación, lo que resultó la supervivencia del hongo en ausencia de la respiración. (Hortschansky et al., 2017). Los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con los de Journal of Phytopathology en 2021, los investigadores probaron la eficacia de la piraclostrobina contra *Lasiodiplodia theobromae* in vitro y encontraron que la concentración inhibitoria mínima (MIC) de la pyraclostrobin varió de 0,0039 a 0,0625 µg/mL, según la cepa de la hongo. También encontraron que una concentración de 0,5 µg/mL de pyraclostrobin inhibía por completo el crecimiento del hongo. La resistencia al pyraclostrobin en *Lasiodiplodia theobromae* también ha sido estudiada, y se ha propuesto que puede estar asociada con la presencia de activadores en el gen citocromo b (cytb) (Pérez-Martínez et al., 2017).

Tomando en consideración el principio cyprodinil logró inhibir en un 77% el crecimiento de los aislados de *L.theobromae* a partir de la dosis de 10 ppm ingresando a las categorías “Muy sensible” (<1,0 µg/mL) y “Sensible” (1-5 µg/mL) de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta por N. C. Gudmestad,(2019); por otra parte la DE<sub>50</sub> obtuvo un valor promedio de 2,45 µg/mL entre rangos de 0,62 y 5,03 µg/mL, estos datos difieren con el estudio realizado por Luque et al. (2019) que evaluó la sensibilidad de 20 aislados de *L. theobromae* a diferentes fungicidas, incluido cyprodinil, encontrando que la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cyprodinil para inhibir el crecimiento de los aislados de *L. theobromae* varió entre 0,16 y 1,25 µg/mL, con una media de 0,64 µg/mL, ya que también son valores no muy altos para este fungicida. Así mismo para el estudio realizado por García-Sánchez et al. (2016) el cual evaluó la actividad antifúngica de cyprodinil contra diferentes patógenos del fruto de cítricos, incluyendo *L. theobromae* en donde reportaron un valor de IC<sub>50</sub> de 1,95 µg/mL para este hongo, sin embargo se encontró que algunos aislamientos de *L. theobromae* en plantaciones de mango en Colombia eran resistentes a cyprodinil, con valores de concentración efectiva 50 (EC<sub>50</sub>) mayores a 0,5 µg/mL en algunos aislamientos. Giraldo,et.al (2018). En *Botrytis cinerea*, se ha encontrado que la resistencia al cyprodinil está asociada con similares en el gen Bcerg27, que codifica para una proteína de transporte de membrana (Gisi et al., 2002; Heaney et al., 2018). Por otro lado en la especie fúngica *Alternaria alternata*, se ha identificado que la resistencia está asociada con protectores en el gen Aaerg6, que codifica para una proteína quinasa dependiente de ciclina (Kang et al., 2016). En la especie fúngica *Penicillium digitatum*, está relacionada con los protectores en el gen PdMFS1, que codifica para una proteína de transporte de membrana (López-Pérez et al., 2020).

Por otro lado en cuanto al sulfato de cobre, este logró inhibir en un 63% el crecimiento de los aislados de *L.theobromae* a partir de la dosis de 10 ppm ingresando a la categoría “Muy sensible” (<10 µg/mL) de acuerdo a la escala de sensibilidad propuesta la escala de Liu, J. et.al (2020), por otra parte la DE<sub>50</sub> obtuvo un valor promedio de 2,61 µg/mL entre rangos de 1,60 y 4,05 µg/mL, estos

datos difieren con el estudio realizado por Singh et al. (2016), donde se mostró que la concentración mínima inhibitoria (MIC) del sulfato de cobre para esta especie fue de 200 µg/mL, mientras que en otro estudio llevado a cabo por Abad-Campos et al. (2012), los resultados mostraron que la concentración de sulfato de cobre requerida para inhibir el crecimiento de *L. theobromae* fue de 1000 ppm. Sin embargo, en un estudio más reciente realizado por Mokhtarnejad et al. (2021), los resultados indicaron que la concentración mínima inhibitoria (MIC) del sulfato de cobre para esta especie fue de 500 µg/mL, lo que nos hace concluir que la concentración efectiva 50 en este estudio es baja y bien se podría inferir que no se ha generado una resistencia y por ende se puede emplear para calendarios con rotación de principios activos. La resistencia al sulfato de cobre en hongos se debe a una variedad de mecanismos, incluyendo la modificación de la expresión génica, la sobreproducción de enzimas de detoxificación y la modificación de la estructura de la pared celular. Sin embargo se han identificado varios genes candidatos que pueden estar asociados con la resistencia al sulfato de cobre en diferentes especies de hongos, no hay un gen específico que se haya identificado como responsable de la resistencia en todas las especies (Liu et al., 2016).

Analizando la parte genética de acuerdo a los índices de diversidad, la localidad Pedro Vicente Maldonado – Bonanza (PVBO\_) obtuvo 6,14 genotipos en el primer grupo y de igual manera la misma localidad en el segundo grupo sigue manteniendo el mayor número de genotipos con un índice de 5,68; este efecto pudo deberse a que la finca en Bonanza mantenga más de 10 años de funcionamiento en la producción de pitahaya, otro factor puede estar relacionado con el hectareaje, ya que posee un aproximado de 22 hectáreas, el empleo de fungicidas para el MIEP y que la plantación haya mantenido cultivos de diferentes edades también pudo haber generado que existan aislados sensibles y resistentes, así lo mencionan en un estudio con *Fusarium oxysporum* f. sp que sugiere que la resistencia a los fungicidas puede estar asociada a la diversidad genética; pues se reportó que las poblaciones más diversas genéticamente tenían una mayor probabilidad de incluir aislados resistentes (Brent & Hollomon, 2007). Por otra parte *Lasioidiplodia theobromae* es una especie de hongo que puede presentar tanto reproducción homotálica como heterotálica, dependiendo de las condiciones ambientales y la disponibilidad de parejas sexuales compatibles (Freeman & Sharon, 2010: pp.1-10).

#### **4.3 Comprobación de la hipótesis**

Mediante el estudio realizado se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa que menciona que al menos uno de los aislados fúngicos difiere genéticamente y al menos uno de los fungicidas de diferente modo de acción y una de las dosis presenta efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial de *Lasioidiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl

## CAPITULO V

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

Los principios activos que tuvieron efecto inhibitorio superior al 75% en la TCM de *L.theobromae* fueron el tebuconazol (inhiben la biosíntesis de ergosterol en las membranas) con un promedio de 0,16 ppm para inhibir el crecimiento su crecimiento; tiabendazol (inhiben las proteínas motoras y del citoesqueleto) con una DE50 promedio de 0,40 ppm.

Por otro lado, Los principios activos menos eficientes en generar un efecto inhibitorio en la TCM de *L.theobromae* fueron pyraclostrobin (inhibe la respiración) con una DE50 promedio de 4,55 ppm; difenoconazol (inhiben las proteínas motoras y del citoesqueleto) con una DE50 promedio de 4,43ppm; sulfato de cobre (productos químicos con actividad multi-sitio) con una DE50 promedio de 2,61 ppm.

En conclusión, los resultados obtenidos en los aislados sensibles y resistentes de la localidad Pedro Vicente Maldonado-Bonanza sugieren que las condiciones ambientales y de cultivo pueden influir en la respuesta de las plantas a los patógenos. El tamaño del terreno, la edad de los cultivos, el monocultivo y la reproducción clonal de la pitahaya son factores que podrían estar influyendo en la resistencia y sensibilidad de la planta a los patógenos. Estos resultados son importantes para el desarrollo de estrategias de cultivo y manejo de enfermedades en este cultivo, ya que podrían ayudar a identificar las condiciones óptimas para el cultivo de la pitahaya y prevenir la propagación de enfermedades.

La localidad con mayor diversidad genética le pertenece al cantón Pedro Vicente Maldonado, recinto Bonanza, en donde a partir de los índices de riqueza y Shannon se han hallado en genotipos de entre los 13 genotipos de todas las localidades



## 5.2 RECOMENDACIONES

-Realizar más estudios de sensibilidad *in vitro* utilizando principios activos diferentes a los utilizados en este estudio para el control de *Lasiodiplodia theobromae* tales como: boscalid, azoxystrobin y extractos vegetales.

-Utilizar *in vivo* los principios activos en donde se obtuvieron menor DE<sub>50</sub> en las diferentes localidades de las cuales provienen las cepas de *Lasiodiplodia theobromae*.

-Realizar estudios de diversidad genética con un número de aislados más grande que permita corroborar los resultados obtenidos durante este estudio.

-Emplear microsátélites en la caracterización genética, la identificación de variedades y en la evaluación de la variabilidad genética dentro de la población en estudio, así como para la selección de variedades resistentes a enfermedades y adaptadas a diferentes condiciones ambientales

## GLOSARIO

**Alelo:** Una de las formas alternativas de un gen que se encuentra en un lugar específico en un cromosoma (Griffiths et al., 2020).

**Agente causal:** microorganismo del ambiente que, por sus propiedades, puede causar problemas fitosanitarios al hospedero (Massalimov et al., 2017: p.307).

**Aminoácidos:** moléculas que se unen para formar nutrientes vitales para la supervivencia de todos los tipos de células (Genchi, 2017: p.1523).

**Biosíntesis:** es un proceso químico, del cual se obtiene moléculas complejas a partir de unas más sencillas, lo que genera un gasto de energía (Porporatto, 2021: p.1).

**Cepas:** son el material básico para el desarrollo de cualquier especie de hongo a nivel de laboratorio (Mata y Salmones, 2021: p.29).

**Codón:** es una secuencia de tres nucleótidos que se localiza en el ARN mensajero (Sánchez, 2020).

**Concentración:** magnitud que expresa la cantidad de una sustancia por unidad de volumen, y cuya unidad en el sistema internacional es el mol por metro cúbico ( $\text{mol/m}^3$ ) (RAE, 2021).

**Crecimiento micelial:** desarrollo del micelio por el contacto entre esporas con un entorno favorable y con suficientes nutrientes (Dulay et al., 2020: p.2).

**Diluciones:** reducción de la concentración de sustancias químicas en una solución (Bolívar, 2021).

**Dispensado:** llenado de recipientes con el volumen necesario de medio (Merck, 2022).

**Dosis efectiva 50 (DE50):** es la dosis de una sustancia, que se espera que produzca un determinado efecto en el 50% de los organismos de experimentación de una población dada, bajo un conjunto de condiciones definidas (Espinoza et al., 2017, p.194).

**Efecto inhibitorio:** capacidad de una sustancia para inhibir o controlar las funciones de un organismo a través de un estímulo determinado (Cognifit, 2021).

**Enzimas:** denominados como catalizadores biológicos; la cual ayuda a acelerar la velocidad de las reacciones químicas (Ramírez y Ayala, 2014).

**Esporas:** es una célula reproductiva de los hongos que tiene la capacidad de dividirse y formar un nuevo individuo (MedlinePlus, 2022).

**Fenotipo:** Característica observable de un organismo, determinada tanto por sus genes como por su ambiente (Mackay et al., 2019).

**Genotipo:** todos los genes que se encuentran en el núcleo de cada célula individual (Unilab, 2021).

**Homocigoto:** Individuo que posee dos copias idénticas de un alelo para un gen particular (Alberts et al., 2002).

**Inhibición:** suspender transitoriamente una función o actividad del organismo mediante la acción de un estímulo adecuado (RAE, 2022).

**In vitro:** referente que se encuentra en medio de cultivo (Peña y Páez, 2014).

**Marcador genético:** Una característica observable o un marcador molecular que se utiliza para identificar una posición en el genoma (Hartl y Jones, 2018).

**Medio enmendado:** es la mezcla de medio de cultivo con cualquier sustancia ajena a este (Arce, 2019: p.385)

**Micelio:** es una red de hifas o filamentos que se conforman de filas de células dispuestas en hilera (Droppelmann, 2022).

**Mutación:** es una variación espontánea o inducida del genoma, un cambio permanente y heredable en la secuencia del ADN, en nucleótidos, o bien en la disposición del ADN en el genoma (Sánchez y Gómez, 2021).

**Principio activo:** cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a ser utilizada en la fabricación de un producto (Barrantes, 2022).

**Polimorfismo:** Variación en la secuencia de ADN que se encuentra en una proporción significativa de la población (Collins et al., 1998).

**Sensibilidad:** el cambio de una variable frente a la variación en un factor que pueda impactar en su valor, ya sea positiva o negativamente (Westreicher, 2020).

**Solución stock:** es una solución de concentración conocida, que sirve como base para preparar para la dilución otras soluciones en concentraciones más pequeñas (Kripkit, 2020).

**Tasa de crecimiento micelial:** determinado por las condiciones ambientales como nutrientes, temperatura y humedad. Si las condiciones ambientales son correctas, las esporas que se adhieren a las superficies germinarán y los micelios comenzarán a crecer (Suconel, 2013: p.3).

## **BIBLIOGRAFÍA**

**AGROCALIDAD**, 2022. EXPORTACIONES DE PITAHAYA CRECIERON CASI 60% EN 2021. En: MAG (ed.), AGROCALIDAD [en línea]. Disponible en: <https://www.agrocalidad.gob.ec/exportaciones-de-pitahaya-crecieron-casi-60-en-2021/#:~:text=Durante%20el%20a%C3%B1o%202021%2C%20se>.

**AGUILAR, G., ÁNGELES, M. DE LOS, TERRAZAS, T., & ARIAS, S.** (2009). Anatomía caulinar de tres especies del género *Hylocereus* (Berger) Britton & Rose (cactaceae) en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(3), 201-208. ISSN 0187-7380.

**AGUILAR, G.; ÁNGELES, M. DE LOS; TERRAZAS, T. Y ARIAS, S.** “Anatomía caulinar de tres especies del género *Hylocereus* (Berger) Britton & Rose (cactaceae) en México”. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 32, no. 3, septiembre de 2009, pp. 201-208, ISSN 0187-7380.

**ALI, S. S., ASMAN, A., SHAO, J., BALIDION, J. F., STREM, M. D., et al.** (2019). Genome and transcriptome analysis of the latent pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, an emerging threat to the cacao industry. *Genome*, 63(1), 37-52.

**ALMACELLAS, J.; & MARÍN, J.** “¿Tenemos resistencias a fungicidas? Situación en España y su manejo”. *Phytoma*. [PDF en línea]. 2013, (España) (237), pp. 32 – 38. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: [https://www.phytoma.com/images/247\\_fungicidas.pdf](https://www.phytoma.com/images/247_fungicidas.pdf)

**ASTORGA, MARCELA P y ORTIZ, JUAN C.** Variabilidad genética y estructura poblacional del tunicado *Pyura chilensis* Molina, 1782, en la costa de Chile. *Rev. chil. hist. nat.* [online]. 2006, vol.79, n.4 [citado 2022-09-22], pp.423- 434. Disponible en [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0716-078X2006000400002&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-078X2006000400002&lng=es&nrm=iso). ISSN 0716-078X. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2006000400002>.

**BAIBAKOVA, E. V., NEFEDJEVA, E. E., SUSKA-MALAWSKA, M., WILK, M., SEVRIUKOVA, G. A., & ZHELTOBRIUKHOV, V. F.** (2019). Modern Fungicides: Mechanisms of Action, Fungal Resistance and Phytotoxic Effects. *Annual Research & Review in Biology*, 32(3), 1-16. <https://doi.org/10.9734/arrb/2019/v32i330083>

**BARBOSA-MARTÍNEZ C, LEÓN-GARCÍA LP, SEPÚLVEDA-SÁNCHEZ J AND**

**NIETO-ANGEL D.** 2002. Effects of ozone, iodine and chlorine on spore germination of fungi isolated from mango fruits. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20(1): 60-65.

**BASICFARM.** ¿Qué es un fungicida y para qué sirve?. [blog]. Colombia: BasicFarm, 2020. p.1. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: <https://basicfarm.com/blog/que-es-fungicida-utilidad/>

**BERGMANN, F., GREGORIUS, H.R., AND SCHOLZ, F.** 1989. Isoenzymes, indicators of environmental impacts on plants or environmentally stable gene markers?. pp. 17–28. In: F. Scholz Gregorius, and D.H.R. Rudin (eds.). *Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations*. Springer–Verlag, Heidelberg, Germany. 201 p.

**BHAT, M. M., WANI, T. A., & WANI, S. A.** (2016). Effect of different fungicides on the management of mango malformation caused by *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon and Maubl. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(6), 274-277. <https://www.phytojournal.com/archives/2016/vol5issue6/PartJ/5-6-26-773.pdf>

**CALVO, A.** Fungicidas sistémicos: trucos para tener éxito en el tratamiento. [blog]. 2017. p. 1. [Consulta: 29 marzo 2021]. Disponible en: <https://www.agroptima.com/es/blog/fungicidassistemicos/>

**CARMONA, Marcelo, & SAUTUA, Francisco.** Buenas prácticas agronómicas para evitar la resistencia de los hongos a los fungicidas. [PDF en línea]. (Trabajo de investigación). Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 2018. p.2. [Consulta: 23 septiembre 2022]. Disponible en: [http://www.maizar.org.ar/documentos/resistencia%20fungicida%20mejorada\\_6-10-15\\_final.pdf](http://www.maizar.org.ar/documentos/resistencia%20fungicida%20mejorada_6-10-15_final.pdf)

**CENTRO NACIONAL PARA LA INFORMACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LOS ESTADOS UNIDOS:** un palacio de la información para la medicina molecular. ACIMED [online]. 2009, vol.19, n.4 [citado 2022-09-20]. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1024-94352009000400003&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1024-94352009000400003&lng=es&nrm=iso). ISSN 1024-9435.

**COLLARD, B.C.Y., JAHUFER, M.Z.Z., BROUWER, J.B., AND PANG, E.C.K.** 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL), mapping and marker–assisted selection for

crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142:169–196.

**COOLS, HJ Y FRAAIJE, BA** (2013). Actualización sobre los mecanismos de resistencia a los azoles en *Mycosphaerella graminicola* e implicaciones para el control futuro. *Ciencia del manejo de plagas*, 69(2), 150-155.

**CROUS, Pedro W.; PALM, Mary E.** Reassessment of the anamorph genera *Botryodiplodia*, *Dothiorella* and *Fusicoccum*. *Sydowia*, 1999, vol. 51, no 2, p. 167-175.

**DAVILA, Martha; LAURENTIN, Hernán y CASTILLO, Miguel A.** Utilidad de marcadores rapid en la identificación de germoplasmas de ajonjolí. *Agronomía Trop.* [online]. 2003, vol.53, n.3 [citado 2022-09-23], pp.259- 274. Disponible en: <[http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0002-192X2003000300002&lng=es&nrm=iso](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2003000300002&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 0002-192

**ESCUADERO RAMIREZ, M.; MARIN MONTOYA, M.; JARAMILLO VILLEGAS, S.; & COTES TORRES, J. M.** “Metodología de evaluación de la sensibilidad a fungicidas QoI - fenamidona: caso de estudio *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary”. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* [en línea], 2009, (Colombia) 62(1), pp. 4773-4782. . [Consulta: 23 septiembre 2022]. ISSN0304-2847. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0304-28472009000100004](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0304-28472009000100004)

**ESQUIVEL, P.; STINTZING, F. C.; CARLE, R.** 2007. Comparison of morphological and chemical fruit traits from different pitaya genotypes (*Hylocereus* sp.) grown in Costa Rica. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 81: 7-14.

**EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA).** (2017). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance difenoconazole. *EFSA Journal*, 15(5), 4805. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4805>

**FERREIRA, ANA FRANCISCA TIBÚRCIA AMORIM FERREIRA e.** Diversidade genética e estrutura de população entre isolados de *Corynespora cassiicola* no Estado do Amazonas. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2014.

**FISHER, R. A., & GOLLAN, B.** (2018). Cross-resistance and collateral sensitivity in bacteria:

implications for antibiotic therapy. *Antibiotics*, 7(3), 82

**GILL-LANGARICA**, Homar René y **MAYEK-PEREZ**, Netzahualcoyotl. Los Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de la Resistencia a Enfermedades del Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.): Aplicaciones y Perspectivas. *Rev. mex. fitopatol* [online]. 2008, vol.26, n.2 [citado 2022-09-23], pp.164-176. Disponible en: <[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092008000200009&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000200009&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 2007-8080

**Henry, R.J.** 2001. *Plant Genotyping. The DNA Fingerprinting of Plants*. CABI Publishing. Wallingford, United Kingdom. 344 p.

**LIU, J., HUANG, X., CHEN, F., CHENG, H., & WANG, X.** (2020). Antifungal activity of copper-based compounds against six species of fruit rot fungi. *Journal of Fungi*, 6(1), 18. <https://doi.org/10.3390/jof6010018>

**LIU, Z., LI, X., LI, C., LI, L., CHEN, X., & CHEN, Y.** (2020). Fungicide resistance management in crop pathogens: current status and future perspectives. *Plant Disease*, 104(4), 1024-1034.

**LØRGENSEN, L. N., HOVMØLLER, M. S., & HANSEN, J. G.** (2022). Fungicide resistance management in agriculture: current state and perspectives. *Phytopathology Research*, 4(1), 1-15.

**LOVATO, A.; GUTIÉRREZ, S.; & CARMONA, M.** “Sensibilidad in vitro de *Trichoconiella padwickii* a diversos principios activos usados como fungicidas en el cultivo del arroz”. *Revista Argentina de Microbiología* [en línea], 2017, (Argentina) 49(1), pp. 70-74. [Consulta: 29 marzo 2021]. ISSN: 0325 – 7541. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/2130/213050529011.pdf>

**MALDONADO GUERRÓN**, Erika Daniela. Pruebas de sensibilidad de dos fungicidas unisitio para el control de *Botrytis* sp. [PDF en línea] (Trabajo de titulación). (Ingeniería) Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador. 2018. p. 19. [Consulta: 22 de septiembre 2022]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/16094/1/T- UCE-0001-CAG- 017.pdf>

**MARTÍNEZ, J. A., DÍAZ, G. A., & GARIBALDI, A.** (2021). Fungicide resistance in fruit crops: a review. *Agronomy*, 11(1), 78.



**MBENOUN M**, momo zeh, samuels gj, nsouga ar, nyasse s, 2008. Muerte regresiva debido a *Lasiodiplodia theobromae*, una nueva limitación para la producción de cacao en Camerún. *Planta Patología* 57, 381.

**McGrath, M.** ¿Qué son los funguicidas? [PDF en línea]. EEUU. APS: Cornell University. 2014. p. 5. [Consulta: 30 marzo 2021]. Disponible en: [https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/23852/mod\\_resource/content/1/Que%20son%20los%20funguicidas.pdf](https://aulavirtual.agro.unlp.edu.ar/pluginfile.php/23852/mod_resource/content/1/Que%20son%20los%20funguicidas.pdf)

**MONTESINOS CRUZ, JOSEFINA A.; RUIZ HERRERA, G.; RODRÍGUEZ-LARRAMENDI, L.; ORTIZ PÉREZ, R.; FONSECA-FLORES, MARÍA DE LOS A. Y GUEVARA HERNÁNDEZ, F.** Pitahaya (*Hylocereus* spp.) un recurso fitogenético con historia y futuro para el trópico seco mexicano. [en línea]. *Cultivos Tropicales*, 2015, vol. 36, no. especial, pp. 69-78. ISSN 1819-4087. [Consultado: 23 de septiembre de 2022]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193243640007.pdf>

**PADILLA ARIAS, Katherine Estefanía.** Preservación miceliar de basidiomicetes procedentes de regiones tropicales y templadas en granos de maíz y de cebada [En línea] (Trabajo de titulación). (Licenciatura) Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador. 2017. p. 18. [Consulta: 25 diciembre 2021]. Disponible en: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/13222/Tesis%20Katherine%20Padilla%20Arias.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

**PÉREZ ROBLES, Jesús Adrian.** Extractos vegetales y *Beauveria bassiana* como control biológico en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) [en línea] (Trabajo de Titulación). (Ingeniería) Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México. 2020. p. 39. [Consulta: 22 de septiembre 2022]. Disponible en: <https://rinacional.tecnm.mx/bitstream/TecNM/773/1/Tesis%20MCIBQ%202018-2020%20FINAL.pdf>

**Phillips AJL**, Alves A, Pennycook SR, Johnston PR, Ramaley A, Akulov A and Crous PW 2008. Resolving the phylogenetic and taxonomic status of dark-spored teleomorph genera in the Botryosphaeriaceae. *Persoonia* 21:29-55. **SÁNCHEZ, M.** ¿Qué es un fungicida sistémico? [blog]. 2019. p. 2. [Consulta: 29 marzo 2021]. Disponible en: <https://www.jardineraon.com/que-es-un-fungicida-sistemico.html>

**Phillips-Mora, W., Rodríguez, H., & Fritz, P. J.** (1995). Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. Unidad de Biotecnología Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba - Costa Rica. p. 183.

**PICOS-MUNOZ, Paola Alejandra et al.** Lasiodiplodia theobromae en Cultivos Agrícolas de México: Taxonomía, Hospedantes, Diversidad y Control. Rev. mex. fitopatol [online]. 2015, vol.33, n.1 [citado 2022-09-20], pp.54-74. Disponible en:<[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33092015000100054&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092015000100054&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 2007-8080.

**SALVATORE, M. M., Alves, A., & Andolfi, A.** (2020). Secondary metabolites of Lasiodiplodia theobromae: distribution, chemical diversity, bioactivity, and implications of their occurrence. Toxins, 12(7), 457.

**SANDOVAL-DENIS, M., CROUS, P. W., & GUARRO, J.** (2021). Fungal biodiversity and mycotoxins in crops: a review. Food Microbiology, 97, 103805. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103805>

**TANAKA, F. A. O., GONÇALVES, R. C., & TINÉ, M. A. S.** (2014). Sensitivity of Lasiodiplodia theobromae and Colletotrichum gloeosporioides from different hosts to fungicides. European Journal of Plant Pathology, 140(2), 285-292. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10658-014-0386-5>

**VERONA-RUIZ, Anggie; URCIA-CERNA, Juan y PAUCAR-MENACHO, Luz María.** Pitahaya (Hylocereus spp.): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. Scientia Agropecuaria [online]. 2020, vol.11, n.3 [citado 2022-09-23], pp.439-453. Disponible en: <[http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2077-99172020000300439&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172020000300439&lng=es&nrm=iso)>. ISSN 2077-9917. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>.

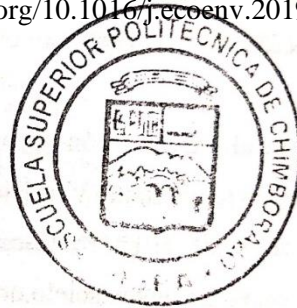
**WANG, Y., LI, J., LI, X., LIU, B., & HU, X.** (2021). Fungicide resistance and its management in crop diseases: a review. Crop Protection, 144, 105616.

**WILLIAMS, J. G. K., A. R. KUBELIK, J. A. LIVAK, J. A. RAFALSKI and S. V**

TINGEY 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

**ZHANG, X., LU, X., & WANG, J.** (2020). Occurrence and risk assessment of difenoconazole and tebuconazole in surface water and sediment of the Haihe River Basin, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 191, 110190. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.110190>

D. RAI  
Castillo



## ANEXOS

### ANEXO A: CÁLCULOS PARA DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES DE LOS FUNGICIDAS.

Cálculo del principio activo tiofanato de metil – 50%:

1%                                      5 000 mg/L

50%                                      ?                      = 250 000 mg/L = Ci

Luego de conseguir el Ci se determinó el volumen de fungicida de tal manera que la solución se encuentre en stock en un volumen de 5 mL de solución

$$C_i * V_i = C_f * V_f$$

Dónde:

Ci = Concentración inicial

Vi = Volumen inicial

CF = Concentración final

Vf = Volumen final

Entonces: 250 000 mg/L \* Vi = 5 000 mg/L \* 5 mL

$$V_i = \frac{25\,000 \frac{mg}{L} \cdot ml}{250\,000 \frac{mg}{L}} = 0,10 \text{ ml del fungicida}$$

Luego de conocer la cantidad de fungicida para nuestra solución, se procede a establecer la cantidad de solvente a utilizar, para lo cual:

$$V_T = V_f + V_s$$

Dónde:

VT = Volumen total

Vf = Volumen del fungicida

Vs = Volumen del solvente

$$\text{Entonces } 5 \text{ mL} = 0,10 \text{ mL} + V_s$$

$$V_s = 5 \text{ mL} - 0,10 \text{ mL}$$

$$V_s = 4,9 \text{ mL de agua destilada estéril}$$

La solución obtenida es la solución stock; es decir, que su concentración está a 100 ppm y para obtener dosis más pequeñas se realizó la dilución de esta, es decir:

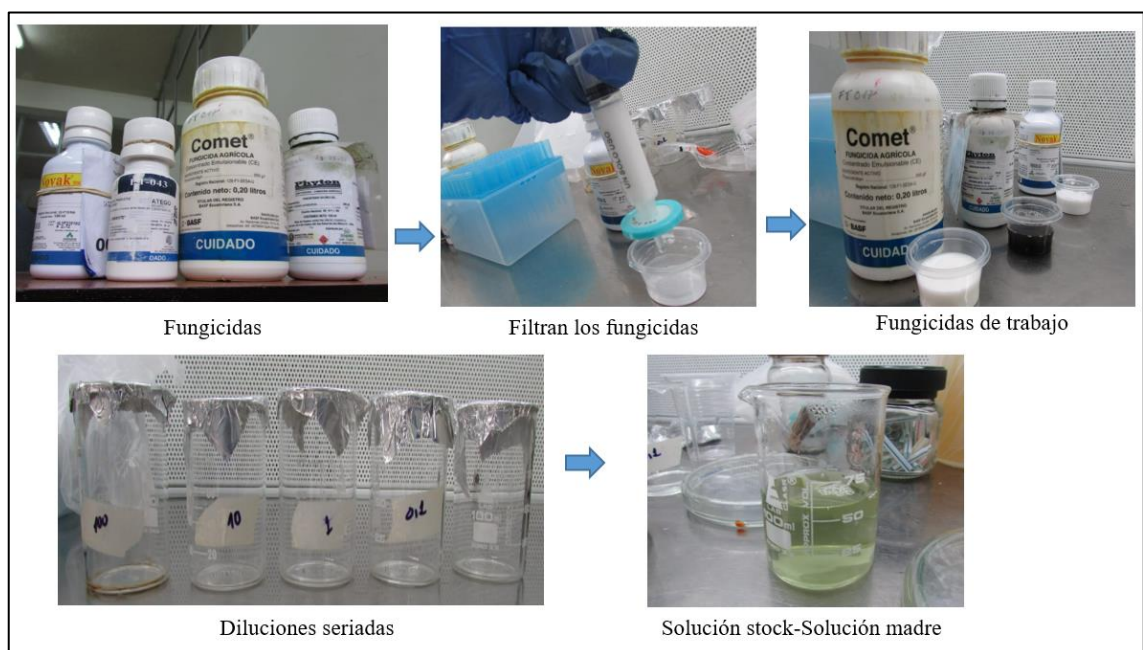
10 ppm = 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 mL de la solución stock.

1 ppm = 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 mL de la solución 10 ppm.

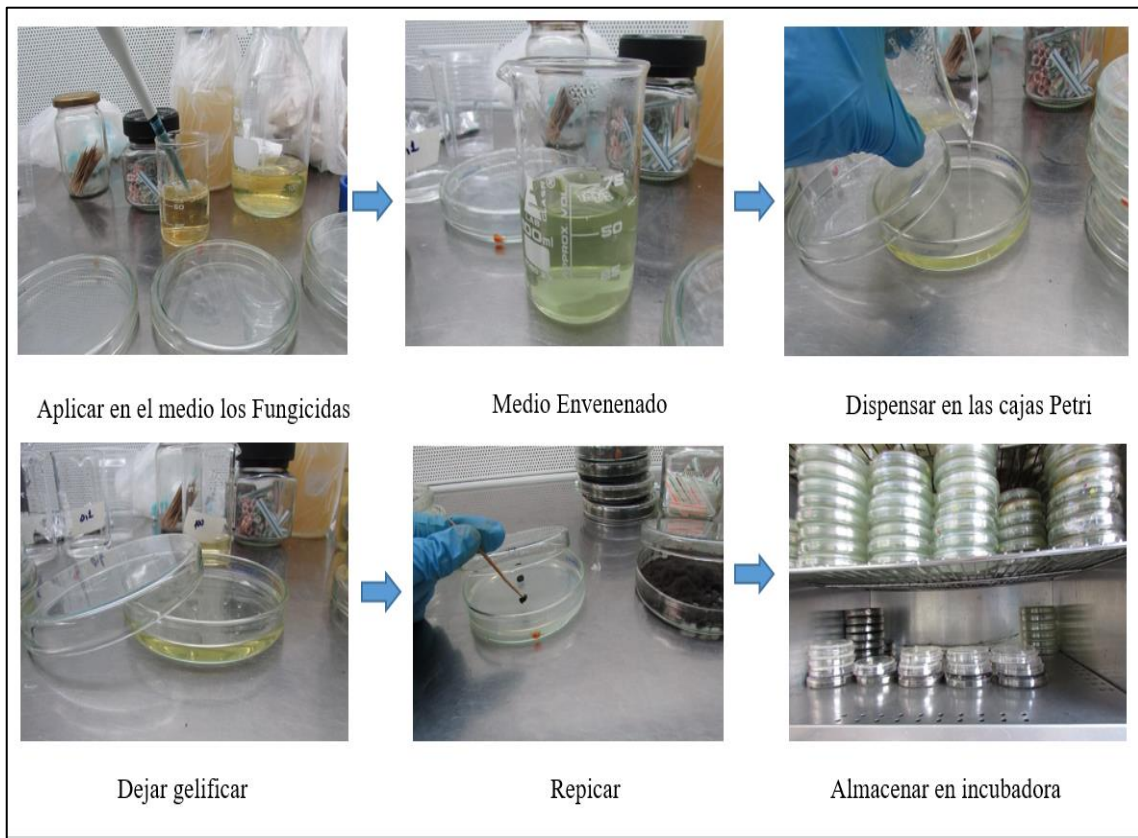
0,1 ppm = 5 mL de agua destilada estéril y 0,5 mL de la solución 1 ppm.

0 ppm = Control

## ANEXO B: PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN STOCK



**ANEXO C: ENMENDADO DEL MEDIO DE CULTIVO Y REPIQUE**

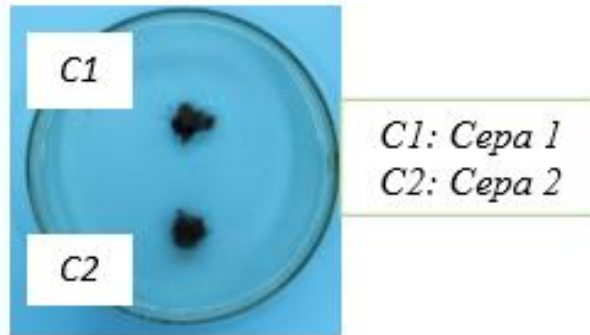


**ANEXO D : CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* (PAT.) GRIFFON & MAUBL. QUE FUERON UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE SENSIBILIDAD IN VITRO A FUNGICIDAS**

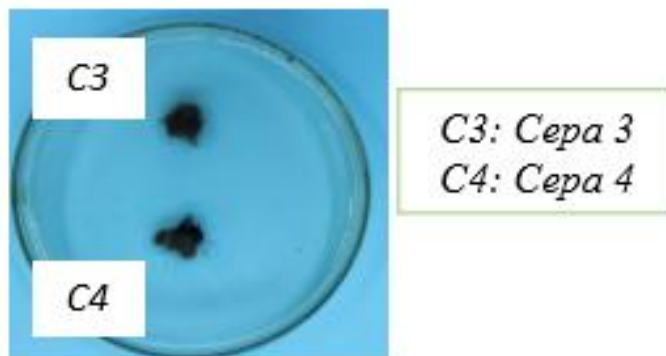
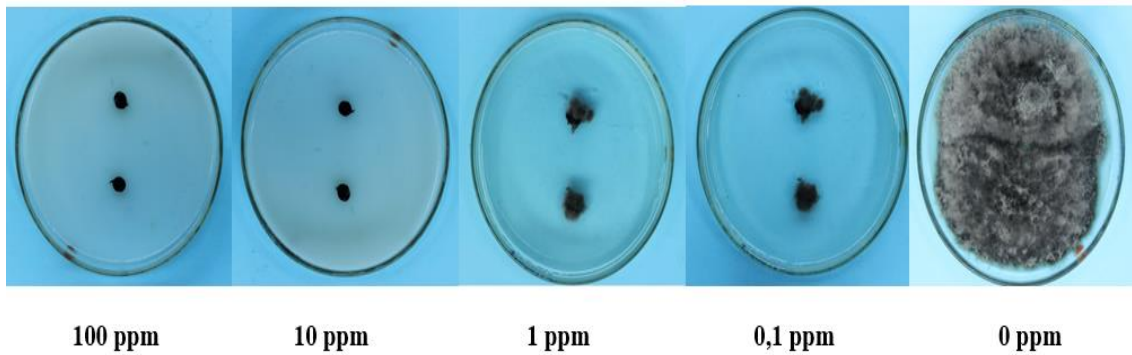
<b>PROPIETARIO</b>	<b>CÓDIGO</b>	<b>LOCALIDAD</b>	<b>HOSPEDERO</b>
Sr. Guillermo Rojas	GR.4	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX2.4	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX3.10	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX3.4	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Rodrigo Yépez	PGL2.4	Pedro Vicente Maldonado/La Celica	<i>Hylocereus</i> spp.
Sra. Norma Lalvay	NL.4	Pedro Vicente Maldonado/La Celica/El Cisne	<i>Hylocereus</i> spp.

Realizado por: Torres Nicole, 2022.

**ANEXO E: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON TIABENDAZOL.**

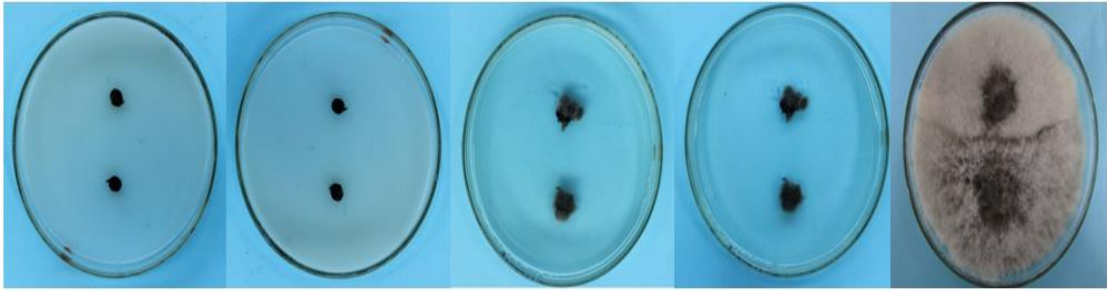


**Tiabendazol**





## Tiabendazol



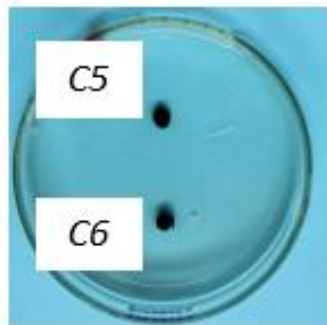
100 ppm

10 ppm

1 ppm

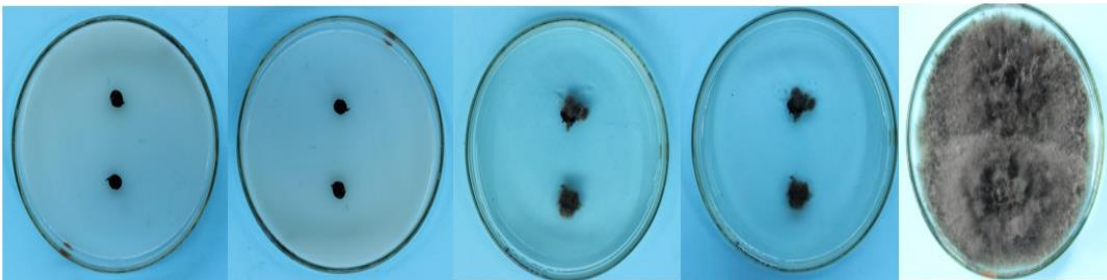
0,1 ppm

0 ppm



C5: Cepa 5  
C6: Cepa 6

## Tiabendazol



100 ppm

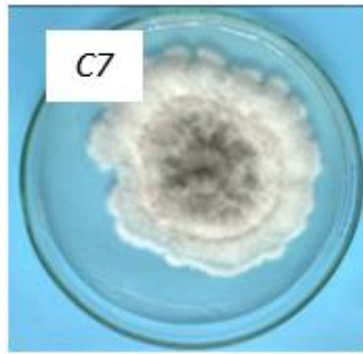
10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

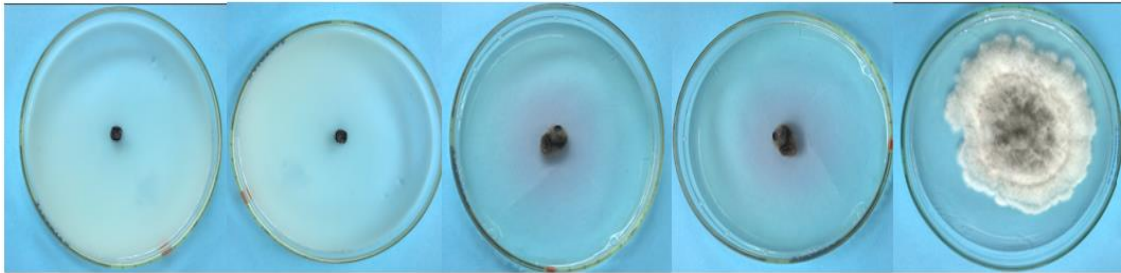
0 ppm





C7: Cepa 7

### Tiabendazol



100 ppm

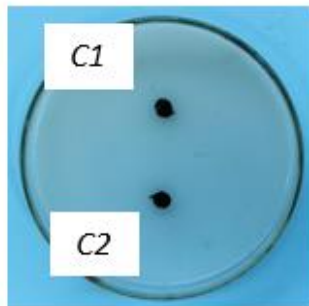
10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

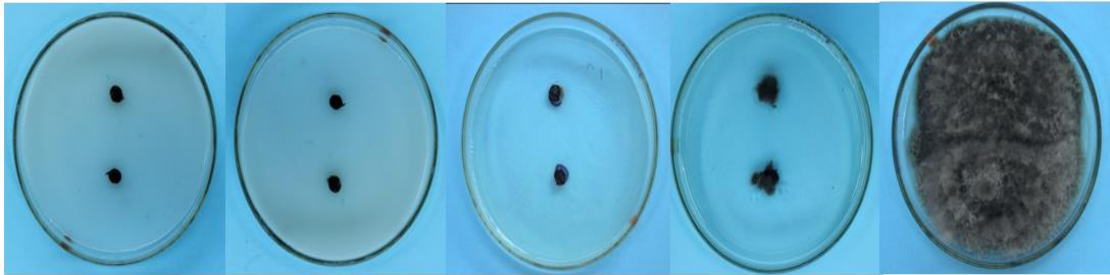
0 ppm

### ANEXO F: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON TEBUCONAZOL



C1: Cepa 1  
C2: Cepa 2

## Tebuconazol



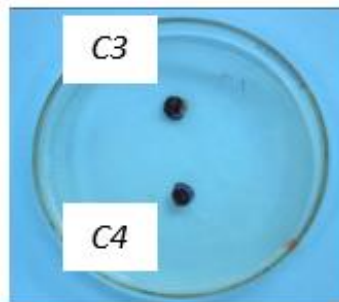
100 ppm

10 ppm

1 ppm

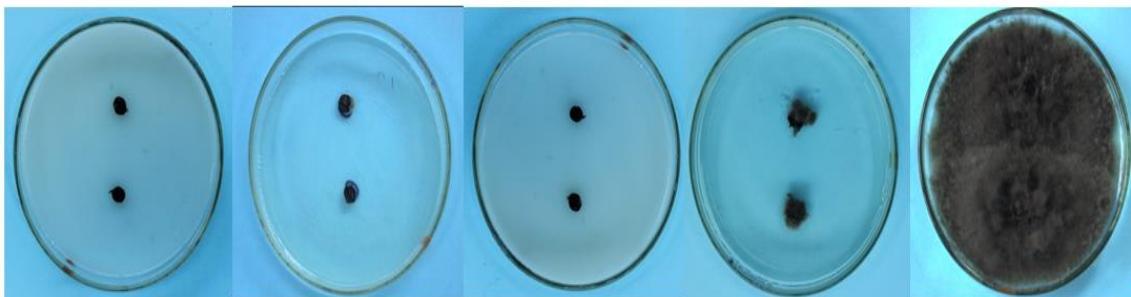
0,1 ppm

0 ppm



*C3: Cepa 3*  
*C4: Cepa 4*

## Tebuconazol



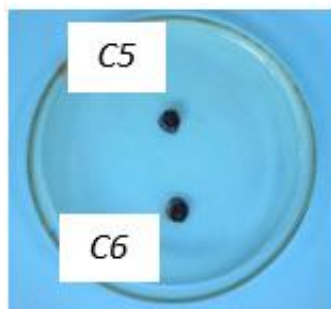
100 ppm

10 ppm

1 ppm

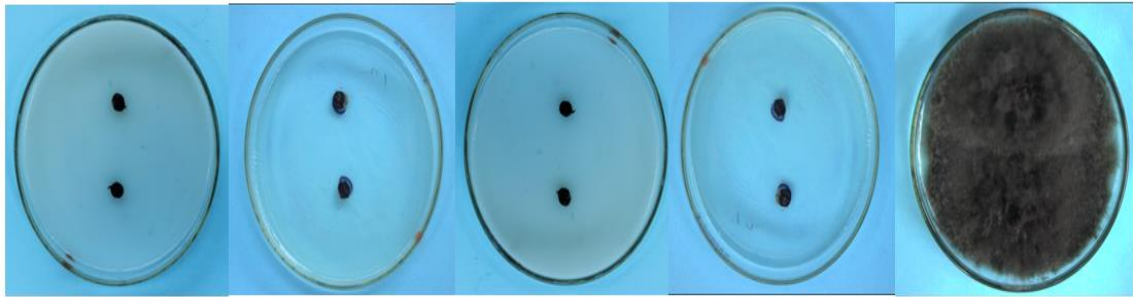
0,1 ppm

0 ppm



*C5: Cepa 5*  
*C6: Cepa 6*

## Tebuconazol



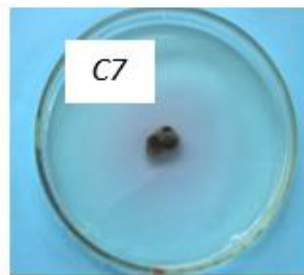
100 ppm

10 ppm

1 ppm

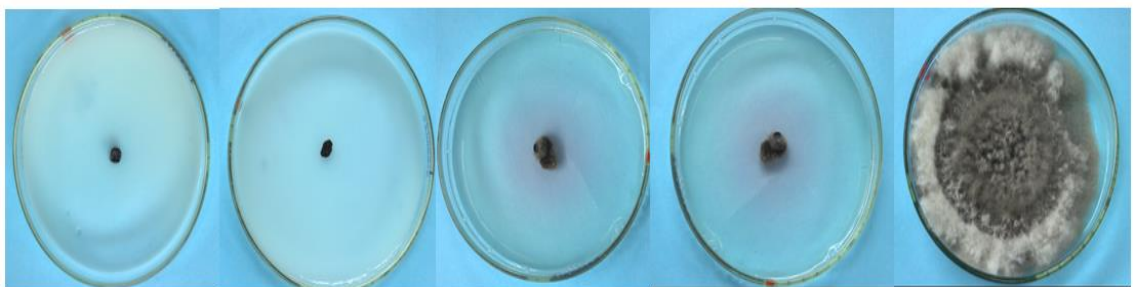
0,1 ppm

0 ppm



C7: Cepa 7

## Tebuconazol



100 ppm

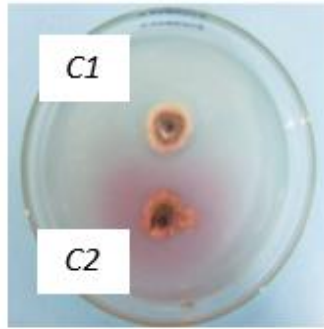
10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

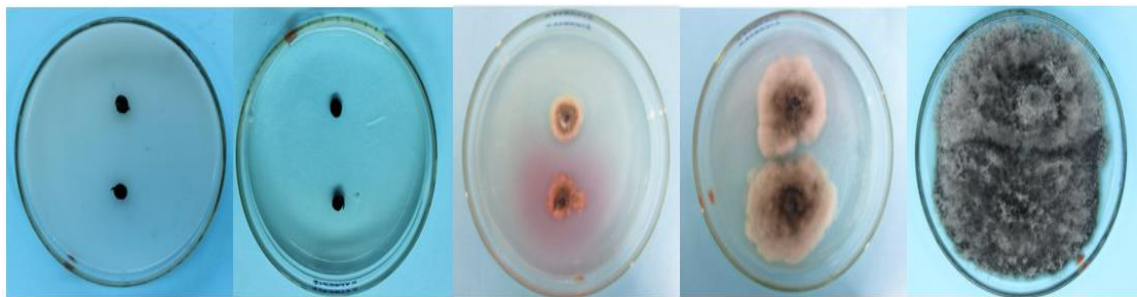
0 ppm

**ANEXO G: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON TIOFANATO DE METIL**



C1: Cepa 1  
C2: Cepa 2

### Tiofanato de metil



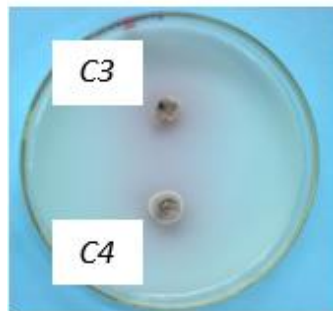
100 ppm

10 ppm

1 ppm

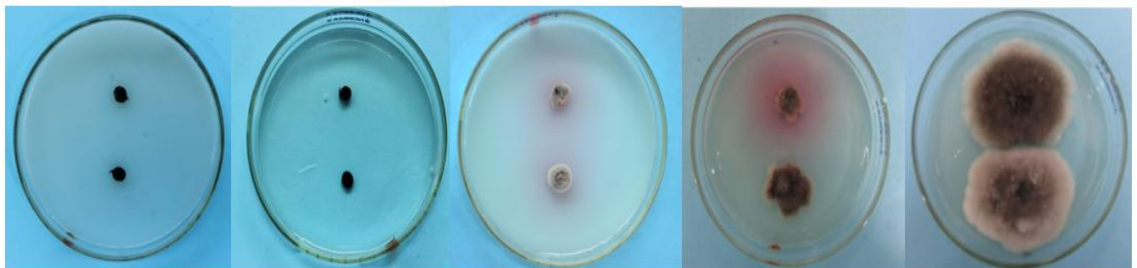
0,1 ppm

0 ppm



C3: Cepa 3  
C4: Cepa 4

### Tiofanato de metil



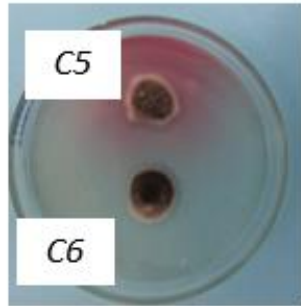
100 ppm

10 ppm

1 ppm

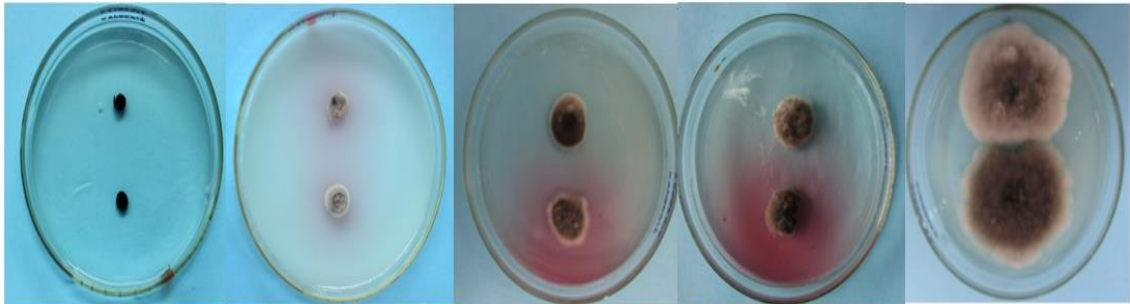
0,1 ppm

0 ppm



C5: Cepa 5  
C6: Cepa 6

### Tiofanato de metil



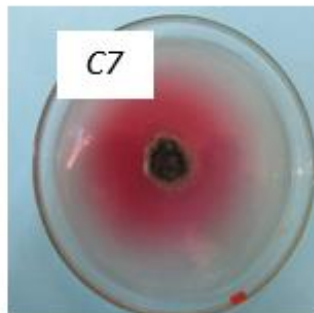
100 ppm

10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

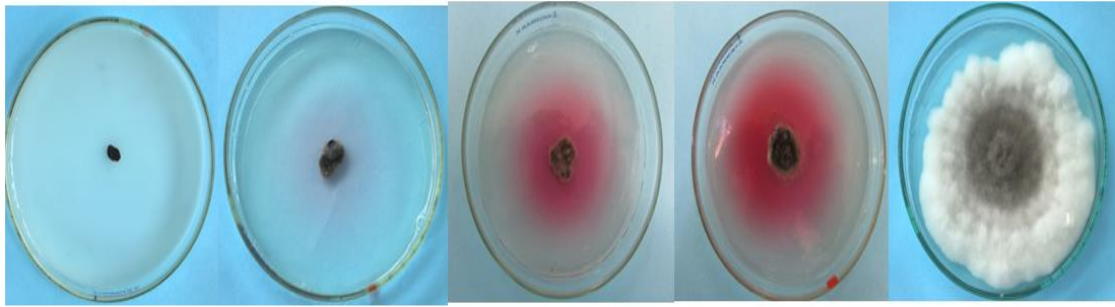
0 ppm



C7: Cepa 7



## TIOFANATO DE METIL



100 ppm

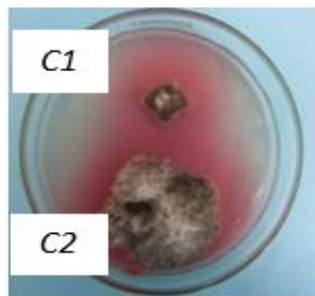
10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

0 ppm

### ANEXO H: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON DIFENOCONAZOL

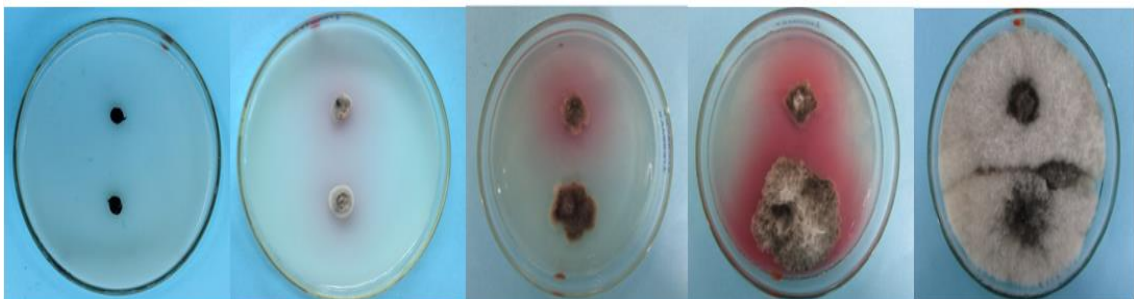


C1

C2

C1: Cepa 1  
C2: Cepa 2

## Difenoconazol



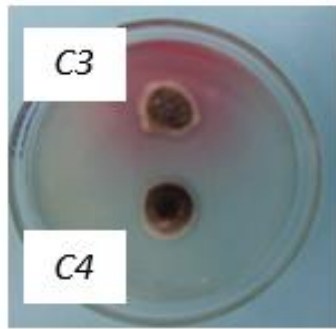
100 ppm

10 ppm

1 ppm

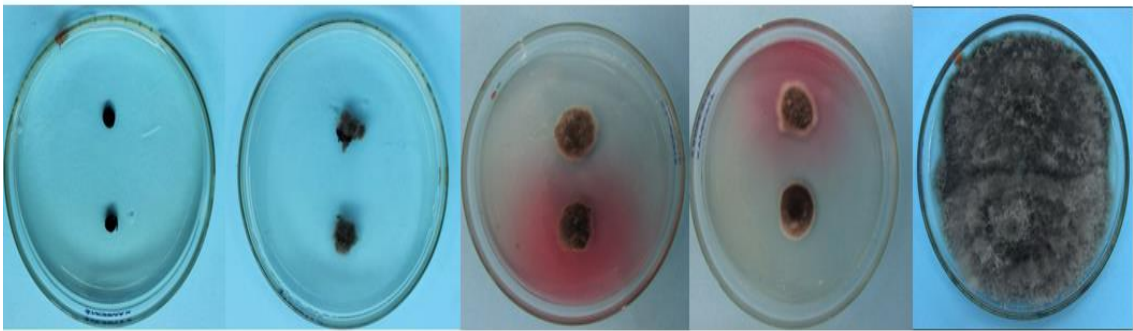
0,1 ppm

0 ppm



C3: Ceba 3  
C4: Ceba 4

## Difenoconazol



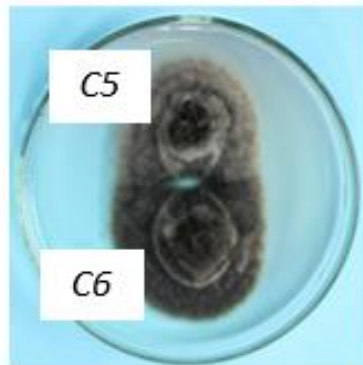
100 ppm

10 ppm

1 ppm

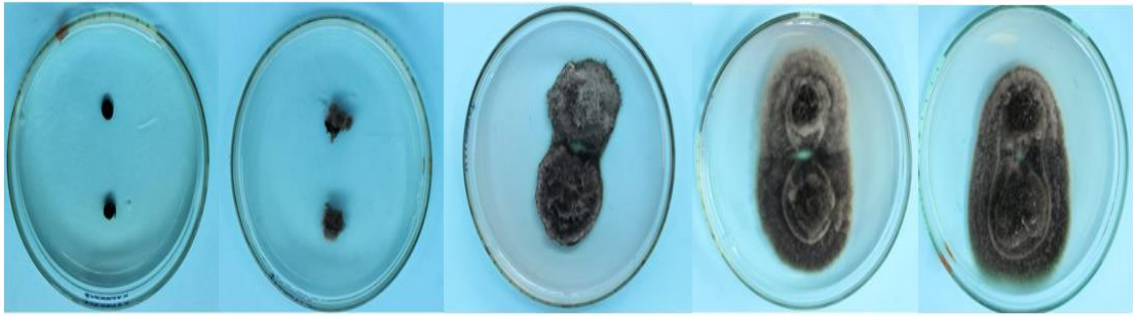
0,1 ppm

0 ppm



C5: Ceba 5  
C6: Ceba 6

## Difenoconazol



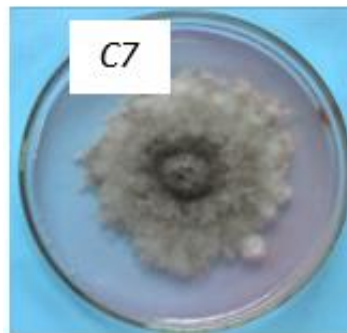
100 ppm

10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

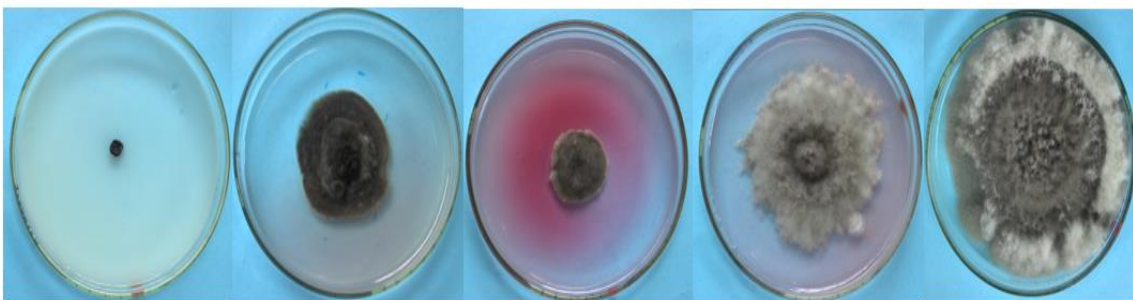
0 ppm



C7

C7: Cepa 7

## Difenoconazol



100 ppm

10 ppm

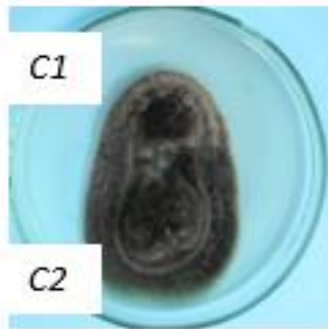
1 ppm

0,1 ppm

0 ppm

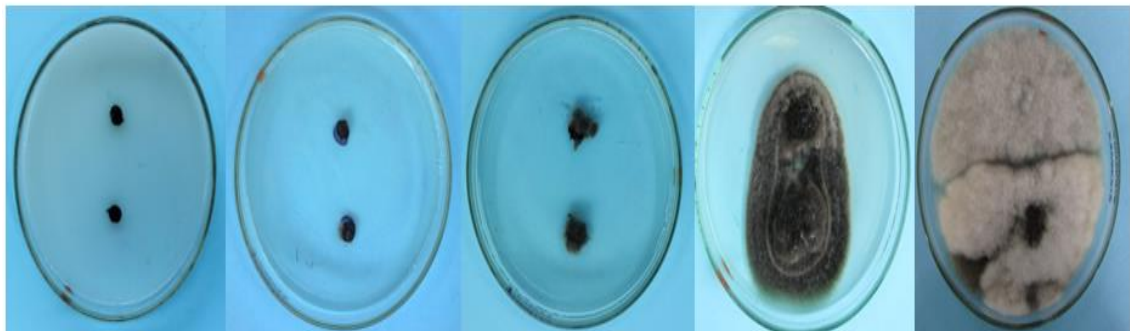
**ANEXO I:** CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON PYRACLOSTROBIN





C1: Cepa 1  
C2: Cepa 2

**Pyraclostrobin**



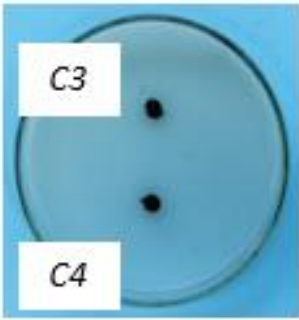
100 ppm

10 ppm

1 ppm

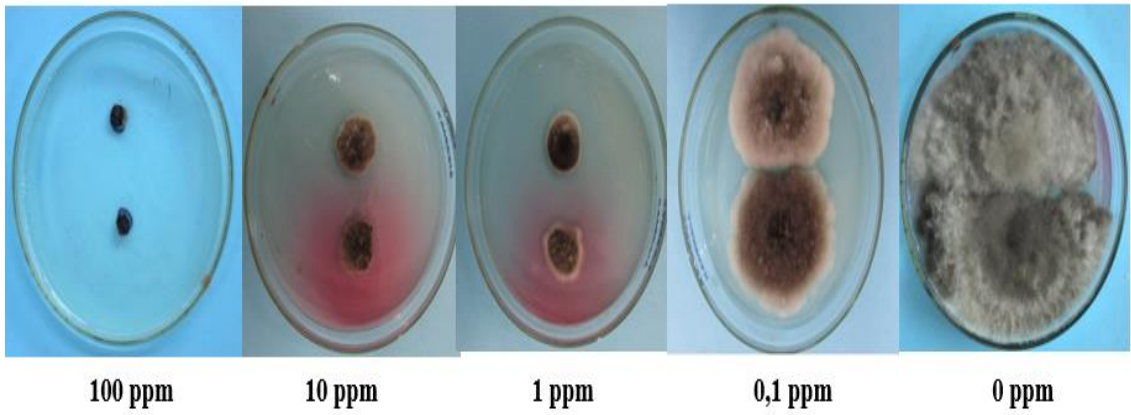
0,1 ppm

0 ppm



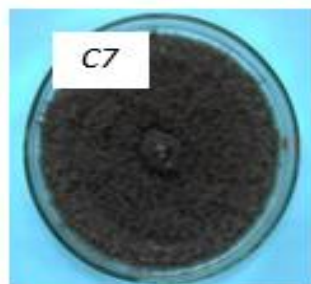
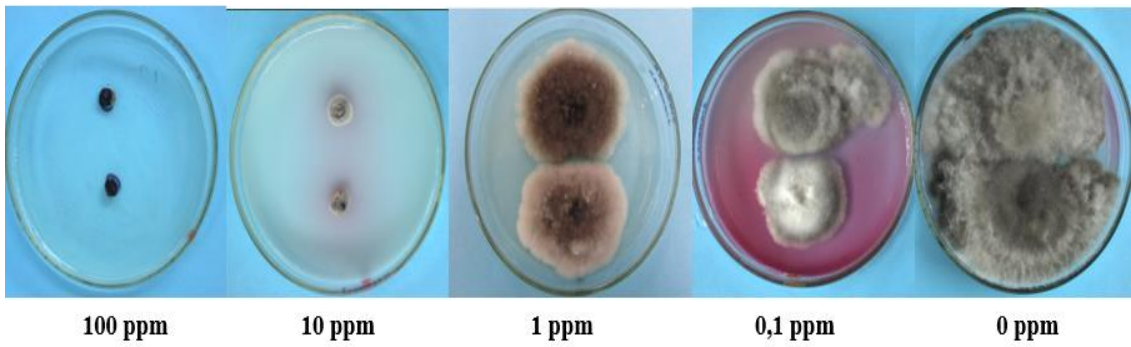
C3: Cepa 3  
C4: Cepa 4

## Pyraclostrobin



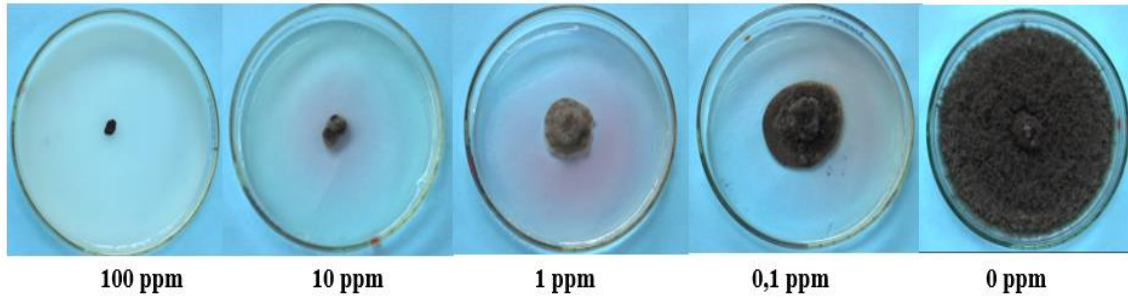
C5: Ceba 5  
C6: Ceba 6

## Pyraclostrobin

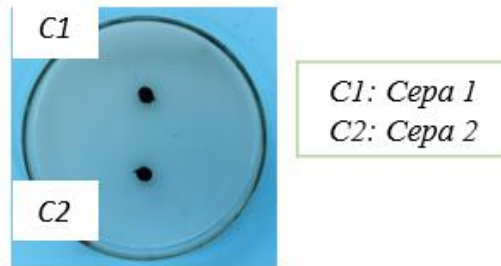


C7: Ceba 7

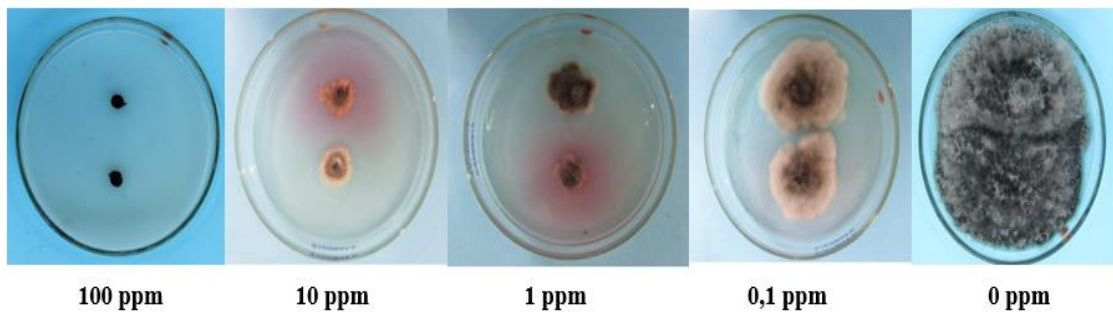
## Pyraclostrobin



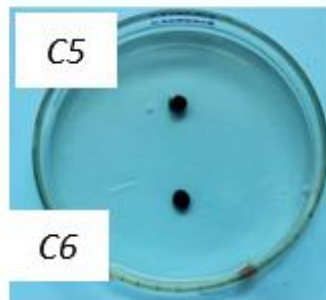
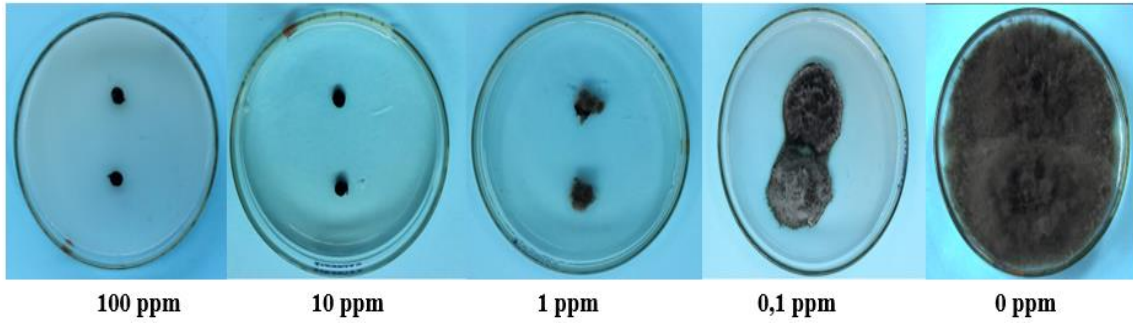
### ANEXO J: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON CYPRODINIL



## Cyprodinil

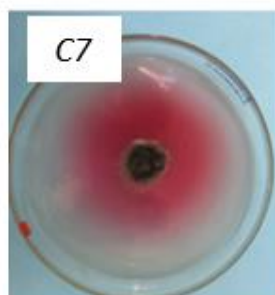
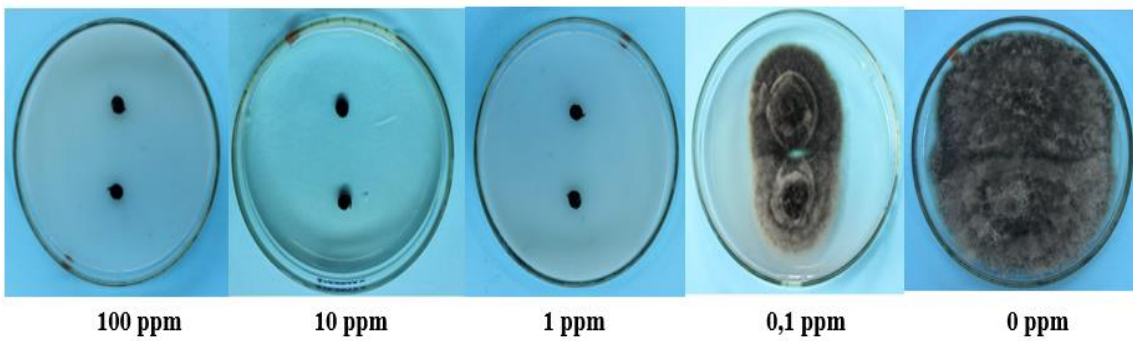


## Cyprodinil



*C5: Cepa 5*  
*C6: Cepa 6*

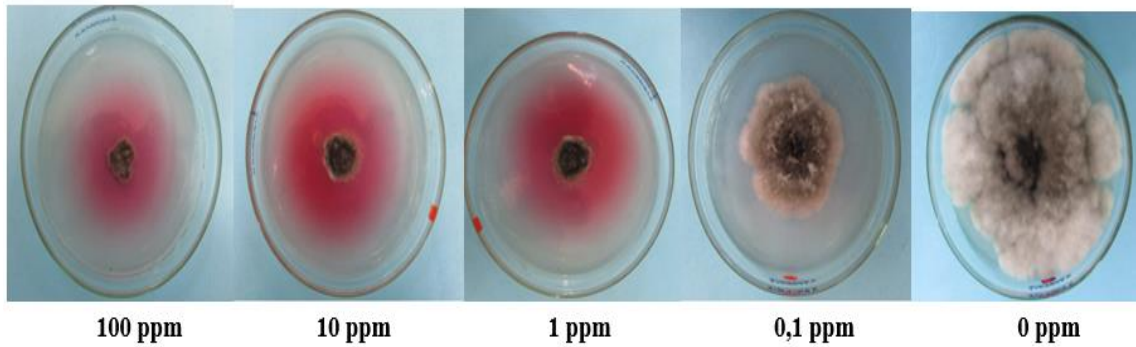
## Cyprodinil



*C7: Cepa 7*



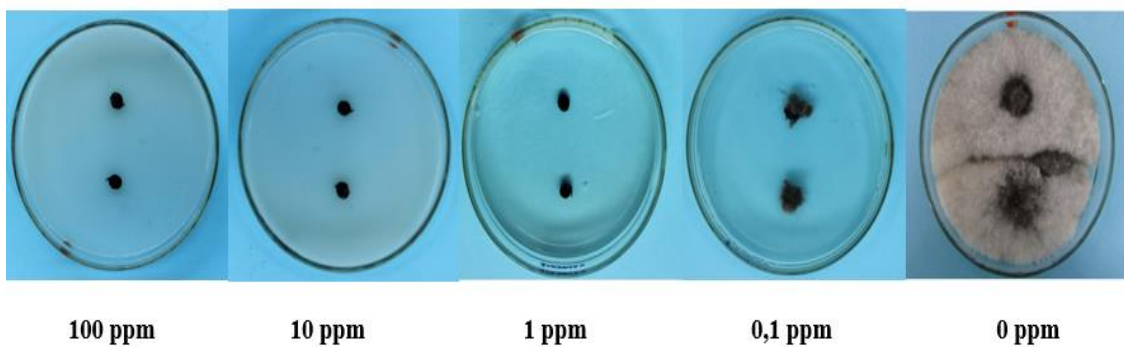
## Cyprodinil



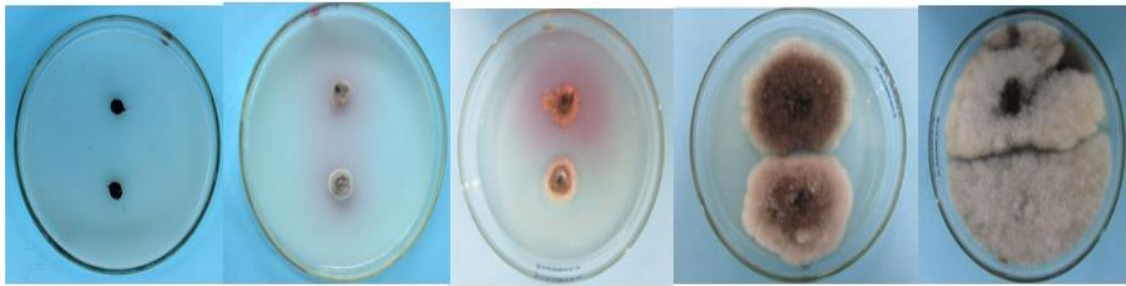
### ANEXO K: CRECIMIENTO DE LAS CEPAS DE *Lasiodiplodia theobromae* EN CAJAS PETRI ENMENDADO CON SULFATO DE COBRE



## Sulfato de cobre



## Sulfato de cobre



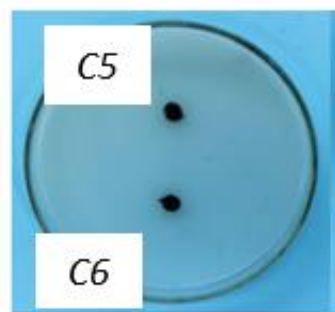
100 ppm

10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

0 ppm



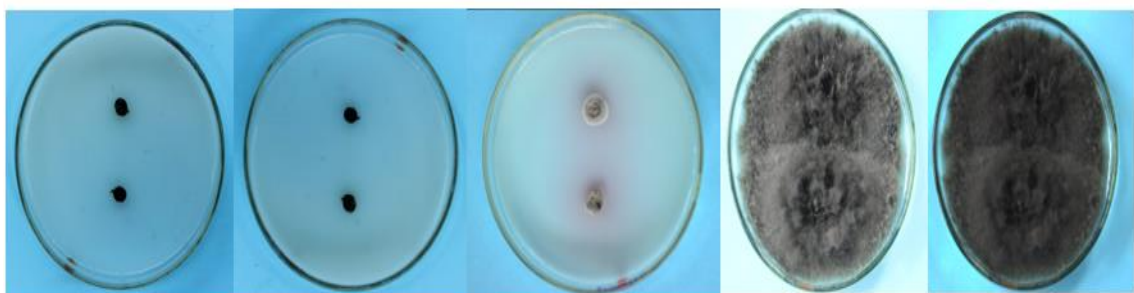
C5

C6

*C5: Cepa 5*

*C6: Cepa 6*

## Sulfato de cobre



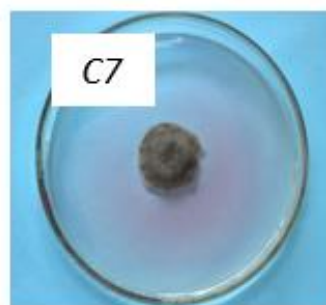
100 ppm

10 ppm

1 ppm

0,1 ppm

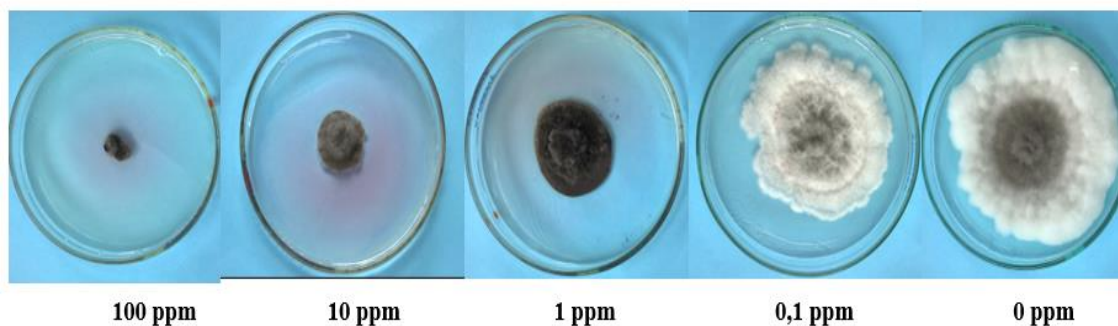
0 ppm



C7

*C7: Cepa 7*

## Sulfato de cobre



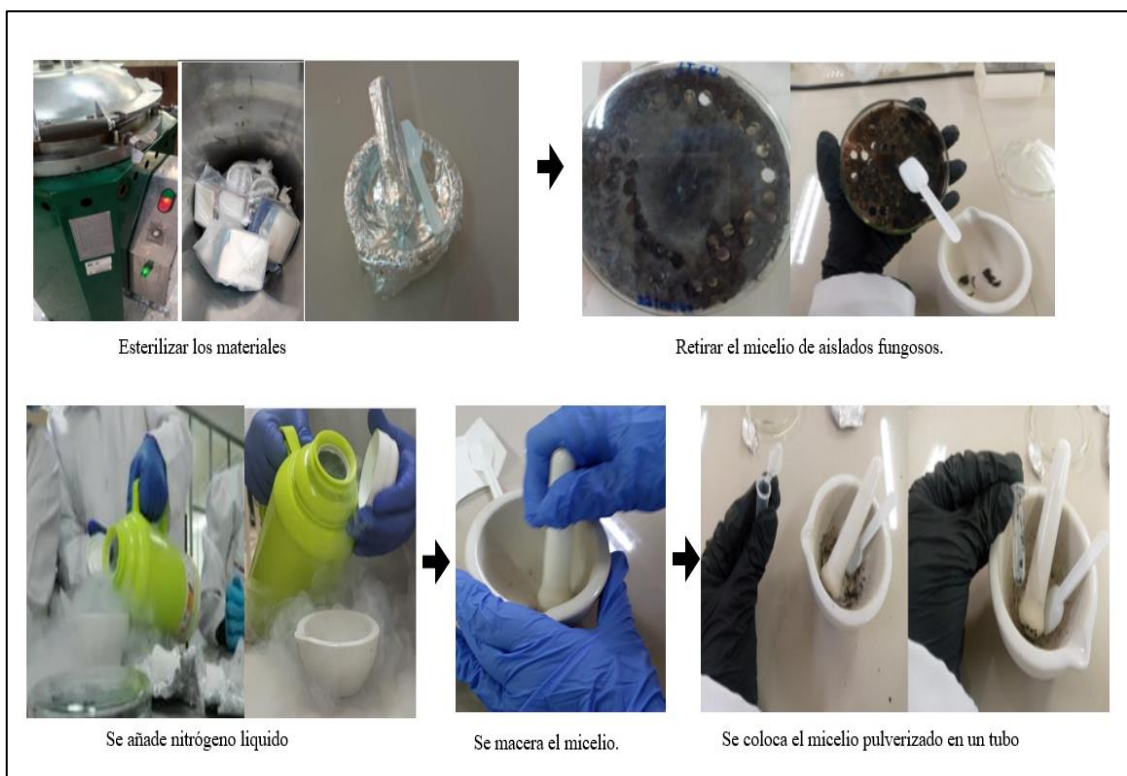
**ANEXO L:** MICELIO DE *Lasiodiplodia theobromae* (PAT.) GRIFFON & MAUBL. QUE FUERON UTILIZADAS EN EL ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

PROPIETARIO	CÓDIGO	LOCALIDAD	HOSPEDERO
Sr. Guillermo Rojas	GR.4	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX2.4	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX3.10	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX3.4	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Rodrigo Yépez	PGL2.4	Pedro Vicente Maldonado/La Celica	<i>Hylocereus</i> spp.
Sra. Norma Lalvay	NL.4	Pedro Vicente Maldonado/La Celica/El Cisne	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Guillermo Rojas	GR.14	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Rodrigo Yépez	PRY.1	Pedro Vicente Maldonado/La Celica	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Rodrigo Yépez	PGL2.3	Pedro Vicente Maldonado/La Celica	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX3.5	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.
Ing. Mario Moscoso	MX2.5	Pedro Vicente Maldonado/Bonanza	<i>Hylocereus</i> spp.

Ing. Gustavo Narváez	GN.4	Los Bancos	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Guillermo Rojas	GR.10	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Guillermo Rojas	GR.16	Pedro Vicente /La Celica/15 de mayo	<i>Hylocereus</i> spp.
Sr. Cesar Silva	CS9	Pedro Vicente Maldonado / La Celica/El Cisne	<i>Hylocereus</i> spp.

Realizado por: Torres Nicole, 2023.

### ANEXO M: EXTRACCIÓN DE ADN







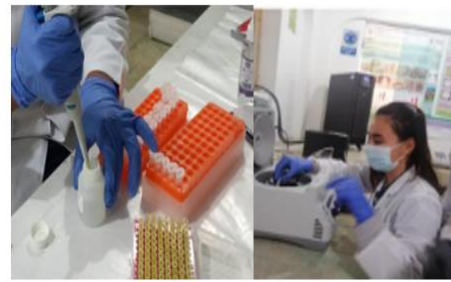
Adición de solución nuclei



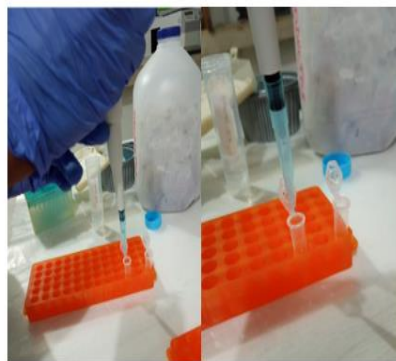
Llevar al vortex por 3 segundos



Colocar las muestras en el termobloque (65°C), por 15 min volteando las muestras cada 5 min



Adicionar 200  $\mu$ l de protein precipitation solution y luego colocar al vortex por 20 s. Centrifugar por 10 min



Transferencia de sobrante a un nuevo tubo



Añadir clorofórm-alcohol-isoamílico, vortex por 20 seg y Centrifugar por 10min a 14000 rpm.



Centrifugar a 14000 rpm por 10 min



Formación del pellet



Descarte de sobrante y se deja secar de forma horizontal

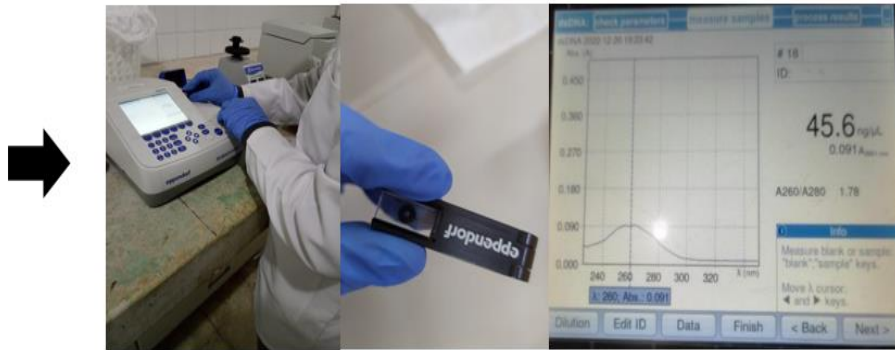
## ANEXO N: REHIDRATACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ADN



Adicionar 50  $\mu$ l de Rehydration solution y 2  $\mu$ l de RNasa en cada tubo.

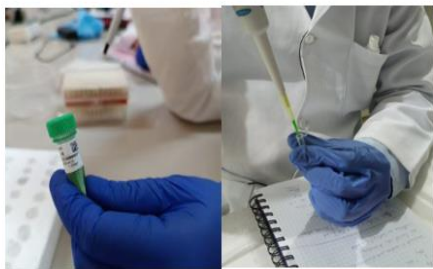


Colocar los tubos en el termobloque (37°C), durante 3 horas

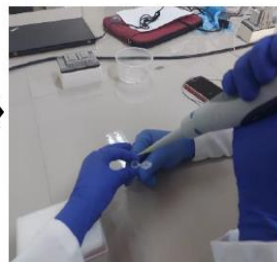


Colocar 2  $\mu$ l de solución de rehidratación como blanco y posteriormente 2  $\mu$ l ADN extraído para cuantificarlo

## ANEXO O: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)



Colocar en el tubo 6,25  $\mu$ L de GoTaq HOT STAR Master Mix



Añadir 2  $\mu$ L del Primer RAPDs



Añadir 2,5  $\mu$ L de agua ultra pura



Mix listo



Centrifugar por 5 min a 14000 rpm.



Añadir en los microtubos 10,5  $\mu$ L del master mix preparado y agregar 2  $\mu$ L de ADN.

Colocar las muestras en un termociclador

## ANEXO P: ELECTROFORESIS

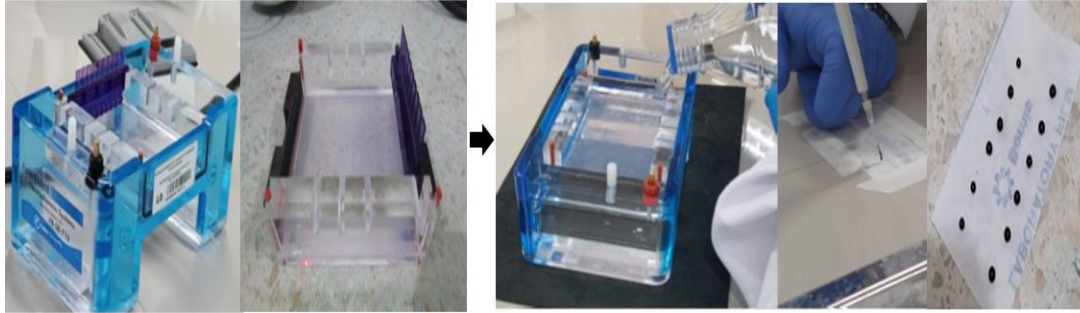
Reactivos para TBE Y Gel de agarosa.

Colocar 45 ml de TBE y se coloca en la botella de 500 ml

Pesar los 0,6 g de gel de agarosa en el matraz Erlenmeyer de 500 ml.

Luego llevar al microondas por un tiempo 15 a 20 s

Colocar el agente intercalante 3  $\mu$ l en el gel de agarosa, luego lentamente se vierte en el molde



Ubicar los pocillos del gel en posición del polo negativo al polo positivo y dejar gelificar

Cubrir la superficie del gel con la solución de buffer TBE  
Luego colocar sobre una cinta de Parafilm 2  $\mu$ l de buffer y 2  $\mu$ l del producto de PCR



Se transfiere la mezcla a cada pocillo



Tapar y conectar, programar el tiempo 60 min a 90 V 70 A y esperar.

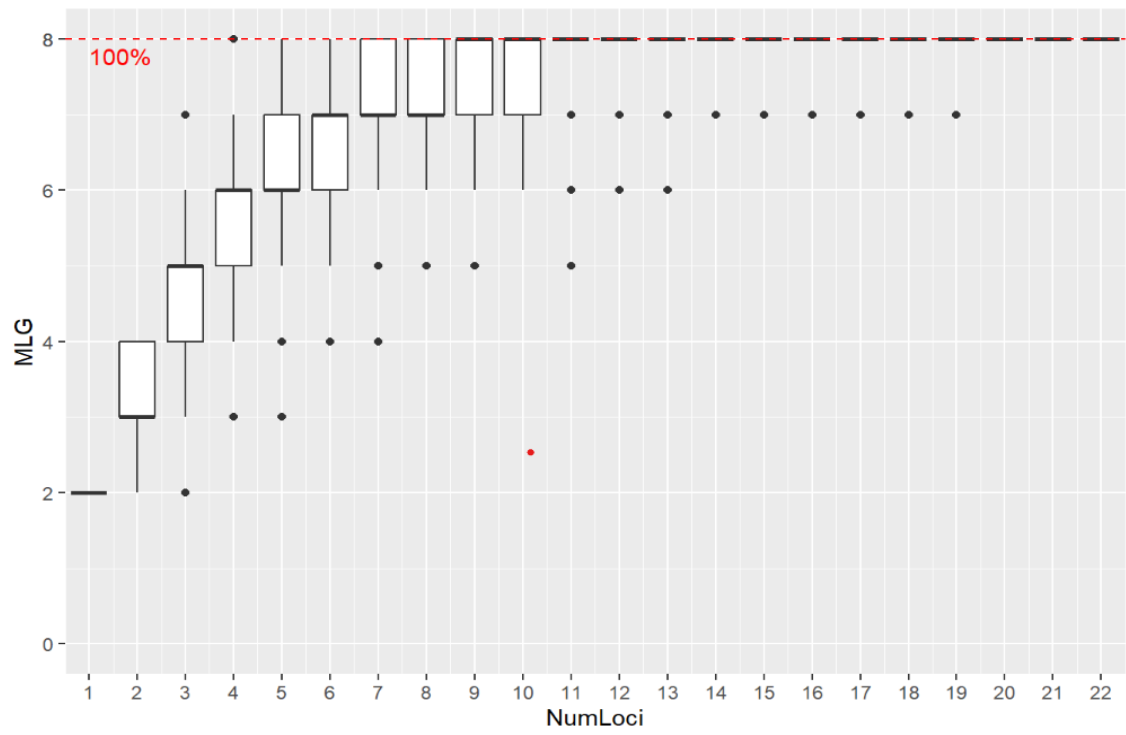


Revelar el gel y contabilizar el numero de bandas generadas

#### ANEXO Q: CALIDAD Y CANTIDAD DE ADN

Código	ng/ $\mu$ L	A 260/280	A 280/230
GR.4	57,4	1,73	6,72
MX2.4	986,7	1,48	1,42
MX3.10	24,6	1,45	3,45
MX3.4	54,6	1,71	6,44
PGL2.4	312,1	1,69	1,33
NL.4	892,5	1,05	1,02
GR.14	37,5	1,59	4,17

## ANEXO R: GRAFICA DE RIQUEZA





espo

Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 26 / 06 / 2023

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> Nicole Carolina Torres Revelo
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<b>Facultad:</b> Recursos Naturales
<b>Carrera:</b> Agronomía
<b>Título a optar:</b> Ingeniera Agrónoma
<b>f. responsable:</b> Ing. Cristhian Fernando Castillo Ruiz

  
Cristhian Fernando Castillo Ruiz



1097-DBRA-UTP-2023