

**Identificación de microorganismos asociados al
necrosamiento de tallo, en morera *Morus* sp. en la
meseta de Popayán**

Luz Marina Garzón

Universidad del Cauca
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Ciencias Agrarias
Popayán, Colombia
2019

Identificación de microorganismos asociados al necrosamiento de tallo, en morera *Morus* sp. en la meseta de Popayán

Luz Marina Garzón

Trabajo de investigación presentado como requisito para optar el título de:
Magister en Ciencias Agrarias

Directores

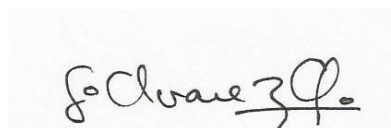
M.Sc. Germán Álvarez Ayala

Ph D. Martha Almanza Pinzón

Universidad del Cauca
Facultad de Ciencias Agrarias
Maestría en Ciencias Agrarias
Popayán, Colombia
2019

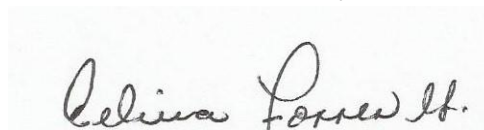
Nota de aceptación

El director y los jurados han leído el presente documento, escucharon la sustentación del mismo por sus autores y lo encuentran satisfactorio.

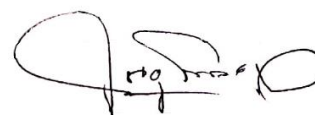


M.Sc. Germán Álvarez Ayala
Ingeniero agrónomo
Director

Ph D. Ivan paz
Ingeniero agrónomo
Presidente de jurado



M.Sc. Celina Torres
Ingeniero Agrónomo
Jurado



M.Sc. Jorge Enrique Gómez
Ingeniero Agrónomo
Jurado

Popayán, 4 de septiembre de 2019

Dedicatoria

A mi madre que ha sido
mi Motivación y
ejemplo para salir
adelante.

Agradecimientos

Al director y codirectora el M.Sc. Germán Álvarez Ayala y la Ph D. Martha Almanza Pinzón por su acompañamiento durante el trabajo de investigación.

Al Proyecto “Desarrollo Tecnológico para la Obtención de Productos Orgánicos e Innovadores de Seda Natural” Convenio Gobernación del Cauca- Universidad del Cauca y a su directora, la Ph.D. Martha I. Almanza por el apoyo financiero .

Al laboratorio de microscopia de la Universidad del Cauca por el acceso a equipos para el desarrollo de la investigación.

A los técnicos Arley Delgado y Robinson Mera encargados del manejo del cultivo de morera por su valiosa colaboración durante el trabajo de investigación.

Resumen

La Sericultura, es el conjunto de actividades culturales y económicas que se desarrollan en torno a la cría y explotación del gusano de seda, donde la morera es su único alimento; el follaje puede ser afectado por la presencia de patógenos que inciden en la calidad de la seda. Dentro del proyecto 'Desarrollo tecnológico para la obtención de productos orgánicos e innovadores de seda natural', se implementó un cultivo de morera, donde se detectó una sintomatología consistente en el necrosamiento de la base y parte media del tallo; que afecta plantas de cualquier edad y disminuye la calidad de las hojas. La enfermedad es favorecida por la época de lluvias y alta humedad relativa. El objetivo del trabajo fue identificar el agente causal de esta patología mediante la aplicación de los postulados de Koch. Fragmentos de tallos fueron aislados en cuatro medios de cultivo e incubados a dos temperaturas; posteriormente se caracterizó morfológica, patogénica y molecularmente los hongos aislados. El análisis de resultados se realizó utilizando un diseño factorial y se analizó mediante comparación de medias, evaluando la interacción de las variables. Para la identificación de los organismos, se utilizó la prueba molecular mediante la secuencia de región ITS, la cual precisó la presencia de hongos del género *Phoma exigua* y *Myrothecium*. Los resultados mostraron diferencias en el crecimiento entre hongos, medios, temperaturas e interacción de estos. En los sistemas de inoculación se observó que en ramas menores de 30 cm inoculadas con *Myrothecium* en la parte media, la enfermedad avanzó con rapidez. En ramas mayores y menores de 30 cm inoculadas con *Phoma*, el método que favoreció la infección fue el de herida en comparación con el de punción; se encontró que el micelio de los hongos utilizado como inóculo, ocasionó mayor daño que la suspensión de esporas.

Palabras claves: Morera, *Phoma exigua*, *Myrothecium sp*, inoculación, hongos, infección, síntomas.

Abstract

The Sericulture, is the set of cultural and economic activities that are developed around the breeding and exploitation of the silkworm, where the mulberry is its only food; foliage can be affected by the presence of pathogens that affect the quality of silk.

In that crop affecting plants of any age, necrosis was detected in stem bases and middle part of some branches; it decreasing leaves quality and quantity. Prolonged rains periods and high relative humidity favors this disease. This work objective was to identify the causing agent by means of applying the Koch postulates. Fragments of diseased stems were isolated and cultured in four culture media, also it was incubated at two temperatures; then, the isolated fungi were morphologically, pathogenically and molecularly characterized. Statically analysis of pathogenicity and fungal growth tests was carried out using a factorial design; it was carried out by comparing the means and evaluating interaction of each variable. To identify genus of pathogenic organisms a molecular test was used by sequence analysis of ITS region, it stated that this pathology is caused by fungi of genus *Phoma exigua* and *Myrothecium*. The incubation temperatures, the culture media, as well as the interaction fungi-medium and fungi-temperature showed statistically significant differences in fungi's growth. In the inoculation systems used, middle part of branches less than 30 cm long inoculated with *Myrothecium*, was the site where disease progressed quicker. In larger and smaller branches than 30 cm long, inoculated with *Phoma exigua*, the inoculation method that favored a greater infection was a wound with scalpel compared to puncture wounds with a pin; It was also found that fungal mycelium caused more severe symptoms than with spores suspension.

Key words: Mulberry, *Phoma exigua*, *Myrothecium verrucaria* , inoculation, fungi, infection, symptoms.

Contenido

Listado de figuras	x
Listado de tablas	xii
Listado de anexos	xiii
Introducción	1
1 Marco Teórico y Estado del Arte	4
1.1 Generalidades de la morera <i>Morus</i> sp	4
1.2 Enfermedades que afectan el cultivo de morera	4
1.3 <i>Myrothecium verrucaria</i>	7
1.4 Género <i>Phoma</i>	8
1.4.1 Ciclo de vida del género <i>Phoma</i>	9
1.4.2 Tizón del tallo, <i>Phoma exigua</i>	10
2 Materiales y Métodos	12
2.1 Área de estudio	12
2.2 Evaluación en campo	12
2.3 Recolección del material vegetal para los aislamientos de hongos	13
2.4 Aislamiento de microorganismos en el laboratorio	14
2.5 Caracterización de los aislamientos	15
2.6 Conservación de aislamientos	15
2.7 Pruebas de patogenicidad	15
2.7.1 Producción de inóculo	16
2.7.2 Producción de material vegetal para inoculación	17
2.7.3 Enraizamiento de estacas	17
2.7.4 Métodos de inoculación	18

2.8	Análisis estadístico	19
2.9	Aplicación de los postulados de Koch	20
2.10	Genotificación molecular de microorganismos	21
2.10.1	Extracción y purificación del ADN	21
2.10.2	Condiciones para la amplificación (PCR)	22
2.10.4	Análisis de las secuencias e identificación a nivel de especie	22
2.11	Análisis microbiológico del suelo	23
3	Resultados y Discusión	24
3.1	Sintomatología presente en el campo	24
3.1.1	Síntomas observados en campo en la base de la rama	27
3.1.2	Síntomas observados en campo en la parte media de la rama	33
3.1.3	Síntomas de la parte interna de tallo en plantas de 16 a 18 meses	37
3.2	Aislamientos obtenidos	38
3.3	Pruebas de patogenicidad	40
3.3.1	Producción de inóculo	41
3.3.2	Crecimiento de los microorganismos patogénicos a 22±1 °C y 24±1 °C en diferentes medios de cultivo	41
3.3.3	Esporulación de microorganismos a 22±1 °C y 24±1 °C en cuatro medios de cultivo	45
3.4	Material vegetal para inoculación	48
3.5	Métodos de inoculación	48
3.6	Pruebas de patogenicidad	54
3.7	Genotipificación molecular de aislamientos	54
3.8	Caracterización morfológica	57
3.8.1	Características morfológicas del hongo <i>Myrothecium verrucaria</i>	59
3.8.2	Características morfológicas del hongo <i>Phoma exigua</i>	59
3.9	Síntomas en ramas inoculadas con <i>Myrothecium verrucaria</i>	61
3.9.1	Síntomas en ramas mayores de 30 cm inoculadas con <i>Myrothecium verrucaria</i>	61

3.9.2. Síntomas en ramas menores de 30 cm inoculadas con <i>Myrothecium verrucaria</i>	63
3.10.1 Síntomas en ramas mayores de 30 cm inoculadas con <i>Phoma exigua</i> (Parte media de la rama)	64
3.10.2 Síntomas en ramas menores de 30 cm inoculadas con <i>Phoma exigua</i> (Parte media de la rama)	67
3.10.3 Síntomas en ramas mayores de 30 cm inoculadas con <i>Phoma exigua</i> (Base de la Rama)	68
3.10.4 Síntomas en ramas menores de 30 cm inoculadas con <i>Phoma exigua</i> (Base de la Rama)	69
3.11 Análisis microbiológico del suelo	70
4 Conclusiones	76
5 Recomendaciones	77
6 Bibliografía Citada	78
Anexos	88

Listado de figuras

Figura 3.1 Obtención Del Material Vegetal Para Inoculación	18
Figura 3.2 Diluciones seriadas para análisis microbiológico del suelo	23
Figura 3.3 Plantas adultas afectadas por el necrosamiento a la base y parte media del tallo	25
Figura 3.4 Precipitación e incidencia de la enfermedad en los lotes 2, 5, 13 y 18 del CEV la Rejoya, durante el año 2017	27
Figura 3.5 Sintomatología del necrosamiento en la parte basal	28
Figura 3.6 Síntomas en plantas menores de 30 cm	28
Figura 3.7 Síntomas en plantas mayores de 30 cm	29
Figura 3.8 Sintomatología en la área foliar de la planta y estaca madre	30
Figura 3.9 Daño vascular causado por el patógeno en los tallos de morera	31
Figura 3.10 Síntomas en la parte media del tallo	34
Figura 3.11 Síntomas en el área foliar causadas por lesión en la parte media del tallo	34
Figura 3.12 Síntomas causados por lesión en la parte media del tallo	35
Figura 3.13 Daño vascular causado por el patógeno en los tallos de la parte media	35
Figura 3.14 Síntomas de la parte externa e interna de plantas provenientes del campo	38
Figura 3.15 Tallos con síntomas de la enfermedad utilizados para aislamientos en laboratorio	38
Figura 3.16 Respuesta de crecimiento de microorganismos en medios de cultivo	42
Figura 3.17 Respuesta del crecimiento de microorganismos en dos temperaturas	44
Figura 3.18 Proceso de inoculación de microorganismos	50
Figura 3.19 Postulados de Koch	54
Figura 3.20 Geles de agarosa	55
Figura 3.21 Dendograma de microorganismos	57
Figura 3.22 Morfología de microorganismos aislados en cuatro medios de cultivo	58
Figura 3.23 Características microscópicas del hongo <i>Myrothecium verrucaria</i> a 40x	59
Figura 3.24 Características macroscópicas y microscópicas del hongo <i>Phoma exigua</i> a aislado de la base de la rama a 40x y 100x	60

Figura 3.25 Características macroscópicas y microscópicas del hongo <i>Phoma exigua</i> a aislado de la base de la rama a 40x y 100x	61
Figura 3.26 Lesiones en plantas mayores de 30 cm, 8 días después de la inoculación	62
Figura 3.27 Lesión causada por <i>Myrothecium verrucaria</i>	64
Figura 3.28 Lesiones en la base y parte media de la rama causadas por <i>Phoma exigua</i> aislado de la parte media de la rama	66
Figura 3.29 Lesiones en ramas menores a 30 cm inoculadas en la base y parte media causadas por <i>Phoma exigua</i> aislado de la parte media de la rama	67
Figura 3.30 Lesiones ocasionadas en la base y parte media de la rama causados por <i>Phoma exigua</i> aislado de la base de la rama, en ramas de más de 30 cm	69
Figura 3.31 Lesiones ocasionadas en la base y parte media de la rama causadas por <i>Phoma exigua</i> aislado de la base de la rama con menos de 30 cm de longitud	70
Figura 3.32 Características morfológicas y microscópicas de microorganismos encontrados en suelos de los lotes 2, 5, 13 y 18 a 40x y 100x	72

Listado de tablas

Tabla 1 Composición de medios de cultivo para aislamiento de hongos	14
Tabla 2 Temperatura y humedad relativa en campo en el CEV, La Rejota	27
Tabla 3 Escala de severidad de la enfermedad en campo del síntoma de la base del tallo	32
Tabla 4 Escala de severidad de la enfermedad en campo del síntoma de la parte media del tallo	36
Tabla 5 Características de los aislamientos obtenidos de los síntomas de la base, parte media de la rama, tallo y raíces de plantas de 16-18 meses	39
Tabla 6 Crecimiento de aislamientos incubados a dos temperaturas y aislados en cuatro medios de cultivo	41
Tabla 7 Nivel de significancia ($P < 0,05$) entre las condiciones de crecimiento de los hongos estudiados	42
Tabla 8 Morfología y esporulación de hongos a 22 ± 1 °C en cuatro medios de cultivo	45
Tabla 9 Morfología y esporulación de hongos a 24 ± 1 °C en cuatro medios de cultivo	47
Tabla 10 Resultados nivel de significancia del crecimiento de la lesión en pruebas de patogenicidad evaluado por comparación de medias del PA1	52
Tabla 11 Resultados nivel de significancia del crecimiento de la lesión en pruebas de patogenicidad evaluado por comparación de medias de 38 (Base de la rama)	53
Tabla 12 Resultados nivel de significancia del crecimiento de la lesión en pruebas de patogenicidad evaluado por comparación de medias 38 (Parte media de la rama)	53
Tabla 13 Descripción macroscópica de microorganismos encontrados en suelos de los lotes 2, 5, 13 y 18	71

Listado de anexos

Anexo A Medios de cultivo	88
Anexo B Protocolo de Inoculación	93
Anexo C Protocolo de enraizamiento de estacas	94
Anexo D Incidencia de la enfermedad y precipitación en el año 2017	95
Anexo E Análisis de varianza de pruebas de patogenicidad	95
Anexo F Análisis molecular	99

Introducción

La Sericultura, es el conjunto de actividades culturales y económicas que se desarrollan en torno a la cría y explotación del gusano de seda, *Bombyx mori* (Pescio *et al.*, 2008); integra tres componentes: el agrícola con el cultivo de la morera *Morus* sp, el pecuario con la cría del gusano de seda y el agroindustrial, con la transformación del hilo en la industria textil, la industria cosmetológica y la medicina (Cifuentes y Sohn, 1998).

Según PADEMÉR (2003), en Colombia desde la década de los 80, la sericultura se convirtió en una alternativa para la diversificación de las actividades productivas del campo y contribuyó al mejoramiento de los ingresos y condiciones de vida de las familias campesinas. En Colombia y en el departamento del Cauca, la sericultura ha sido una actividad importante desde hace más de 30 años, a nivel nacional los departamentos del actual eje cafetero, el Valle del Cauca, Antioquia y Santander fueron productores de capullo de gusano de seda; en el Cauca surgió esta actividad especialmente en los municipios de Morales, Timbío y El Tambo, en un principio, y posteriormente en Popayán, Piendamó y Santander de Quilichao, donde la sericultura se convirtió en una alternativa para la diversificación de la caficultura especialmente, y contribuyó al mejoramiento de los ingresos y condiciones de vida de las familias campesinas dedicadas a la cría de gusanos de seda, y producción de capullos, la elaboración manual de hilos y artículos con calidad de exportación (Rodríguez *et al.*, 2012).

Cifuentes (2004), afirma que la morera es el único alimento del gusano de seda; dentro de una producción serícola, se hace un elemento fundamental; a nivel mundial existen diferentes especies reconocidas en su alimentación, entre estas se encuentran *Morus alba*, *Morus nigra*, *Morus indica*, *Morus bombycis*, *Morus formosimensis* (Torres, 1997), (Cifuentes y Sohn, 1998); el contenido nutricional de la morera es importante para la alimentación del gusano; tiene gran influencia en el desempeño de la fase larvaria y de encapullado (Takahashi *et al.*, 2000), además se ve reflejado en la calidad del hilo producido, el cual debe cumplir con estándares que permitan su utilización en la industria textil y en el campo de la medicina (Kim *et al.*, 2005).

La seda es un producto comercial importante para el departamento; sin embargo, la producción serícola se fundamentó en la adaptación de lo que se investigó en el Centro de Desarrollo Tecnológico para la Sericultura - CDTs, Risaralda, manteniendo este sistema hasta el momento; aún se cultiva las mismas variedades de morera que presentan relativa facilidad de reproducción, pero se desconoce su susceptibilidad a plagas, enfermedades y a condiciones ambientales adversas (Salas *et al.*, 2006).

La morera se cultiva en varios países y en diferentes condiciones ambientales, donde se han registrado diversas enfermedades producidas por hongos, bacterias y virus (Pescio *et al.*, 2008); en Colombia no se cuenta con la información suficiente, sobre enfermedades en el cultivo de morera, solo Cifuentes y Sohn en 1998, registraron la presencia de la Llaga de la raíz, *Rosellinia sp*, manchas foliares ocasionadas por *Cercospora moricola*, *Septogloeum mori*, *Alternaria* y *Helminthosporium*, Roya de la hoja *Aecidium mori*, mancha de fuego *Ascochyta moricola*, mancha marrón *Phleospora kuwacola*, pero estas enfermedades no han sido limitantes en la producción de hoja; así mismo, en el municipio de Barrancabermeja, Ríos (2011), se encontró *Colletotrichum gloeosporoides* afectando hojas maduras de morera. En el departamento del Cauca, en el año 2015 se implementó en la meseta de Popayán un cultivo de morera con 10.000 plantas de la variedad Kanva 2, donde se comenzó a detectar la presencia de una sintomatología consistente con el necrosamiento de la base del tallo y parte media de algunas ramas, causando bloqueo de haces vasculares de la rama y terminando en un colapso de la misma; esta afección se presentó en más del 60% de plantas en algunos lotes del cultivo, observándose la época de lluvias como factor predisponente, lo cual generó mucha expectativa por el potencial de daño que puede causar al cultivo, Comunicación verbal, con el M.Sc Germán Álvarez Ayala, (2018). La enfermedad ha estado presente en diferentes cultivos de la región, sin embargo, no se le ha prestado la suficiente atención porque aún no se considera como limitante para la producción de follaje, debido al manejo cultural de las podas que se realizan cada 70 a 90 días. Sin embargo, la enfermedad puede convertirse en una amenaza para el cultivo ya que aún se desconoce su etiología y forma de diseminación dificultando su control.

La morera es una planta que se emplea no solo para la alimentación del gusano de seda, sino como especie promisoría para la alimentación animal; con la identificación de patógenos y la determinación de la patogenicidad se podría iniciar un programa de manejo fitosanitario

integrado que permita a los cultivadores de morera garantizar una mejor producción y calidad de forraje para la alimentación animal, y en el caso de la sericultura, garantizar follaje sano para el gusano de seda. Además, se evitaría la posible diseminación de la enfermedad por multiplicación vegetativa. Teniendo en cuenta que el manejo de la plantación en el Departamento del Cauca es orgánico, se hace esencial identificar su agente causal y establecer un método de control eficiente, además de ampliar el conocimiento acerca de la enfermedad ya que está limitado a países como India y Japón.

El trabajo tuvo como objetivo General: Identificar el agente causal asociado al necrosamiento del tallo en el cultivo de morera, en la meseta de Popayán y como objetivos específicos: determinar la patogenicidad de los microorganismos aislados mediante la aplicación de los postulados de Koch y aislar, caracterizar morfológicamente hasta género los microorganismos asociados al necrosamiento en tallo del cultivo de morera, en la meseta de Popayán.

1 Marco Teórico y Estado del Arte

1.1 Generalidades de la morera *Morus sp*

Según Cifuentes (2004), la morera es un árbol que puede alcanzar más de 18 m y puede durar más de 100 años de vida. Sus hojas se utilizan para alimentar las larvas del gusano de seda, y su madera puede ser utilizada en carpintería especialmente para fabricación de raquetas de tenis.

La morera posee un amplio germoplasma formado por una gran diversidad de especies y variedades que constituyen un valioso recurso genético. La Sericultura ha sido la razón principal del proceso de selección y mejoramiento del género *Morus* a través del tiempo, y por esta razón se han domesticado y multiplicado gran cantidad de variedades de excelente capacidad de producción de biomasa, calidad nutritiva y alta resistencia al ataque de plagas y enfermedades, para un amplio rango de condiciones de clima y suelo (Medina *et al.*, 2009).

Morus alba es la especie de mayor distribución en el mundo por su resistencia y adaptabilidad a condiciones de sequía y suelos pobres (Sánchez 2000; Sharma *et al.*, 2000; Vijayan *et al.*, 2011); en Colombia las plantaciones de morera están cultivadas con la variedad Kanva 2 perteneciente a la especie *Morus indica* introducida de la India en 1977, de fácil reproducción por estacas, sustituyendo la variedad japonesa Ichinose, de lenta propagación vegetativa (García y Krause, 2000); también se han realizado siembras de la variedad Taig son, pero presenta difícil propagación por estacas.

1.2 Enfermedades que afectan el cultivo de morera

La enfermedad más común que afecta el cultivo de morera es la mancha foliar producida por el hongo *Cescospora moricola*; (Soria *et al.* 2001); fue reportada por Patel *et al.*, 1949 en India; este un hongo pertenece al orden capnodiales; es común en la temporada de lluvias, los

síntomas consisten en la aparición de pequeñas manchas irregulares en las hojas en las etapas iniciales; a medida que la enfermedad avanza las manchas coalescen generando amplias áreas necróticas. Las conidias germinadas producen hifas que entran en las células huésped y desarrollan el micelio, se propagan mediante gotas de lluvia y tardan de 10-15 días para desarrollar los síntomas (Sengupta *et al.*, 1991).

Gupta (1997) reporta a *Botryodiplodia teobromae* como uno de las patógenas limitantes del cultivo de morera; debido, causa cáncer en el tronco, muerte de yemas y ramas jóvenes, el mismo autor describe a *Colletotrichum gloeosporioides*, *Cerotelium fici*, *Phyllactinia corylea* y *Helminthosporium* afectando hojas y a dos especies de *Phoma*, *P. mororum* y *P. exigua* causando pudrición del tallo, además reporta a la bacteria *Xanthomonas campestris* ocasionando daños en tallos de morera. Choudhari *et al.*, 2012; describen a *Fusarium solani* ocasionando pudrición en la raíz, a *Fusarium pallidoroseum* dañando brotes.

Cifuentes y Sohn (1998), reporta en Colombia diversas enfermedades afectando el cultivo de morera entre ellas se encuentran: Llagas de la raíz, *Rosellinia sp*, presente en suelos donde permanecen grandes cantidades de residuos vegetales formados por madera en descomposición, causando llagas radicales, pérdida de brillo en las hojas y amarillamiento de estas; manchas foliares ocasionadas por *Septogloeum mori*, *Alternaria* y *Helminthosporium*; estos patógenos son comunes en zonas de alta temperatura y humedad; en lotes con alta densidad de siembra y poca ventilación, las manchas son de forma circular e irregular de color marrón oscuro; la roya de la hoja *Aecidium mori*, ocasiona daños en hojas bajas de plantaciones con poca ventilación, las partes verdes del follaje se deforman y muestran un color marrón oscuro; la mancha de fuego *Ascochyta moricola*, se presenta en zonas húmedas, forma manchas pequeñas de color marrón oscuro entre las venas de las hojas; mancha marrón *Phleospora kuwacola*, este patógeno es posible encontrarlo en cualquier época del año, especialmente en zonas húmedas y con fertilización nitrogenada los síntomas son similares a los de *Cercospora moricola*.

Antracnosis es una enfermedad del follaje, tallos y/o frutos, que típicamente aparecen como manchas grandes o pequeñas de colores oscuros o lesiones ligeramente sumidas que poseen un contorno levantado y pueden producir muerte descendente en las ramas de las plantas; dicha enfermedad es típica de los ascomicetos como los géneros *Diplocarpon*, *Elsinoe*,

Glomerella y *Gonomonia*; la antracnosis es ocasionada por el género *Colletotrichum* o *Glomerella* afecta numerosas plantas, su distribución geográfica es bastante amplia y ocasiona pérdidas severas en los trópicos y subtrópicos (Agrios, 2006).

El género *Colletotrichum* sp fue reportado por primera vez por Tode (1790) en el género *Vermicularia*; comprende especies endófitas, epifitas y saprofitas (Liu *et al.*, 2007; Prihastuti *et al.*, 2009). La especie que genera mayores pérdidas socio-económicas a nivel mundial es *C. gloeosporioides* estado anamorfo o asexual de *Glomerella cingulata*, (estado sexual o telemorfo) (Shenoy *et al.*, 2007; Hyde *et al.*, 2009).

Las enfermedades reportadas como antracnosis en morera son ocasionadas por *Colletotrichum dematium* (Yoshida *et al.*, 2002), *Colletotrichum lindemuthianum* (Janardhan, 1996) y *Colletotrichum gloeosporoides* (Rios, 2011). De acuerdo a Samarakoon *et al.*, 2018, las colonias de *C. dematium* varían de blanco hasta el gris con abundantes vellosidades y esclerocios en forma cónica, sus conidias son encorvadas y poco estrechas para cada extremo, los apresorios son de color marrón. Según Garcia 2008, *Colletotrichum lindemuthianum* es un hongo el cual no se ha reportado que lleve a cabo la reproducción sexual en la naturaleza, causando pérdidas de hasta el 95% de la cosecha en cultivares susceptibles de frijol cuando encuentra las condiciones ambientales favorables para desarrollarse, como son alta humedad relativa, precipitación frecuente y temperatura entre 18 y 22°C; además tiene la habilidad de sobrevivir por más de 22 meses en desechos vegetales.

El género *Colletotrichum* forma acérvulos redondeados o alargados en frutos, hojas y tallos. Algunas células del acérvulo se desarrollan como setas de color marrón, septadas, hinchadas en la base con el ápice redondeado, que miden 4-9 µm de ancho y menos de 100 µm de largo. Las conidias son hialinas, cilíndricas con los extremos obtusos, aseptadas, de 11-20 x 2,5-5,5 µm; se forman fiálides de conidióforos unicelulares hialinos o marrones pálidos (Santacruz, 2013). *Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo de distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos y subtrópicos, posee hifas septadas (Roca *et al.*, 2000) y produce apresorios clavados, ovalados, algunas veces lobulados, melanizados de color marrón Téliz y Mora, 2007).

1.3 *Myrothecium verrucaria*

Según Dudek, (2014), *Myrothecium* es un patógeno de las plantas perennes que causa la pudrición en el tallo o incluso manchas foliares en varios cultivos. El género fue introducido por Tode en 1790, los síntomas de la mancha de la hoja son anillos concéntricos, los síntomas de la pudrición de la corona comienzan como una pudrición blanda marrón en la corona y en los pecíolos de las hojas adyacentes lo que más tarde provoca un rápido colapso de toda la planta. Dentro de los tejidos infectados, se pueden encontrar esporodochias diminutas de esporas blancas y negras que sirven como un mecanismo para propagar la enfermedad, los aislamientos forman colonias blancas que contienen con una masa de esporas aplanadas o convexas y conidias unicelulares. El riego y las heridas por herramientas pueden causar un aumento en la susceptibilidad o frecuencia de la enfermedad. El tejido lesionado se convierte en un punto de entrada a través del cual el patógeno puede infectar la planta. Los microorganismos del género *Myrothecium* tienen la siguiente clasificación taxonómica:

División: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hypocreales

Familia: Stachybotryaceae

Género: *Myrothecium*

Especie: *Myrothecium verrucaria*

En el cultivo de morera se han reportado lesiones y manchas necróticas en hojas de *Morus alba* L. y *M. bombycis* Koidz.; ocasionalmente, se observa necrosis de las nervaduras que se forman en condiciones de humedad y a temperatura entre 5 ° C y 35 ° C y alta humedad relativa. La incidencia de la mancha foliar ocasionada por *Myrothecium* en el campo de morera del distrito de Malda de Bengala Occidental, en India es muy común, afecta la calidad y cantidad de la hoja para alimentación del gusano de seda, causando entre el 10 - 15% de pérdida en las hojas (Ritsuko, 2005); predomina principalmente en la temporada de verano. La enfermedad aparece como manchas de tamaño pequeño a mediano marrón, posteriormente aparecen manchas irregulares en ambos lados de las hojas. En estadio avanzado se desprenden manchas necróticas y se forman agujeros a esto comúnmente se llama mancha marrón de la hoja (Chattopadhyay *et al.*, 2002).

1.4 Género *Phoma*

El género *Phoma* está geográficamente extendido y comprende un grupo de hongos que se encuentran en numerosos nichos ecológicos, además de varias especies saprofitas inofensivas, *Phoma* también ha demostrado ser un importante género patógeno de plantas ocasionando pérdidas económicas importantes (Chande et al., 2010).

En 1936 Wollenweber y Hochapfel publicó una serie de artículos sobre hongos parásitos y saprófitos, principalmente *Phoma* y especies de *Ascochyta*; se hizo una descripción comparativa de 20 especies patógenas, que habían sido aisladas de frutas, hojas, tallos, ramas y madera de varias plantas, pero varias de ellas fueron identificadas de manera errónea debido a que presentaban sinonimia entre los dos géneros (Aveskamp, 2008).

Wollenweber y Hochapfel, tuvieron dificultades con la distinción entre los géneros *Phoma* y *Ascochyta*. Las primeras descripciones de hongos que pertenecen al género *Phoma* se remontan a 1821 (Sutton, 1980), cuando las especies de los géneros de *Phoma* y *Ascochyta* se examinaron en detalle por Brewer y Boerema en 1967, se hizo posible diferenciarlas entre estos correctamente. En las especies de *Ascochyta*, la separación de las conidias (distoseptación) es una parte esencial del desarrollo de las conidias, mientras que cualquier separación de las conidias (euseptación) en las especies de *Phoma* puede considerarse un proceso secundario no relacionado con la conidiogénesis. Esto implica que las especies de *Ascochyta*, tanto *in vivo* como *in vitro*, producen principalmente conidias de 2 o más células, mientras que las especies de *Phoma* en cultivo forman principalmente conidias de 1 célula, aunque las conidias *in vivo* a menudo son de 2 células. Por lo tanto, algunas de las especies designadas por Wollenweber y Hochapfel como especies de *Ascochyta* ahora deben clasificarse dentro del género de *Phoma* (Boerema, 1976). Los microorganismos del género *Phoma* tienen la siguiente clasificación taxonómica:

División: Ascomycota

Orden: Dothideales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Phoma*

En el sistema de Saccardo, el nombre del género *Phoma* se aplicaba a los hongos filamentosos que eran capaces de formar picnidios con conidias aseptados, hialinos que podrían habitar en tallos vegetales (Saccardo, 1880), pero en la actualidad el género comprende patógenos, oportunistas y saprofitos. Se conocen trece especies del género *Phoma*: *Phoma betae*, *P. cava*, *P. destructiva*, *P. exigua*, *P. fimeti*, *P. glomerata*, *P. lyopersici*, *P. macrostoma*, *P. pomorum*, *P. putaminum*, *Ascochyta fabae*, *A. pisi* y *Stagonospora samarorum*. Se han encontrado especies en materiales inorgánicos como *P. herbarum*, *P. glomerata*, *P. pomorum* var. *pomorum*, *P. eupyrena*, *P. herbarum*, *P. glomerata* y *P. pomorum* var. *pomorum*.

Los hongos del género *Phoma* juegan un papel importante en la degradación de los materiales orgánicos, junto con otras especies más especializadas. También se han encontrado infecciones por *Phoma* en humanos y animales (Balis *et al.*, 2006); (Chande *et al.*, 2010).

1.4.1 Ciclo de vida del género *Phoma*. La infección primaria del patógeno puede ocurrir a través de heridas causadas por las labores en el cultivo, condiciones climáticas o interacción con otros organismos; puede entrar en una planta huésped a través de los estomas o epidermis, (Agrios, 2006). Las células del hospedero responden al ataque del patógeno por medio de fitoalexinas, causando necrosamiento o presencia de halos necróticos, posteriormente, el hongo tiene acceso e invade los tejidos de la planta muerta. Después de un período corto de infección a menudo se observan picnidios de color oscuro, en su mayoría globosos o en forma de matraz dentro de las lesiones, que están incrustadas en la epidermis de la planta. Estos picnidios contienen numerosas conidias reunidas en una matriz de color blanco pálido a rosado. En algunos casos se puede formar micelio extradérmico. Las conidias y, en algunas especies, los fragmentos miceliales, se dispersan fácilmente por salpicaduras de agua, nebulización o viento, y pueden infectar nuevas plantas. También las aves y los insectos pueden actuar como vectores (Perrotta y Graniti, 1988). Actualmente, las especies de *Phoma* se pueden definir como hongos filamentosos que producen conidias hialinas principalmente unicelulares, aunque en varias especies también se puede observar un pequeño porcentaje de conidias septadas transversalmente (Boerema *et al.*, 2004).

En ausencia de un hospedero adecuado, la mayoría de las especies persisten en el suelo como saprofitos en material orgánico en descomposición. En la mayoría de los casos, este

material es el residuo de plantas que se infectaron previamente, de este modo, el patógeno puede sobrevivir períodos de estrés, como la sequía o el frío extremo. Las estructuras más adecuadas para la supervivencia a largo plazo son los conidios y las clamidiosporas, que solo se forman por un pequeño número de especies de *Phoma* y que pueden producir una infección en cultivos nuevos y facilitar la dispersión (West *et al.*, 2001).

La abundante producción de conidias, junto con una tasa de crecimiento relativamente rápida y la capacidad de invadir un gran número de hospedantes y sustratos, son las razones principales por las que el género es de distribución cosmopolita. Las especies más frecuentes, *P. eupyrena*, *P. exigua*, *P. glomerata*, *P. herbarum* y *P. macrostoma* se encuentran en todo el mundo, independientemente de las condiciones climáticas (Tosi *et al.*, 2002). Varias especies patógenas de plantas se han transmitido en todo el mundo a su huésped por medio de semilla y material vegetal.

En el cultivo de café, los primeros ataques ocasionados por *Phoma*, pueden observarse en el tejido de las hojas que luego avanza hacia el tallo. En la fase necrotrófica se producen en los tallos canchros (lesiones necróticas deprimidas, de aspecto corchoso) que pueden llegar incluso hasta la médula, la manifestación más característica de la enfermedad (Roussel, *et al.*, 1999). Los canchros severos causan el vuelco y muerte de las plantas afectadas (Gaetán *et al.*, 2001). El hongo logra colonizar y necrosar también las células de la base del tallo, ocasionando lesiones que causan la muerte de la rama cuando es rodeada completamente por el patógeno (Menza, 2013).

1.4.2 Tizón del tallo (*Phoma exigua* Desm.) Koike *et al.*, 2006, *Phoma exigua*, afecta tallos tiernos que se tornan pálidos y se hinchan. Las hojas se marchitan y el tallo generalmente se rompe en el punto de la infección. Los picnidios se desarrollan en anillos concéntricos dentro de las manchas necróticas. Las condiciones de temperatura moderada y alta humedad del suelo favorecen el desarrollo de la enfermedad.

El patógeno forma picnidios sub-epidérmicos en anillos concéntricos, son globosos o sub globosos. La pared de los picnidios es pseudo-parenquimatosa, con células externas oscuras, gruesas y células internas isodiamétricas e hialinas. *Phoma exigua* se conoce como el patógeno de las heridas; está presente en diferentes especies de plantas; puede causar un

deterioro severo de las plántulas o síntomas de mayor intensidad en hojas y/o base del tallo y raíces de plantas de 16-18 meses. Teniendo en cuenta que el hongo es polífago y sobrevive en la planta, este organismo es un potencial patógeno de varios cultivos (Marcinkowska, *et al.* 2005).

En 1997, Gupta, Govindaiah y Raju, publican un estudio sobre enfermedades de morera en vivero llamado “Diseases and associated fungal pathogens of Mulberry nurseries” donde hacen los primeros reportes de *Phoma sorghina* y *Phoma exigua* ocasionando en plantas de morera una afección llamada “Pudrición del tallo”; pero esta, es considerada como una enfermedad menor en la India; que fue reportada por primera vez en cultivos de morera por Dayakar y Sukumar (1988) y Tail Nadu (1985).

La capacidad del hongo para colonizar las partes aéreas y subterráneas de las plantas herbáceas y el carácter facultativo de su parasitismo, apuntan al hecho de que *P. exigua* sobrevive fácilmente en condiciones desfavorables. Puede sobrevivir en la superficie del material de siembra o en el interior de las semillas, así como en el residuo de cultivos infectados de especies herbáceas perennes (Machowicz., *et al*, 2008).

El control, de la enfermedad se debe hacer removiendo y quemando los brotes afectados. Las labores culturales que se deben realizar son el arado profundo. Los esquejes deben tratarse químicamente antes de sembrarse. También se puede realizar aplicaciones en el suelo con *Trichoderma pseudokoningii* para reducir la severidad de la enfermedad.

2 Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

La investigación se realizó en el Centro de Estudios Vegetales (CEV) La Rejoya de la Universidad del Cauca, a 7 kilómetros Nor - occidente de la ciudad de Popayán, con coordenadas geográficas: 2° 29' latitud norte, 76° 33' longitud esta, tiene una extensión de 13 hectáreas, una altitud de 1800 m, temperatura media de 18 °C y precipitación promedio anual de 1750 mm, (Vivas y Morales, 2005). La investigación se desarrolló en el cultivo de morera, cultivar Kanva 2 (*Morus indica*), con un área de 5000 m², una población de 10.000 plantas sembradas a 1m x 0,5 m, y dividido para su manejo en 20 lotes de 500 plantas cada uno. El cultivo está destinado a la alimentación del gusano de seda.

2.2 Evaluación en campo

La determinación de la sintomatología del cultivo, se realizó haciendo visitas cada dos días al CEV La Rejoya, durante 6 meses. La incidencia y severidad se determinaron en 4 lotes (lotes 2, 5, 18 y 13), donde se presentó con mayor frecuencia la enfermedad. La incidencia se determinó escogiendo 6 puntos en zig zag aleatoriamente de cada uno de los lotes y se evaluarán 10 plantas por punto, se evaluó con base al número de plantas sanas y enfermas, de acuerdo con el método (Barea, 2006):

$$\% \text{ de incidencia} = \frac{(\text{No plantas afectadas})}{\text{Numero total de plantas}} \times 100$$

La severidad, fue estudiada seleccionando 10 plantas por parcela, en las cuales se determinaron los síntomas en la parte media y en la base de la rama, utilizando la escala descriptiva y la metodología propuesta por Ávila (2004); este reconocimiento y caracterización se hizo en campo con infección natural; se establecieron grados de infección según el daño

de los tejidos de la planta, generándose dos escalas cualitativas de severidad (una para la parte media y otra para la base de la rama) debido a que los síntomas son diferentes en cada uno de los dos sitios; esto permitió conocer la sintomatología característica que se produce en medio natural y compararla con la producida en ambiente controlado mediante inoculación artificial.

Los signos y síntomas se describieron mediante registro fotográfico y colecta de tejido enfermo (tallo) según la clave de Ávila (2004), para la identificación de signos macroscópicos de los agentes causales. La caracterización de los síntomas incluyó los siguientes criterios: ubicación en la planta, edad del rebrote y de la planta (teniendo en cuenta que la edad de los rebrotes en morera se toma desde la última poda), características físicas (color, tamaño, presencia de sustancias u otros signos, ángulo de inclinación de la rama con respecto a la vertical) y los efectos/síntomas secundarios aparentes (marchitez en hojas, marchitez total de la rama, manchas foliares y/o en el tallo). El conocimiento de la sintomatología sirvió como base para realizar evaluaciones de inoculaciones artificiales con los organismos aislados a partir de los síntomas originales. La temperatura y humedad relativa en campo se determinó con un Datalogger, (Cole- Parmer 23039-65), el cual se colocó al interior de los lotes del cultivo, a 15 cm del suelo; obteniendo datos cada media hora durante 4 meses.

2.3 Recolección del material vegetal para los aislamientos de hongos

La recolección de muestras se hizo bajo la metodología de Santacruz (2013) con modificaciones. El material vegetal se recolectó de cuatro lotes del cultivo en el CEV La Rejoja, con diferentes épocas de poda, y de las partes de la planta que presentaron síntomas de la enfermedad. Debido a que se observaron dos síntomas: la base negra de la rama y el síntoma de necrosamiento en la parte media/alta de la rama se trabajó cada uno de ellos por separado. El material removido de la planta, se envolvió en papel aluminio, luego se colocó dentro de bolsas plásticas y se llevó al laboratorio de Microscopia de la Universidad del Cauca.

2.4 Aislamiento de microorganismos en el laboratorio

Los aislamientos se realizaron a partir de fragmentos de tallos y raíces de plantas de 16 a 18 meses de edad, tejidos enfermos en la base y parte media de la rama de los lotes 2, 5, 18 y 13. Para el aislamiento de hongos fueron usados cuatro medios de cultivo: PDA, V8A, MA (SF) y MDA (F) (Tabla 1).

Tabla 1 Composición de medios de cultivo para aislamiento de hongos.

Composición	PDA	MA(SF)	MDA (F)	V8A
Agar (g)	23	23	23	23
Dextrosa	30	-	30	-
Agua destilada (ml)	1000	1000	1000	800
Tallos de morera (g)	-	300	300	-
Papa (g)	300	-	-	-
Jugo V8 (ml)	-	-	-	200
Carbonato de calcio (g)	-	-	-	3

MDA (F): tallos de morera- filtrados- dextrosa- agar

MA (SF): tallos de morera PDA: papa-dextrosa-agar

Sin filtrar- dextrosa- agar

V8A: Extracto de vegetales-agar

La desinfección del material vegetal se realizó utilizando la metodología de Castellanos (2012) con modificaciones; se cortaron pequeños fragmentos de tejido sano y enfermo aproximadamente de 0,3 cm², se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1,25% por 30 segundos, se realizaron 2 lavados con agua destilada estéril, y se colocó el material en toallas de papel estéril para su secado y posterior siembra en cajas Petri con medio de cultivo. Los aislamientos fueron incubados a 22± 1 °C y 24 ± 1°C, el crecimiento de cada uno de ellos se midió diariamente y se realizaron observaciones de sus estructuras al microscopio a 10x, 40x y 100x.

El ensayo se ajustó a un diseño factorial 3 x 4 x 2 (3 microorganismos - 4 medios - 2 temperaturas), se aplicó el protocolo de Zuur *et al.* 2010 para la exploración de datos y se utilizaron los paquetes nortest (Gross y Ligges, 2015) para las pruebas de normalidad, onewaytests (Dag *et al.* 2018) para las pruebas de homogeneidad de varianza, car (Fox y Weisberg, 2011) para los análisis de varianza y ggplot2 (Wickham, 2009)

para la elaboración de las gráficas; los paquetes anteriores fueron operados en el entorno de desarrollo integrado RStudio (RStudio Team, 2017) para el programa R (R Core Team, 2017).

2.5 Caracterización de los aislamientos

Las características morfológicas de cada uno de los aislamientos fueron observadas realizando micro cultivos; para esto se preparó medio de cultivo PDA, se colocó una gota de este en un portaobjetos estéril, posteriormente se sembró una parte de micelio y se cubrió con un cubre objetos estériles, la porta objetos con el hongo sembrado, se introdujo en una caja Petri estéril y se cerró con lámina de vinipel. Las estructuras formadas se revisaron diariamente. Con las observaciones micro y macroscópicas se busca lograr una aproximación al género de los microorganismos, teniendo en cuenta la forma de las conidias, formación de diferentes estructuras somáticas y reproductivas.

2.6 Conservación de aislamientos

La metodología utilizada para la conservación de los aislamientos fue la descrita por Santa Cruz (2011), con modificaciones; se prepararon tubos de ensayo con 8 ml de medio de cultivo (PDA) inclinado. Se transfirió masas conidiales a cada tubo. Pasados 4 días, se verificó el crecimiento del hongo y los aislamientos fueron almacenados en una nevera a una temperatura de 4°C.

2.7 Pruebas de patogenicidad

La inoculación artificial se realizó con el fin de probar la patogenicidad en plantas sanas cultivadas en invernadero, separadas en dos grupos: con ramas mayores de 30 cm y menores de 30 cm; la longitud de la rama fue determinada debido a la diferencia en la sintomatología observada en campo en plantas grandes y pequeñas. Se utilizaron como inóculo los aislamientos esporulados provenientes de la base del tallo, parte media y estacas madre de plantas de morera afectadas de 16 a 18 meses, tomando los aislamientos como tratamientos

y usando tres repeticiones en cada uno de los grupos de longitud de la rama. Las plantas a inocular se mantuvieron con una humedad relativa entre 80 y 100%, bajo ambiente controlado para propiciar las condiciones adecuadas para el desarrollo del hongo.

2.7.1 Producción de inóculo. Para realizar las pruebas de patogenicidad se utilizaron dos tipos de inóculo.

Suspensión de esporas: El conteo de esporas se realizó según la metodología sugerida por Gilchrist *et al*, 2005, para ello se hizo un raspado de esporas de los cultivos puros de los hongos a evaluar, en 20 ml de agua destilada estéril, una vez homogeneizada, la suspensión se filtró a través de una gasa para eliminar el agar o restos de micelio que podrían obstruir el paso de la suspensión a través de la aguja utilizada durante la inoculación, y se realizó el recuento de esporas en una cámara Neubauer. Posteriormente se tomó una gota de la suspensión con una pipeta Pasteur y se colocó en el centro de la cámara de Neubauer; luego se cubrió con un cubreobjetos cuidando que no quedaran burbujas y que la gota no se derramara, el conteo se repitió 8 veces y se sacó un promedio. Se utilizó la siguiente fórmula para conteo de esporas:

$$x = E \times 50.000$$

Dónde: E = Número de esporas

Para preparar la concentración de esporas se aplicó la fórmula:

$$V_1 C_1 = V_2 C_2$$

Dónde: V1 = Volumen inicial de la concentración

C₁ = Concentración inicial de esporas

V₂ = Volumen final de la concentración

C₂ = Concentración final de esporas

Para el hongo (PA1), se utilizó 5×10^6 esporas /ml y para los hongos (38 B y 38M) se utilizó 2×10^6 esporas /ml.

Inóculo con fragmento de micelio: La producción de inóculo con fragmento de micelio se obtuvo utilizando aislamientos con formación de esporas, los cuales fueron observados previamente al microscopio, una vez en el sitio de inoculación se utilizó un sacabocado de

0,5 cm de diámetro para obtener el disco de micelio del centro de la colonia y colocarlo en la zona a inocular.

2.7.2 Producción de material vegetal para inoculación. En el proceso de producción de plantas para la inoculación, se procuró tener especial cuidado en seleccionar la semilla, con el fin de garantizar material vegetal libre de la enfermedad (descartando la posibilidad de transmisión por semilla); con este fin se buscó un origen diferente, obteniéndola de la finca La Muyunga, corregimiento de Piagua, municipio de El Tambo, Cauca, distante cerca de 60 Km del CEV la Rejoya, donde la enfermedad no se ha detectado aún.

Las estacas de la variedad Kanva 2 se cortaron dividiendo la rama en tres partes (apical, media y basal), para obtener un crecimiento más uniforme de las plántulas; se utilizaron plantas obtenidas de la parte media y basal de la rama donde se observó crecimiento más rápido de las yemas.

2.7.3 Enraizamiento de estacas. En el enraizamiento de las estacas se siguió el protocolo utilizado por Troches y Viquez (2016): Se cortaron estacas de 6 cm, con una yema, se desinfectaron sumergiéndolas por 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 0,5%. Las estacas se sujetaron con bandas de caucho en grupos de 20, colocándolas verticalmente en un recipiente plástico para sumergir su parte basal en una solución de ácido indol-butírico (AIB) a 150 ppm durante 24 horas; posteriormente se lavaron con agua de grifo y se colocaron en bandejas plásticas con 72 espacios cada una, sumergidas a su vez en otra conteniendo agua de grifo, que se cambia cada 3 días para evitar presencia de contaminantes; a los 20 días se preparó el sustrato utilizando una mezcla de arena y tierra negra en una proporción 1:1, luego se desinfectó con una solución de 200 ml de peróxido de hidrogeno en 20 litros de agua. Se prepararon bolsas con el sustrato, y se sembraron las estacas seleccionadas de acuerdo a su buen desarrollo radicular y del brote (Figura 2.1).



Figura 2.1. Obtención Del Material Vegetal Para Inoculación. A. Estacas de 6 cm para el enraizamiento B. Tratamiento de estacas con fitohormonas (AIB) C y D. Estacas en bandejas con agua después del tratamiento con fitohormona E. Estacas enraizadas para trasplante F y G. Estacas trasplantadas a bolsas con sustrato.

2.7.4 Métodos de inoculación. La zona a inocular en la planta se lavó con agua destilada; se probaron los siguientes métodos de inoculación:

Punción. Consistió en tomar un alfiler entomológico No.0, y punzar levemente tres o cuatro veces el tejido del tallo, dependiendo del grosor de la rama; sobre este tejido se colocó un disco de 0,5 cm de diámetro del medio de crecimiento del hongo esporulado, se cubrió con algodón estéril saturado con agua destilada estéril para evitar la deshidratación, y se sujetó con Parafilm. En el caso de inoculación con suspensión de esporas, se colocó un algodón estéril saturado con esta suspensión sobre la herida y se cubrió con parafilm.

Herida. Consistió en tomar una cuchilla de bisturí No 11 estéril y realizar una herida horizontal de 3 mm poco profunda en la parte media del tallo o en la base de este, según el tratamiento, sobre la cual se colocó un disco del medio de crecimiento del hongo esporulado de 0,5 cm de diámetro, se cubrió con algodón estéril humedecido con agua destilada estéril para evitar la deshidratación y se sujetó con Parafilm.

La inoculación con suspensión de esporas, se hizo colocando un algodón estéril con la suspensión sobre la herida y se cubrió con Parafilm. El algodón y el Parafilm se retiraron 48 horas después de la inoculación. Se mantuvo humedad relativa entre 80 y 100% para propiciar las condiciones adecuadas para el desarrollo del patógeno. En las plantas usadas como controles, se inoculó con un disco de agar estéril o agua destilada estéril según el caso reemplazando los inóculos descritos. La evaluación se realizó después de 2 días de la inoculación, y se continuó hasta observar con claridad el síntoma generado, registrando el tipo de reacción. Los criterios evaluados fueron: longitud de la lesión, presencia de signos y síntomas del hongo tanto en el tallo como en el follaje.

2.8 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante un diseño factorial 3×2^4 , utilizando el paquete estadístico R; se evaluó:

3 hongos: PA1, 38B y 38M

2 longitudes de la rama mayores de 30 cm y menores de 30 cm de longitud

2 zonas de inoculación: base de la rama y parte media de la rama.

2 métodos de inoculación: punción y herida.

2 inóculos: suspensión de esporas y micelio

El análisis se realizó mediante comparación de medias, donde se comparó la interacción entre las variables evaluadas.

2.9 Aplicación de los postulados de Koch

Los Postulados de Koch son cuatro criterios diseñados por Robert Koch en 1890, y que aún son válidos para determinar una relación de causalidad de un microorganismo con una enfermedad, tanto en plantas como en animales; en el presente caso se hacen indispensables para encontrar esa relación de causalidad entre los muchos microorganismos, principalmente hongos, que se obtienen del proceso de aislamiento a partir de las muestras de campo.

Una vez aislados los microorganismos y cultivados en medio de crecimiento, se someten a ser probados bajo los cuatro criterios que Koch postuló, con el fin de establecer una relación de patogenicidad en el hospedero; los criterios de Koch son los siguientes:

- El agente patógeno debe estar presente en las plantas enfermas y ausente en las sanas
- El agente patógeno debe ser aislado de una planta enferma en un cultivo puro
- El agente aislado en un cultivo puro debe provocar la enfermedad en las plantas susceptibles al ser inoculadas.
- El agente patógeno debe ser aislado de nuevo de las lesiones producidas en las plantas inoculadas y ser exactamente igual al aislado originalmente

Para dar cumplimiento a estos postulados se tiene en cuenta la sintomatología de la enfermedad, el aislamiento de los microorganismos, las pruebas de patogenicidad realizadas como se explicó en el numeral 3.7, y el aislamiento de los hongos inoculados que produjeron síntomas en las plantas de morera y se aíslan nuevamente en medio de cultivo PDA para obtener los microorganismos inicialmente inoculados. De esta manera y con base a estos postulados se define cuáles de todo el conjunto de hongos aislados, presentan una relación de causalidad, manifestada por el desarrollo de los síntomas en plantas sanas. Posteriormente se descartan los aislamientos que no produzcan síntomas en la inoculación, y se procede a identificar a nivel de género los organismos que sí demuestren esa relación de causalidad.

2.10 Genotificación molecular de microorganismos

La identificación molecular de los hongos fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia con sede en Bogotá, la prueba consta de tres etapas, laboratorio molecular (extracción de ADN y PCR), secuenciación y bioinformática (comparación en bases de datos). Para la caracterización, se utilizan los patógenos conservados en cultivo puro.

2.10.1 Extracción y purificación del ADN. Se utilizó el protocolo de Merino y Giusiano, (2011) con modificaciones, basado en el uso de CTAB; para ello se tomó 150 mg de la masa fúngica, se suspendió en 60 µl de Buffer TE, y se maceró mecánicamente por 1 min (pistilos de maceración), luego se agregó 50 µl de S.D.S. al 0.5%, 50 µl de solución de lisozima 10 mg/ml y 5 µl de proteínasa K. La muestra se incubó a 30°C por 1 hora; posteriormente se adicionó 100 µl de NaCl 5 M para la desnaturalización de las proteínas y 80 µl de CTAB, agitando con un vórtex por 2 min. La muestra se incubó a 65°C por 10 min; luego se agregó 800 µl de cloroformo – Alcohol isoamilico (24:1), se mezcló en un vórtex. y se centrifugó a 13000 r.p.m. por 5 min en frío. Una vez obtenidas las tres fases, se rescató la fase acuosa de la superficie y se transfirió a un tubo eppendorf limpio; se agregó 500 µl de cloroformo – Alcohol isoamilico (24:1) y se centrifugó a 13000 r.p.m. por 5 min en frío. Luego se añadió 2 volúmenes de etanol (aproximadamente 600 µ) al 96% frío y 1/10 (60 ul) de volumen de acetato de sodio y se dejó reposar en frío por 3 horas, la muestra se centrifugó a 13000 r.p.m. por 5 min en frío, se descartó el sobrenadante evitando perder el pellet (ADN). El ADN se lavó con 30 µl de etanol al 70% y centrifugó a 13000 r.p.m. por 5 min, repitiendo este procedimiento 2 veces. Se secó a temperatura ambiente por 1 hora. Finalmente se suspendió la muestra en 50 µl de buffer TE y se conservó a -20°C.

La calidad del ADN se evaluó en gel de agarosa (1 %) y revelado en transiluminador UV, la concentración de ADN se midió con espectrofotómetro colibrí (Lab Tech). La pureza se determinó simultáneamente en absorbancias 260/280 y 260/230 nm. Las muestras de ADN que presentaron la calidad adecuada se almacenaron en tubos eppendorf a -20 °C.

2.10.2 Condiciones para la amplificación (PCR). La técnica de PCR se realizó usando una mezcla de volumen final de 15 μ l, preparado con 2 μ l de muestra de ADN, 7,5 μ l de mezcla GoTaq ® Green Master Mix (1,5 mM MgCl₂; 200 nM dNTPs), 1 μ l de cada primer y 3,5 μ l de agua libre de DNAsas.

2.10.3 Primers usados en la amplificación de la región ITS. Las tres muestras de ADN fueron amplificadas por medio de PCR, se empleó primers ITS 1 (5' CCGTAGGTGAACCTGCGG-3) e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC-3), posteriormente la reacción se separó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0.5X con adición de 1 μ l de SYBR safe; para determinar el tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 100 pb. La visualización se realizó en un transiluminador UV. Las condiciones de amplificación de los primers usados en este estudio fueron las reportadas por Weisburg *et al.*, 1991. La secuenciación de los productos de PCR la realizó el instituto de Biotecnología de Corea, de la Empresa MACROGEN, a la cual se le enviaron 21 μ L del producto de PCR amplificado, en microtubos Eppendorf de 1,7 ml debidamente rotulados.

2.10.4 Análisis de las secuencias e identificación a nivel de especie. Una vez se obtuvieron las secuencias generadas por Macro gen en Corea, fueron analizadas con respecto a bases de datos internacionales (Nucleotide) que permitieron inferir la identificación taxonómica de las especies. Dicho proceso, se realizó con ayuda del programa BioEdit. Las secuencias limpias se compararon en el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) obtenido a través de NCBI (National Center for Biotechnology Information).

El Dendograma fue construido con base a las secuencias parciales de la región ITS de los aislamientos de la parte media, base de la rama y planta adulta, se utilizó el programa MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016), usando el método Neighbor-joining con un modelo de sustitución de máxima verosimilitud (Maximum composite likelihood, MCL). La confianza de las ramas se obtuvo a partir de 1000 réplicas (Bootstrap) para validar los grupos y son dados en los puntos de ramificación.

2.11 Análisis microbiológico del suelo

Con el propósito de conocer la flora microbiana del suelo del cultivo de morera, se realizó un análisis microbiológico tomando 4 sub-muestras de suelo en sitios al azar y a una profundidad de 20 cm, de cada uno de los lotes 2, 5, 13 y 18; para esto se siguió el protocolo general utilizado para recolectar muestras de suelo para análisis de fertilidad (Laboratorio de suelos de la Secretaría de Desarrollo Agropecuario del Cauca), obteniendo un total de 4 muestras de 500 gramos por cada lote.

El procedimiento en el laboratorio siguió el protocolo de Madigan *et al.*, 2003, y consistió en pasar 10 g de suelo de cada muestra por un tamiz de malla de 2 mm, luego se hicieron diluciones seriadas con cada muestra de suelo en 90 ml de agua peptonada al 0.1% (dilución 10^{-1}), se agito por 30 minutos se realizó la segunda dilución (10^{-2}) tomando 0,1 ml de la primera en 9.9 ml de solución salina, se agito por 5 minutos y se tomó 0,1 ml de dilución 10^{-2} en 9.9 ml de solución salina para llegar a 10^{-4} . De esta dilución se tomó 1 ml y se agregó a 9 ml de solución salina para llegar a 10^{-5} . Posteriormente se sembró 0,1 ml en medio PDA, y se incubó a 24 °C durante 4 días (Figura 2.2).

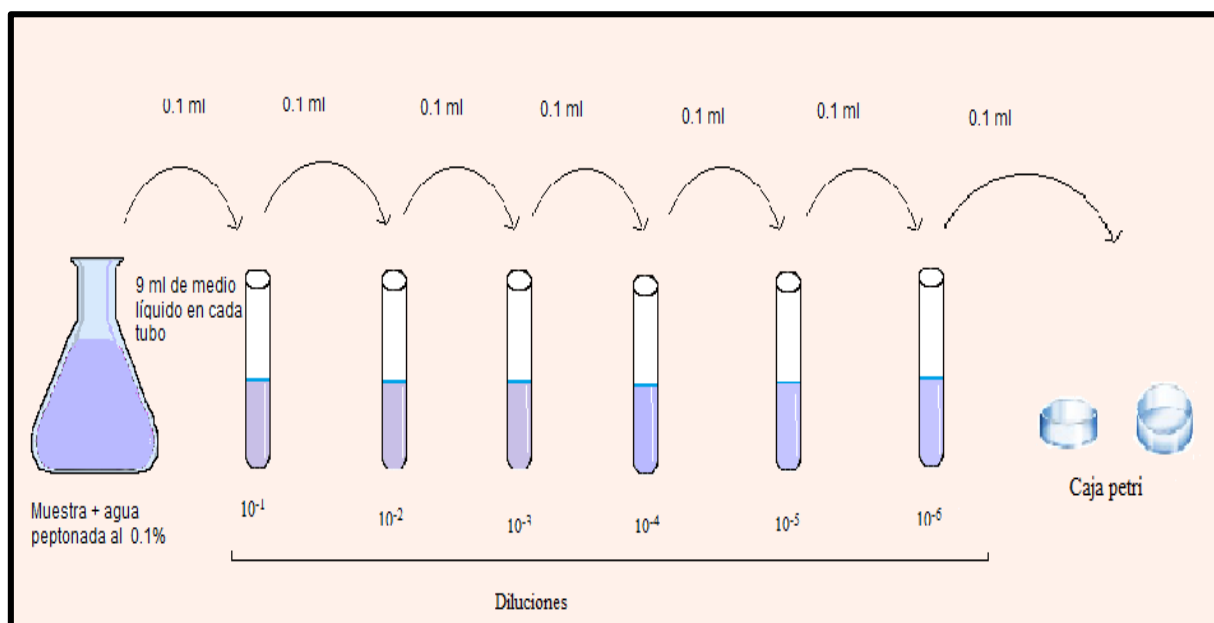


Figura 2.2. Diluciones seriadas para análisis microbiológico del suelo.

3 Resultados y Discusión

3.1 Sintomatología presente en el campo

Los síntomas que se presentan naturalmente en las plantas del campo consisten en el necrosamiento de la base del tallo y/o parte media de algunas ramas, causando bloqueo de haces vasculares y ocasionando el colapso de la mismas; estos síntomas pueden aparecer en cualquier edad y posición de las ramas en la planta, afectando con mayor rapidez a las menores a 30 cm; ocasionalmente se encontraron los dos síntomas en el mismo tallo; cuando esto ocurre el daño es más severo y la rama muere rápidamente. Se observan ramas que pueden quedar en su sitio, o postradas sobre el suelo; esta afección se ha llegado a presentar en más del 60% de las plantas en algunos lotes del cultivo, encontrándose plantas muertas por esta sintomatología.

Según Dickinson (1987), los agentes causantes de marchitamientos vasculares en diversas plantas tardan en manifestar los síntomas externos lo que indica que la invasión del patógeno avanza lentamente en los tejidos conductores; estos microorganismos pueden ocasionar la muerte de plantas en pocas semanas, pero en algunas ocasiones, tarda más en presentar los síntomas, dependiendo del tipo de hospedero y de su tejido vegetal. El patógeno continúa propagándose internamente por medio de sus estructuras reproductivas, a través de los vasos de la xilema, hasta que muere toda la rama; el tejido leñoso es una barrera que impide al patógeno la penetración de paredes y de membranas celulares e invadir vascularmente, ya que sus tejidos son más rígidos y dificultan el proceso de colonización, es por eso que en ramas grandes la infección es lenta (Roncero y Di Prieto, 2005). Las plantas adultas, se pueden marchitar muriendo repentinamente, cuando la infección es severa y el clima favorece el desarrollo de la enfermedad, se puede incrementar la velocidad de la epidemia y la manifestación de síntomas (Agrios, 2006).

En este caso, las plantas del género *Morus* están formadas por tejido leñoso y se caracterizan por ser perennes, presentando la característica de soportar la enfermedad, utilizando el mecanismo de limitarla a pocas ramas al mismo tiempo, aunque la planta ya se encuentra infectada internamente; en casos extremos, plantas de morera sembradas en los lotes de cultivo murieron mucho tiempo después del momento que fueron infectadas por el hongo (Figura 3.3).



Figura 3.3. Plantas adultas afectadas por el necrosamiento a la base y parte media del tallo. A Muerte de plantas de 16 a 18 meses de edad infectadas por el patógeno causante del necrosamiento del tallo. B Síntomas de plantas adultas muertas por afección del patógeno. C. Raíz con síntomas de necrosamiento ocasionados por la enfermedad D. Síntomas de la base y parte media en el mismo tallo.

La sintomatología de la necrosis en la base y parte media de la rama se puede asociar a especies del género *Phoma*, por el tipo de lesión y daño causado en la planta. La enfermedad es limitante para el cultivo de morera sobretodo en la etapa de crecimiento después de la poda de la planta. Debido a que no se encontraron reportes sobre esta sintomatología específica en morera en la literatura, es necesario valerse de casos muy similares en otras plantas perennes como es el café. En el cultivo de café el patógeno afecta el desarrollo de brotes nuevos no lignificados, presentando necrosis en los mismos, debido a que la enfermedad ataca zonas de

crecimiento afectando el desarrollo de la planta y la producción de follaje, (Gil, 2003). El inóculo primario o residual del género *Phoma*, sobrevive en la época seca, en tejidos muertos de las plantas de café que han sido afectadas, (Campos 2017). La infección por *Phoma* en morera también se presenta en tejidos jóvenes prevalentemente, lo cual puede significar en casos de alta incidencia, que la producción de hoja se pueda afectar significativamente; se debe complementar este trabajo con estudios enfocados a determinar la epidemiología de la enfermedad, con el fin de comprender su proceso de infección.

La enfermedad es favorecida por la época de lluvias prolongadas y alta humedad relativa. En la Figura 3.4, se puede observar que la incidencia de la enfermedad en los lotes 2, 5, 13 y 18, aumentó en los meses lluviosos de enero a mayo y septiembre a diciembre; las altas precipitaciones favorecieron el aumento de la enfermedad debido a que el agua es un factor indispensable para la infección del patógeno; los meses donde no se observa presencia de la enfermedad se debe a la ausencia de lluvias o a las labores de poda del cultivo, lo cual también afecta la incidencia de la misma.

Según Gil, 2003, el agua es indispensable para la germinación del hongo y para su proceso infectivo en café, siendo la lluvia uno de los principales diseminadores de la enfermedad, causando lesiones que facilitan la penetración del hongo o la entrada por heridas naturales o artificiales causadas por labores de cultivo; adicionalmente, Buker *et al.*, 2012, afirman que el óptimo de germinación del patógeno se consigue con una película de agua alrededor de las conidias; a su vez, Rajendran *et al.*, 1983, mencionan que existe una estrecha correlación entre la precipitación, la temperatura mínima y el porcentaje de infección, es decir, los mayores niveles de infección ocurren en épocas lluviosas y con temperaturas bajas, las cuales se relacionan con días de poca luminosidad; los dos investigadores anteriores también trabajaron con el cultivo de café afectado por este patógeno; lo anterior apoya el resultado de haber obtenido este hongo como posible causante de la sintomatología que se presentó en el cultivo de morera de donde se realizaron aislamientos característicos del género *Phoma*.

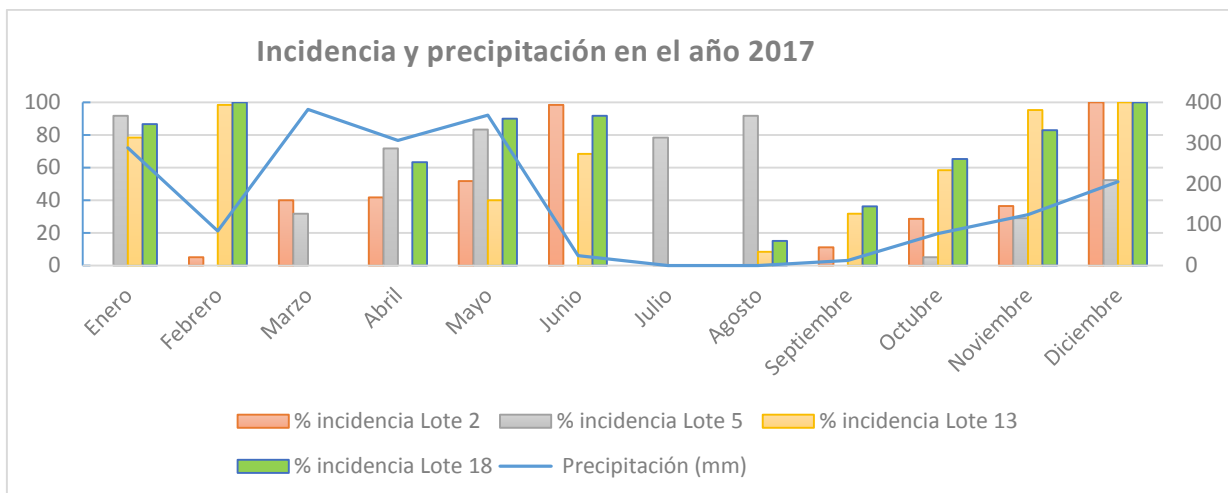


Figura 3.4. Precipitación e incidencia de la enfermedad en los lotes 2, 5, 13 y 18 del CEV la Rejoya, durante el año 2017.

En los meses de septiembre a noviembre del año 2017, el promedio de temperatura fue de 19.4 °C y la humedad relativa superó el 70 %, rangos propicios para el desarrollo de un microclima que favorece la enfermedad, confirmando lo reportado por Salgado *et al.*, 2003 quienes encontraron que la temperatura óptima para el desarrollo de *Phoma* es de 20 °C, y que las temperaturas inferiores a 14 °C generan un incremento en la infección de este patógeno en café (Tabla 2).

Tabla 2. Temperatura y humedad relativa en campo en el CEV, La Rejoya.

Mes	Temperatura (°C)			Humedad Relativa %		
	Máxima	Mínima	Promedio	Máxima	Mínima	Promedio
Agosto- Septiembre	38	8,5	20,3	100	18,5	70,2
Septiembre-Octubre	37,5	7,5	19,1	100	26	81,6
Octubre- noviembre	32,5	11,5	18,8	100	91	91,4

3.1.1 Síntomas observados en campo en la base de la rama. Los síntomas de la base de la rama que se presentan en campo posiblemente se originan en la estaca madre donde nacen los brotes; al hacer cortes transversales en el tallo se pueden observar manchas del color marrón oscuro como consecuencia de la infección. Después de algunos días la rama muere (Figura 3.5).

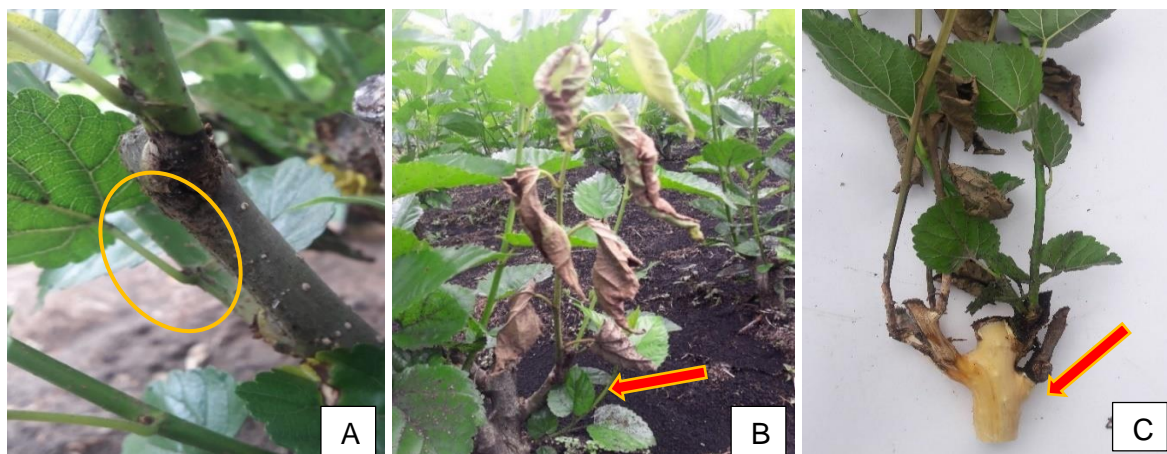


Figura 3.5. Sintomatología del necrosamiento en la parte basal. A y B, síntoma de la base de la rama. C, lesiones de color marrón en la estaca madre.

En tallos menores a 30 cm la lesión inicialmente es de color verde oliva y se torna a verde oscuro en un lapso de 2 a 4 días en los cuales muestran pérdida de turgencia en la parte superior, observándose una leve inclinación del tallo afectado, se puede presentar bronceado y enrollamiento en las hojas apicales cuando inicia el ataque del hongo, como consecuencia del taponamiento de los haces vasculares, en las hojas inferiores se observa la presencia de manchas de color negro (Tabla 3). Las lesiones se pueden presentar en cualquier posición de la planta (Figura 3.6).

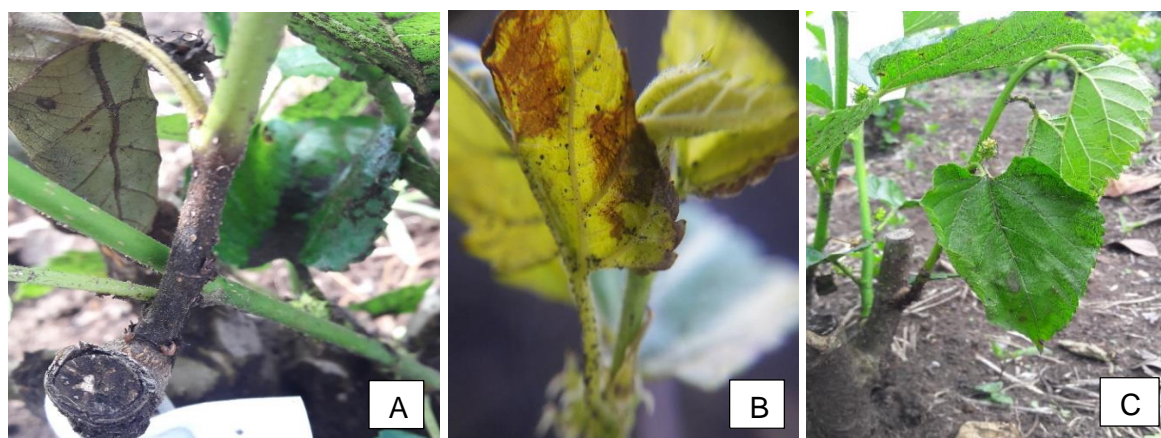


Figura 3.6 Síntomas en plantas menores de 30 cm . A. Lesión en la base del tallo de color verde oliva y presencia de halo necrótico. B. Bronceado en las hojas superiores. C. Pérdida de turgencia en la parte superior de la rama y presencia de manchas oscuras en las hojas inferiores.

En tallos mayores de 30 cm, la lesión se demora de 15 a 20 días en abarcar toda la sección del tallo y causar su muerte. Los tallos enfermos pueden mostrar síntomas, como clorosis, marchitez en las hojas superiores y defoliación prematura de las mismas, hasta llegar a la muerte de la rama; además se observa en los tallos afectados una marchitez progresiva en la parte superior lo cual termina en un posterior secamiento de los mismos; a medida que avanza la enfermedad la lesión se torna de un color marrón oscuro formando un halo en un extremo, ocasionando necrosamiento del tallo. Se pueden encontrar ramas postradas en el suelo a causa del debilitamiento del tallo en el sitio de la lesión.

La enfermedad se puede presentar tanto en la parte media como en la base de la rama de la planta y a cualquier edad; en estado avanzado de la enfermedad se puede observar varias ramas de una misma planta con la sintomatología (Figura 3.7).

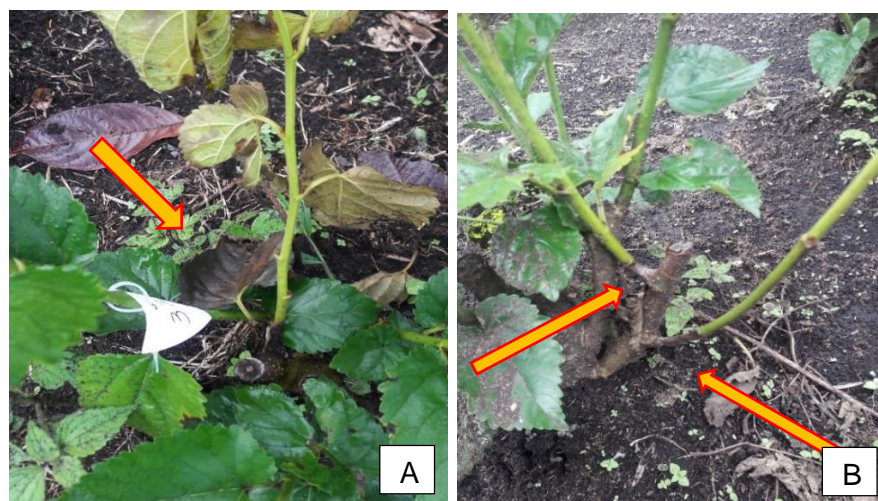


Figura 3.7. Síntomas en plantas mayores de 30 cm. A . Lesión en la base del tallo que ocasiona defoliación prematura y manchas en la parte superior de las hojas. B. Defoliación de la planta por presentar varias ramas afectadas.

La presencia de síntomas en la parte aérea de la rama grande es similar al presentado en las pequeñas, varía en el tiempo que el patógeno se demora en ocasionar la muerte de la rama; las hojas inferiores se tornan opacas y en las hojas superiores se observa una leve clorosis, en algunos casos se encuentran manchas de color negro y aspecto aceitoso que abarca paulatinamente la totalidad del área de la hoja, posteriormente estas hojas se caen quedando solo las superiores. En algunas ocasiones se presenta enrollamiento y bronceado de hojas

apicales. Cuando la planta se poda se puede observar manchas de color marrón oscuro a negro como resultado del taponamiento de los haces vasculares en la estaca madre (Figura 3.8).

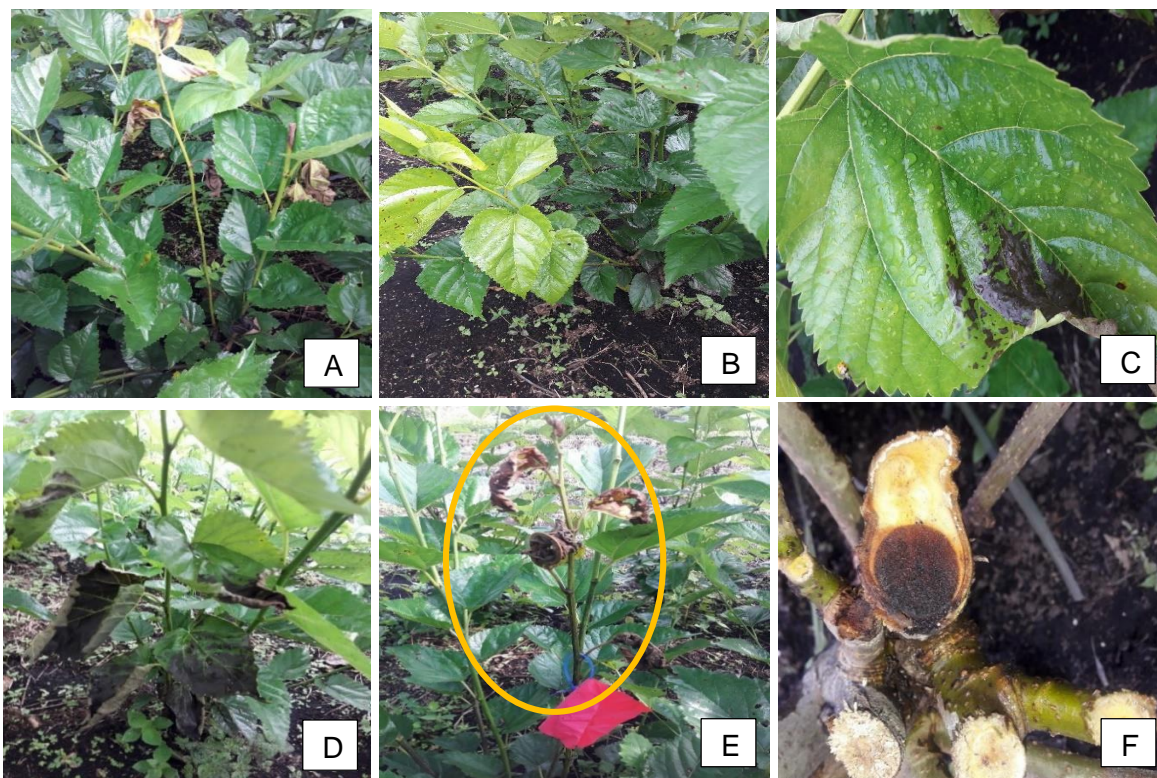


Figura 3.8. Sintomatología en el área foliar de la planta y estaca madre. A. Síntomas en la base del tallo con bronceado y enrollamiento de las hojas superiores, se observa defoliación prematura. B. Las hojas presentan clorosis por causa de taponamiento de haces vasculares. C y D. Manchas de color negro en las hojas. E. Daño total en las hojas de la rama cuando la enfermedad avanza. F. Taponamiento de los haces vasculares en la estaca madre.

Se observó que los tallos de morera infectados con la enfermedad en la base de la rama muestran varias zonas marrones, en las que hay desarrollo de tilosas que se originan a partir de las células parenquimáticas adyacentes a la xilema. La formación de tilosas es debida a cambios producidos en la pared celular y está asociada con la acumulación de estructuras cristalinas. Alrededor de la xilema bloqueado, las células contienen mayor contenido en compuestos polifenólicos que células de xilema intacto. Los cambios en los niveles y composición de estos compuestos están relacionados con la severidad de la infección (Del Rio *et al.*, 2002) (Figura 3.9).

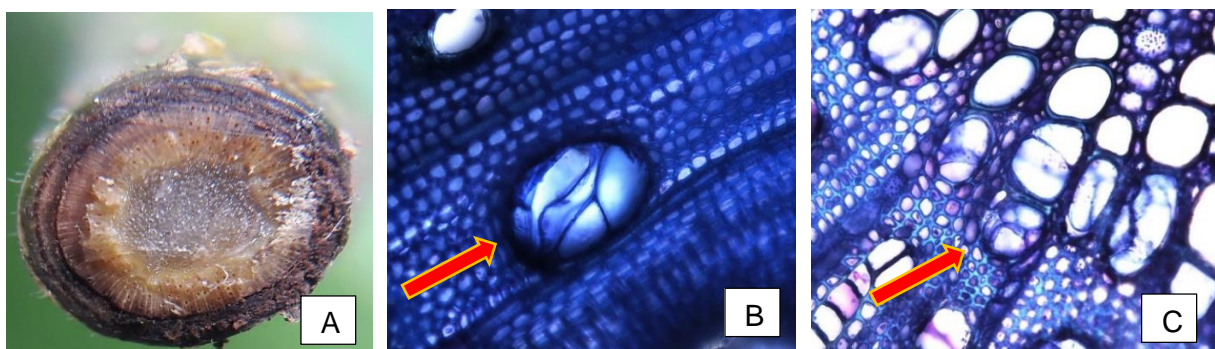


Figura 3.9. Daño vascular causado por el patógeno en los tallos de morera. A. Sintomatología en tallo disectado que muestra el daño vascular. B y C. Formación de tilosas alrededor de la xilema bloqueado.

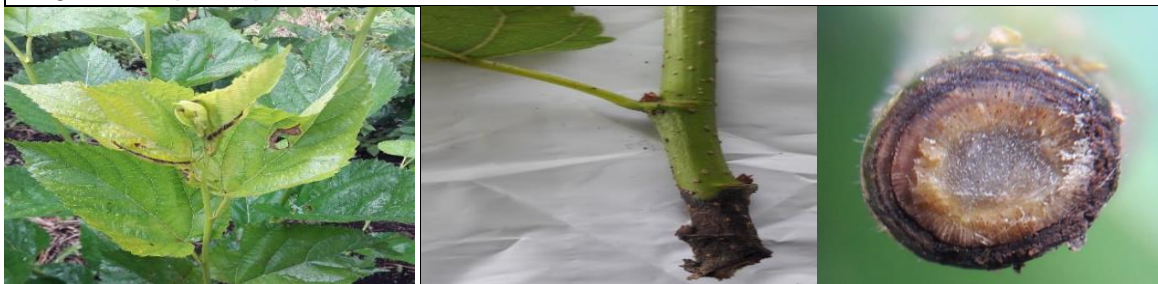
Cruz *et al.* (2012), observaron en gulupa (*Passiflora edulis*) que en el caso de infecciones de hongos como *Phoma*, en la planta, esta reacciona con el fin de impedir su avance, por lo cual genera geles y tilosas que cumplen la función de barreras físicas y químicas para detener la infección; como consecuencia de la obstrucción del sistema vascular, se comienzan a observar síntomas de marchitez, además que el tiempo que transcurre desde el momento en que los patógenos ingresan a la planta y el momento en que se hacen evidentes los primeros síntomas de la enfermedad, puede diferir dependiendo del estado de desarrollo de la planta y la intensidad de ataque del hongo, lo cual se ve favorecido por la alta precipitación y humedad relativa. Según (Gil, 2003); en plantas de café con ataques severos pueden sufrir la destrucción de la totalidad de sus brotes.

En el caso de morera el daño en los haces vasculares es similar al observado en los cultivos de gulupa y café infectados con *Phoma exigua* donde también se puede observar formación de tilosas y destrucción total de brotes, además la sintomatología en la base y parte media de la rama causada por *Phoma* sp inicialmente es leve, pero al encontrar las condiciones adecuadas es cada vez más agresiva e invasiva ocasionando finalmente la muerte de la planta. En la tabla 3, se describen diferentes estados de avance, lo que constituyó dos escalas de severidad de la enfermedad en la base del tallo y parte media de este; se puede observar que inicialmente, cuando la lesión es muy pequeña no se aprecian síntomas en el follaje, mientras que la rama muere cuando la lesión abarca toda la sección del tallo en un lapso de 5 a 30 días, dependiendo del diámetro del tallo de la rama y las condiciones ambientales debido a que la enfermedad impide la translocación de agua y nutrientes.

Tabla 3. Escala de severidad de la enfermedad en campo del síntoma de la base del tallo

<p>Grado 0 : Ausencia total de lesiones en el tallo</p>		
		
<p>Grado 1: Aparición de pequeñas lesiones en la base del tallo de color verde oliva a marrón oscuro, sin abarcar toda la sección del tallo y sin síntomas visibles en las hojas.</p>		
		
<p>Grado 2: Lesiones hasta 0,5 cm sin abarcar toda la sección del tallo, se observa el enrojecimiento de los bordes de las hojas apicales.</p>		
		
<p>Grado 3: Lesiones hasta 1 cm que no abarca toda la sección del tallo con estrangulación de este. En el follaje se observa necrosamiento, y/o enrollamiento de los bordes de las hojas apicales, en algunas ocasiones solo se presenta enrojecimiento o bronceado en secciones de las hojas superiores.</p>		
		

Grado 4: Lesiones mayores de 1 cm que abarca toda la sección del tallo, con presencia de halo necrótico en un extremo; se observa estrangulamiento y necrosamiento del tallo, en la parte interna de este existe una pequeña porción de color verde.. Las hojas superiores, muestran marchitez, se pueden presentar manchas pequeñas de color negro en hojas superiores.



Grado 5: Lesiones mayores de 1 cm, de color negro que abarca toda la sección del tallo, la parte interna esta totalmente necrosada, los tejidos internos están destrozados y secos. Aunque en la parte superior de la lesión, el tallo es de color verde, se observa flacidez. Las hojas presentan necrosamiento y manchas de color negro en casi toda la superficie foliar. Total deterioro de la rama



3.1.2 Síntomas observados en campo en la parte media de la rama. Los síntomas en campo se presentan generalmente en ramas mayores a 30 cm, tardando más de 30 días en causar el deterioro completo de la rama; al igual que en la base de la rama la enfermedad inicialmente se manifiesta como pequeñas manchas de color verde oliva que van aumentando hasta abarcar toda la sección del tallo y formar un halo necrótico bien definido en cada extremo de la lesión, las partes dañadas se presentan secas y débiles, ocasionando que la rama se quiebre por el viento o por el peso de la misma rama.

Las lesiones pueden variar entre 2 a 15 cm dependiendo de la longitud de la rama, (Figura 3.10). En la parte superior a la lesión se observa flacidez en el tallo que posteriormente ocasiona su muerte.



Figura 3.10. Síntomas en la parte media del tallo. **A.** Lesión en el tallo de color verde oliva. **B.** Síntomas las hojas superiores a la lesión. **C.** Lesión ocasionada por el rompimiento del tallo en la parte media.

En la parte superior de la rama se presentan diferentes síntomas como clorosis y marchitez ocasionada por taponamiento de los haces vasculares, bronceado y enrollamiento de las hojas más jóvenes; las hojas que se encuentran por encima de la lesión se tornan opacas, pueden presentar manchas de color negro y presentan defoliación prematura, el tallo superior a la lesión muestra pérdida de turgencia y se torna de color verde más claro, (Figura 3.11).



Figura 3.11. Síntomas en el área foliar causadas por lesión en la parte media del tallo. **A.** Marchitez de las ramas afectadas. **B.** Enrollamiento y bronceado de las hojas apicales. **C.** Manchas en las hojas que se encuentran por encima de la lesión.

Los síntomas secundarios de la enfermedad como clorosis y marchitez solo se observan en la parte superior a la lesión, las hojas y tallo que están por debajo de esta no se ven afectadas. En pocas ocasiones la sintomatología en la parte media de la rama se presenta en tallos menores a 30 cm en las cuales las lesiones son de color verde oliva con presencia de halo necrótico en los dos extremos de la lesión, las ramas afectadas mueren rápidamente, en menos de ocho días, (Tabla 4). En el área foliar los síntomas son similares a los presentados en las ramas grandes (Figura 3.12).

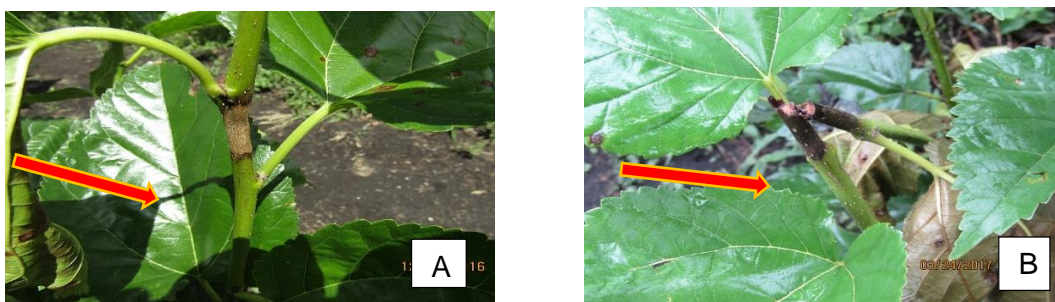


Figura 3.12. Síntomas causados por lesión en la parte media del tallo. A. Las hojas por debajo de la lesión no presentan síntomas. B. Lesión en la parte media del tallo de color verde oliva.

Según Agrios (2006), el avance del patógeno en diversas plantas depende de la severidad de la enfermedad; la coloración de la parte interna del tejido del tallo, la oxidación y obstrucción de los vasos de la xilema. En el caso de morera, al disectar plantas con los síntomas en la parte media de la rama se encontró afectación en los haces vasculares, en este caso las plantas, reaccionan al ataque de patógenos produciendo estructuras y sustancias químicas que tratan de interferir en el desarrollo del mismo, en este caso se observó la formación de tilosas como factor de resistencia estructural para formar barreras y limitar al patógeno en una región del xilema con la finalidad de evitar el crecimiento del micelio dentro del tejido del tallo. Los cortes transversales en tallos infectados con el patógeno muestran varias zonas marrones, pronunciadas y decoloradas, dispuestas en forma de anillo completo o interrumpido, en el área vascular, (Figura 3.13).

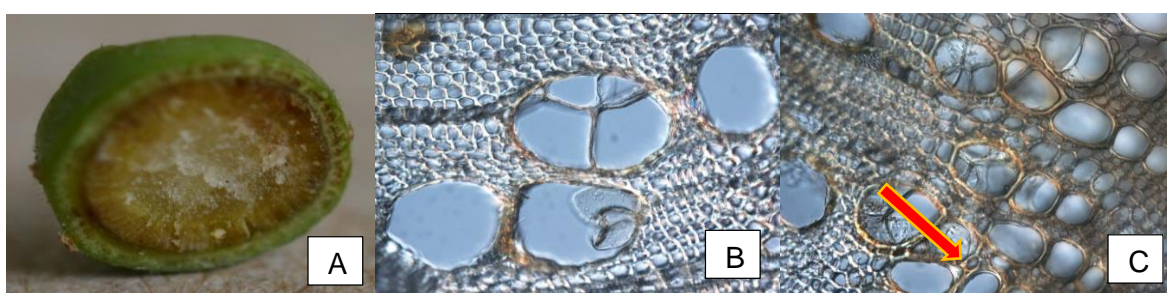


Figura 3.13. Daño vascular causado por el patógeno en los tallos de la parte media de morera. A. Sintomatología en el tallo disectado. B y C Daño vascular y formación de tilosas alrededor de la xilema bloqueado.

En la tabla 4, se describe el avance de la enfermedad en la parte media del tallo; al igual que en la base del tallo, se puede observar que inicialmente cuando la lesión es muy pequeña no

se aprecian síntomas en el follaje y la rama muere cuando el necrosamiento ocasionado por el patógeno abarca toda la sección del tallo, en un lapso de 5 a 20 días. El tiempo que tarda el microorganismo en desarrollar la infección y causar la muerte de la rama depende del grosor de esta y las condiciones ambientales, ya que la enfermedad impide la translocación de agua y nutrientes. La sintomatología en la parte media de la rama generalmente se presenta en tallos mayores de 30 cm.

Tabla 4 Escala de severidad de la enfermedad en campo del síntoma parte media del tallo

<p>Grado 0: Ausencia total de lesiones en el tallo</p>		
		
<p>Grado 1: Aparición de pequeñas lesiones en la parte media del tallo de color verde oliva a marrón oscuro, sin abarcar todo el tallo y sin síntomas visibles en las hojas</p>		
		
<p>Grado 2: Lesiones hasta 1 cm sin abarcar todo el tallo. Se observa comienzo de estrangulamiento del tallo. Las hojas apicales muestran necrosamiento y enrollamiento, en algunas ocasiones solo se presenta enrojecimiento de las hojas superiores. Las hojas inferiores a la lesión no presentan síntomas.</p>		
		

Grado 3: Lesiones hasta de 2 cm, que abarca el tallo con estrangulamiento y necrosamiento de color negro y halo necrótico en los dos extremos de la lesión. En la parte interna del tallo no se presentan síntomas severos. Las hojas superiores, muestran marchitez, se pueden presentar manchas pequeñas de color negro en hojas superiores. Las hojas que se encuentran por debajo a la lesión no presentan síntomas.



Grado 4: Lesiones mayores de 2 cm, que abarca todo el tallo se observa necrosamiento con halo necrótico en los dos extremos de la lesión. Aunque internamente el tallo está totalmente necrosado, hueco y seco, externamente en la parte superior a la lesión aún mantiene el color verde. Todas las hojas que se encuentran por encima de la lesión presentan necrosamiento y manchas de color negro en casi toda la superficie foliar lo cual ocasiona su desprendimiento del tallo. Se observa total deterioro de la rama, en la parte superior a la lesión pero las hojas inferiores a esta no presentan síntomas de daño.



3.1.3 Síntomas de la parte interna de tallo en plantas de 16 a 18 meses. Las plantas afectadas por la enfermedad muestran necrosamiento de las ramas y brotes; al disectar plantas muertas por esta sintomatología se encontró afectación a nivel de raíces y tallo presentando daño severo en haces vasculares; en su interior se observa una lesión de color marrón que afecta la raíz y avanza por el interior hasta llegar al tallo, donde se observa necrosamiento en la estaca madre (Figura 3.14).

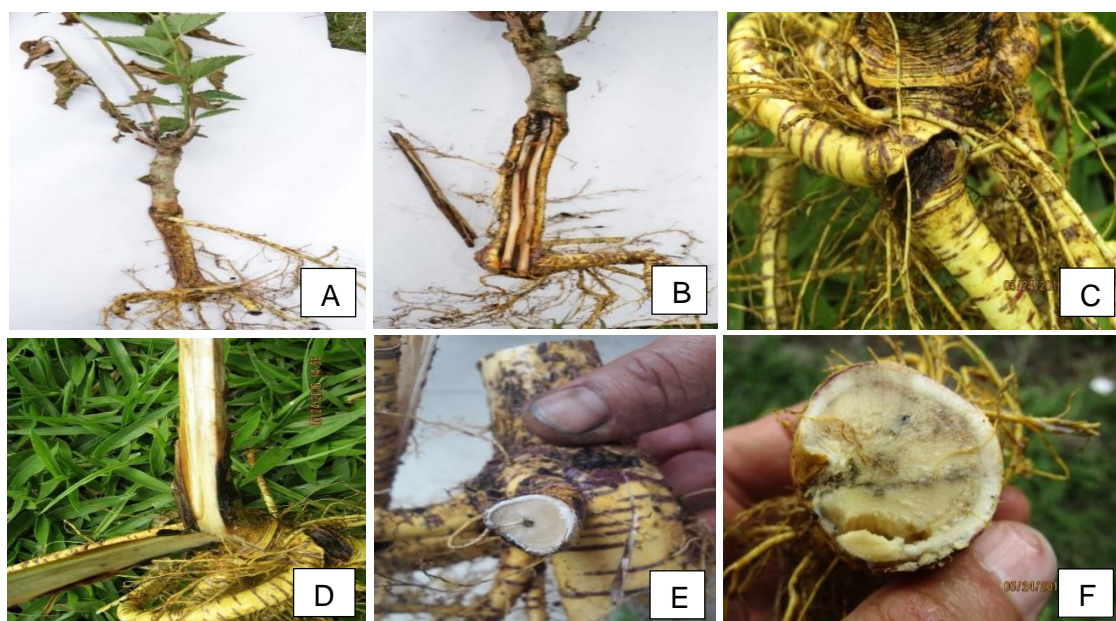


Figura 3.14. Síntomas de la parte externa e interna de plantas provenientes del campo. A. Síntomas externos del necrosamiento en brotes y tallos afectados por la enfermedad. B. Lesiones internas de color marrón encontradas en la estaca madre C. D. E. F. Daño ocasionado en la raíz de la planta.





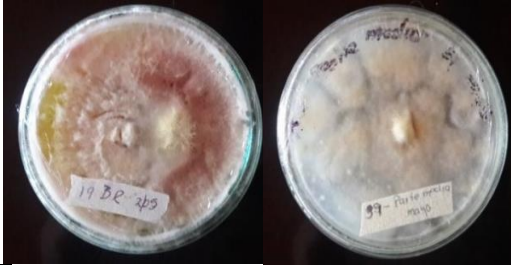

3.2 Aislamientos obtenidos

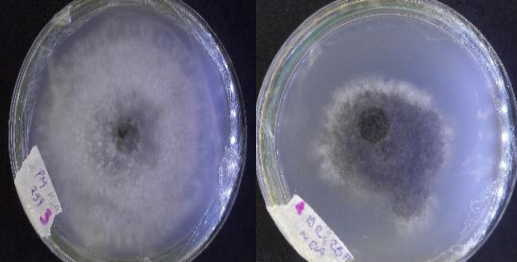

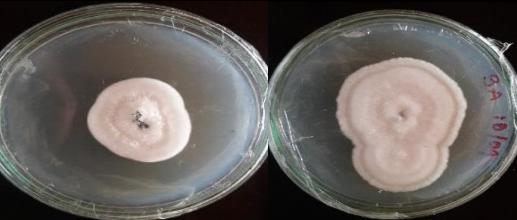
Se obtuvieron 24 aislamientos (9 de la parte media del tallo, 13 de la base de la rama del tallo, 2 de la raíz y del tallo de plantas de 16-18 meses), (Tabla 5), los microorganismos fueron aislados a partir de tallos y raíces con síntomas de la enfermedad en plantas afectadas de 16-18 meses de edad, de los lotes 2, 5, 18 y 13 del cultivo en el CEV La Rejoja (Figura 3.15).



Figura 3.15. Tallos con síntomas de la enfermedad utilizados para aislamientos en laboratorio. A. tallos con síntomas en la base y parte media de la rama, y partes de raíz y tallo de plantas de 16-18 meses. B. Planta de 16-18 meses afectada para realizar aislamientos.

Tabla 5 Características de los aislamientos obtenidos de los síntomas de la base, parte media de la rama, tallo y raíces de plantas de 16-18 meses.

Aislamientos	Características	Imagen
17 M, 13 B, 14 B, 17 B	Micelio de color rosado, textura algodonosa y crecimiento irregular, sin esporulación. Aislados de la parte media y base de la rama.	
1 M, 6 M, 9 M	Micelio de color violeta afelpado, crecimiento irregular, sin esporulación, aislados de la parte media de la planta.	
2M	Micelio algodonoso y crecimiento radial, sin esporulación. Aislado de la parte media de la rama.	
15B, 20B, 25B, 28M, 29B, 33B	Micelio algodonoso de color blanco, crecimiento radial o irregular, sin esporulación. Aislados de la parte media y base de la rama.	
19B, 39 M	Micelio algodonoso de color crema, crecimiento circular, sin esporulación. Aislados de la parte media y base de la rama.	
10 M, 10 B	Micelio afelpado de color blanco de crecimiento radial, sin esporulación, aislados de la parte media y base de la rama.	

Aislamientos	Características	Imagen
38 M, 38 B	Micelio algodonoso, de color gris, conidias cilíndricas con un solo septo. Aislados de la parte media y base de la rama.	
40	Micelio algodonoso de color crema, crecimiento irregular, sin esporulación, aislados de plantas de 16 a 18 meses de edad.	
PA1	Micelio afelpado de color blanco, conidias ovoides septadas, aislado de tallos y raíces de plantas de 16 a 18 meses de edad.	

3.3 Pruebas de patogenicidad

Debido a que todos los aislamientos obtenidos de los síntomas del campo eran potencialmente patogénicos, se realizaron pruebas de patogenicidad con todos los microorganismos aislados, también se estandarizó la producción de plantas necesarias y el método de inoculación utilizado. Con el propósito de conocer la relación de causalidad de los hongos aislados con la sintomatología observada, los 24 aislamientos fueron inoculados inicialmente mediante el método de herida, el inóculo se colocó en la parte media y base de la rama de tallos de morera que se mantuvieron con una humedad relativa entre 80 y 100%, bajo ambiente controlado para propiciar las condiciones adecuadas para el desarrollo de los hongos. Los aislamientos que causaron síntomas similares a los producidos naturalmente en el campo fueron los siguientes: 38B, 38M y PA1.

3.3.1 Producción de inóculo. Se realizaron ensayos de producción de inóculo con los 3 aislamientos que fueron patogénicos (PA1, 38M y 38 B) utilizando 4 medios de cultivo y 2 temperaturas de incubación para el crecimiento de los microorganismos y de esta manera obtener la mayor cantidad de estructuras reproductivas para las posteriores pruebas de patogenicidad.

3.3.2 Crecimiento de los microorganismos patogénicos a 22 ± 1 °C y 24 ± 1 °C en diferentes medios de cultivo. Los aislamientos que fueron patogénicos en las plantas de morera se incubaron a dos temperaturas (22 ± 1 °C y 24 ± 1 °C) y multiplicados en medio de cultivo PDA; luego, para realizar pruebas de eficiencia de producción de esporas fueron crecidos en los medios MDA(F), MA(SF) y medio V8A. El crecimiento de los tres aislamientos se encuentra descrito en la Tabla 6.

Tabla 6 Crecimiento de aislamientos incubados a dos temperaturas y aislados en cuatro medios de cultivo.

		22±1 °C			24±1 °C		
Medio	Promedio de crecimiento de hongos en cm, al día 7						
	PA1	38 M	38B	PA1	38M	38B	
PDA	3	4,9	6,3	3,4	5,6	6,7	
MDA (F)	2,7	5,1	3,5	3,7	7,9	5,6	
MA (SF)	2,9	4,9	4	3,1	6,2	4,2	
V8A	3,7	3,6	3,9	3,4	3,2	2,7	

F: Tallos filtrados SF: Tallos sin filtrar

El análisis estadístico se realizó tomando como referencia el día 7 debido a que ese fue el tiempo en el cual una repetición del total utilizadas, fue la primera en alcanzar el borde de la caja (9 cm); como los datos no cumplieron los supuestos de normalidad, ni de homogeneidad de varianza, el análisis se realizó con estadística no paramétrica, para ello, se transformaron los datos de crecimiento a logaritmo en base 10; una vez hecha la transformación se calculó el análisis de varianza factorial. Se encontraron diferencias significativas ($P < 0,05$) en el crecimiento entre hongos; entre medios, temperaturas, interacción hongos y medio, hongos y temperatura. Esto quiere decir que hay diferencias significativas en el logaritmo del área de crecimiento entre los microorganismos, entre los medios, entre las temperaturas y las interacciones dobles (Tabla 7).

Tabla 7. Nivel de significancia ($P < 0,05$) entre las condiciones de crecimiento de los hongos estudiados

Variables	Pr(>F)
Hongos	$< 2.2e-16$ ***
Medios	$< 2.2e-16$ ***
Temperatura	$3.897e-08$ ***
Hongos: Medio	$< 2.2e-16$ ***
Hongos: Temperatura	0.001052 **
Hongos: Medio: Temperatura	0.079393

Los datos en la Tabla 7 muestran que existe diferencia significativa en todos los términos del análisis, excepto en la triple interacción (Hongos: Medio: Temperatura).

La Figura 3.16 muestra que existe cercanía en el comportamiento con respecto al crecimiento entre los hongos aislados de la parte media 38M y base de la rama 38B al situarse uno cerca del otro dentro del mismo eje, notándose gran diferencia con el PA1, lo anterior es un buen indicio de que se trata de microorganismos diferentes. En el caso de los hongos (38M y 38B) es posible pertenezcan a especies distintas lo cual explicaría la diferencia en el crecimiento, color y forma de las colonias en los medios de cultivo.

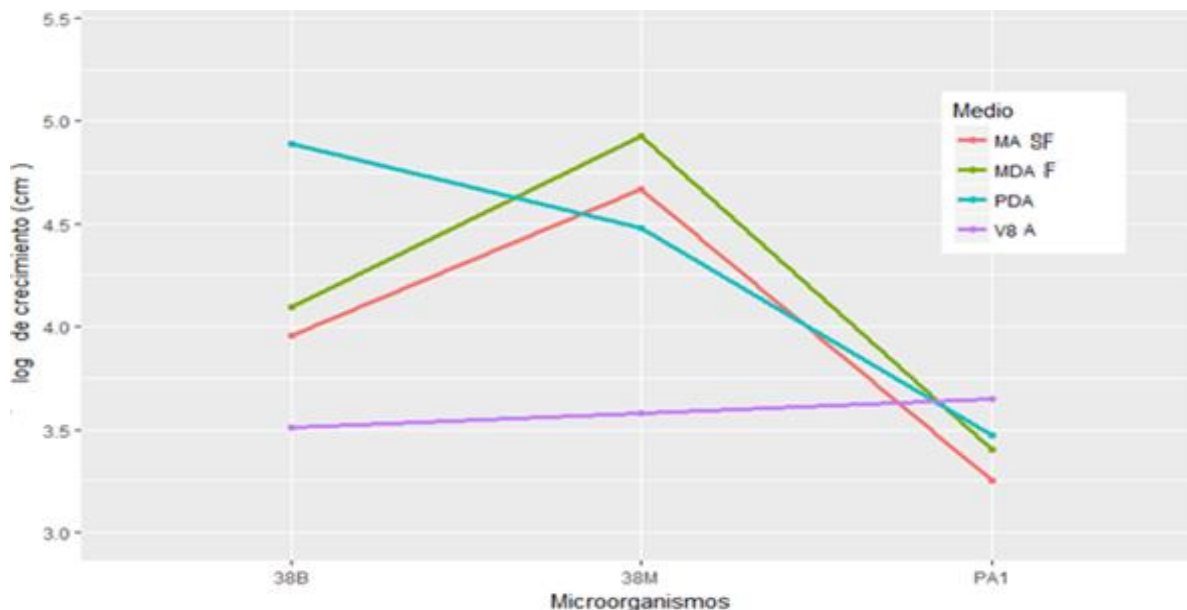


Figura 3.16. Respuesta de crecimiento de microorganismos en medios de cultivo. 38B se refiere al microorganismo extraído de la base de la rama. 38M al extraído de la parte media y PA1 al extraído de tallos y raíces plantas adultas de 16 a 18 meses

La respuesta en el crecimiento de los tres hongos fue altamente significativa y diferente en los cuatro medios de cultivo, siendo mejor el PDA para el hongo 38B (aislado de la base de la rama) y MDA (F) para el 38M (aislado de la parte media de la rama). El crecimiento del hongo PA1 fue similar en todos los medios de cultivo, a diferencia del V8A donde su desarrollo fue superior. Se puede concluir que los medios utilizados y su composición fueron adecuados para el crecimiento de los microorganismos.

Existen diferencias altamente significativas en la respuesta del crecimiento de los hongos en los medios de cultivo empleados, debido a que estos difieren en su composición. En los medios MDA (F) y MA (SF) la respuesta es similar para los tres hongos ya que su composición es semejante, siendo el crecimiento inferior en MA (SF) porque los hongos se concentran alrededor de los fragmentos de tallo presentes en el medio influyendo en su menor desarrollo, este comportamiento es marcado en PA1. No se observó una diferencia marcada en el crecimiento de los hongos en los medios MDA (F) y MA (SF), aunque en el medio MDA (F) fue mayor esto puede indicar que la dextrosa usada como fuente de energía por los hongos aumento el crecimiento debido a la presencia de hidratos de carbono en el medio.

En el medio V8A aunque los microorganismos tuvieron un menor crecimiento sus colonias, se caracterizaron por ser algodonosas y por tener mayor elevación en el micelio, es posible que se deba a la composición nutricional del medio de cultivo en cual está compuesto por extractos vegetales de hortalizas como el tomate, zanahoria, apio, perejil, lechuga, espinaca y berros que constituyen una variada fuente de nutrientes, ideales para el desarrollo de microorganismos y la rápida formación de estructuras reproductivas.

Según lo anterior es posible concluir que para el aislamiento de hongos se puede utilizar tres medios de cultivo: PDA, V8A y medios a base de tallos de morera. Los microorganismos aislados difieren en su crecimiento con los cambios de temperatura, pero las mejores condiciones para su desarrollo son a 24 ± 1 °C, sin embargo, se requiere realizar pruebas a temperaturas inferiores para encontrar el intervalo óptimo de crecimiento de los microorganismos (Figura 3.17).

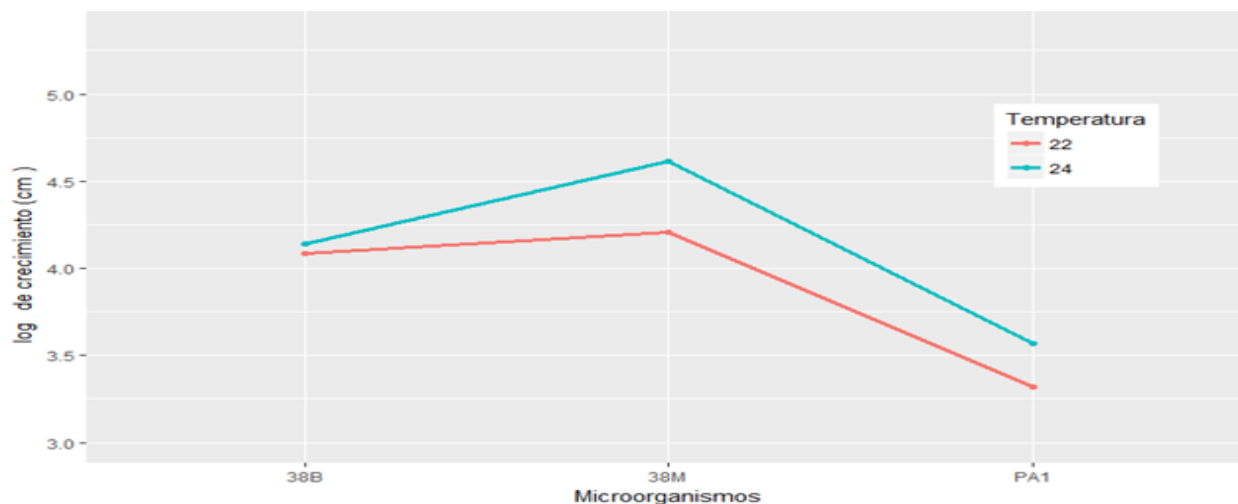


Figura 3.17. Respuesta del crecimiento de microorganismos en dos temperaturas. 38B se refiere al microorganismo extraído de la base de la rama. 38M al extraído de la parte media y PA1 al extraído de tallos y raíces plantas adultas de 16 a 18 meses

En relación con la esporulación de los hongos la respuesta fue inversamente proporcional al crecimiento (a menor crecimiento mayor esporulación). El medio elaborado con jugo de vegetales V8A, rico en nutrientes favorece la esporulación de los hongos 38M y 38B, pero no su crecimiento; esta información coincide con González, (2014), quien afirma que la combinación de los sustratos naturales y productos sintéticos como en el medio V8A beneficia la rápida esporulación de los hongos. Dado que el crecimiento en medio V8A es bajo y la esporulación es rápida el manejo es complicado porque la producción de esporas no es suficiente y esto hace difícil su consecución para las suspensiones empleadas en las inoculaciones.

La diferencia en el crecimiento entre medios puede explicarse con la teoría expuesta por Andrews, (1984) quien propuso que los organismos adoptan diferentes estrategias para alcanzar la colonización de un ambiente determinado y así adaptarse. En un medio limitante de nutrientes, los organismos adoptan la estrategia que consiste en ocupar un espacio tan rápido como les sea posible, por lo cual mantienen altas tasas de crecimiento y reproducción, mientras que al encontrar mayor cantidad de nutrientes los organismos adoptan otro tipo de estrategias donde poseen metabolismos lentos y tasas de reproducción bajas, presentando una colonización más lenta. En caso de este ensayo se pudo observar que en el medio V8A el crecimiento fue lento pero la esporulación rápida a diferencia de la teoría expuesta por Andrews.

3.3.3 Esporulaci3n de microorganismos a 22±1 3C y 24±1 3C en cuatro medios

de cultivo. En las tablas 8 y 9 se encuentra la descripci3n de las caracteristicas en la morfologfa y esporulaci3n de los hongos PA1, 38M (Parte media de la rama) y 38B (Base de la rama) incubados a 22±1 3C y 24±1 3C en los cuatro medios de cultivo en los cuales fueron aislados (PDA, MDA (F), MA (SF) y V8A). Seg3n Gonz3lez, (2014), la combinaci3n de los sustratos naturales y productos sint3ticos como en el medio V8A, MDA(F) y MA(SF) son propicios para el despliegue del potencial enzim3tico del pat3geno, ya que benefician el crecimiento de los microorganismos; estos al encontrarse en un medio rico, producen grandes cantidades de micelio y se tornan en colonias m3s densas y producen estructuras reproductivas en menor tiempo, en comparaci3n de medio PDA. Se ha comprobado que los medios de cultivo que contienen V8A, favorecen el crecimiento, esporulaci3n y secreci3n de las enzimas de algunos microorganismos adem3s acortan el tiempo de experimentaci3n ya que inducen la formaci3n de un mayor n3mero de estructuras reproductivas y permite que la cepa exprese en mayor medida su potencial pat3geno. En el caso de los aislamientos PA1, 38M y 38B la condici3n anteriormente mencionada fue ideal para este ensayo debido a que se pudo obtener estructuras reproductivas en menor tiempo disminuyendo el riesgo de contaminaci3n.

Tabla 8 Morfologfa y esporulaci3n de hongos a 22±1 3C en cuatro medios de cultivo

HONGO	MEDIO	MORFOLOGIA	ESPORULACI3N
PA1	PDA	Micelio blanco abundante, afelpado, compacto. Conidias septadas, ovoides, agrupadas en masas conidiales de color negro, distribuci3n aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulaci3n a los 14 dfa con un di3metro de 4.3 cm. Esporulaci3n abundante.
	MDA (F)	Micelio blanco escaso, afelpado, compacto. Conidias septadas, ovoides agrupadas en masas conidiales de color negro en forma de picnidios y distribuci3n aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulaci3n a los 15 dfa, con un di3metro de crecimiento promedio de 4.5 cm. Esporulaci3n escasa.
	MA (SF)	Micelio blanco superficial, afelpado, compacto. Conidias septadas, ovoides, agrupadas en masas conidiales de color negro en forma de picnidios y distribuci3n aleatoria.	Crecimiento lento, el micelio a3reo es m3s mayor que en otros medios, comienzo de esporulaci3n a los 15 dfa. Di3metro de crecimiento de 5.4 cm. Esporulaci3n escasa.
	V8A	Micelio blanco abundante, afelpado, compacto. Conidias septadas, ovoides agrupadas en masas conidiales de color negro en forma de picnidios y distribuci3n conc3ntrica	Crecimiento lento, el inicio de la esporulaci3n es a los 5-6 dfa con un di3metro de 2 cm, la formaci3n de picnidios es abundante.

HONGO	MEDIO	MORFOLOGIA	ESPORULACIÓN
38M (Parte media de la rama)	PDA	Micelio gris -verde oliva, abundante, algodonoso, crecimiento circular o irregular. Conidias , cilíndricas agrupadas en masas conidiales, picnidios, pequeños de color negro y distribución aleatoria	Crecimiento rápido, comienzo de esporulación a los 30 a 40 días, con diámetro de 9 cm. Formación de picnidios, oscuros, globosos.
	MDA (F)	Micelio gris -verde oliva escaso, algodonoso. Conidias , cilíndricas agrupadas en masas conidiales pequeñas de color negro forma de picnidios y distribución aleatoria crecimiento circular o irregular	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 20 a 30 días. Diámetro de 6.5 cm. Los picnidios son oscuros, globosos con escasa producción de conidias
	MA (SF)	Micelio gris -verde oliva superficial, algodonoso, crecimiento irregular. Conidias , cilíndricas agrupadas en masas conidiales pequeñas de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a entre los 20 a 30 días, con un diámetro de 9 cm. se observa la formación de picnidios, globosos con escasa producción de conidias
38 M (parte media de la rama)	V8A	Micelio blanco- gris-verde oliva. Micelio abundante, algodonoso, crecimiento irregular. Conidias, cilíndricas agrupadas en masas conidiales pequeñas de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 13 a 20 días, con diámetro de 5 cm. Formación de picnidios, globosos con escasa producción de conidias.
38B (Base de la rama)	PDA	Micelio blanco-gris. Micelio abundante, algodonoso, crecimiento circular o irregular. Conidias cilíndricas, agrupadas en masas conidiales, picnidios pequeños de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento rápido, comienzo de esporulación a los 30 a 40 días, con un diámetro de 9 cm. Las estructuras reproductivas es en forma de picnidios.
	MDA (F)	Micelio blanco- gris. Micelio abundante, algodonoso, crecimiento circular o irregular conidias cilíndricas, agrupadas en masas conidiales y picnidios pequeños de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 15 a 20 días, con diámetro de 6 cm. Formación picnidios y micelio, el micelio aéreo escaso.
	MA (SF)	Micelio blanco- gris. Micelio abundante, algodonoso, crecimiento circular y/o irregular. Conidias cilíndricas , agrupadas en masas conidiales y picnidios pequeños de color gris a negro y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 15 a 20 días, con diámetro de 6 cm. Formación picnidios y micelio escaso concentrado en los fragmentos de tallo del medio.
	Medio V8A	Micelio blanco- gris. Micelio abundante, algodonoso, crecimiento circular o irregular. Conidias cilíndricas agrupadas en masas conidiales, formación de picnidios, de color gris a negro.	Crecimiento rápido, esporulación a los 15 a 20 días, diámetro de 7 cm. Estructuras reproductivas en forma de picnidios.

SF: Tallo sin filtrar **F:** Tallo filtrado **V8A:** medio a base de vegetales (Campbell)

Tabla 9 Morfología y esporulación de hongos a 24±1 oC en cuatro medios de cultivo

HONGO	MEDIO	MORFOLOGIA	ESPORULACIÓN
PA1	PDA	Micelio blanco abundante, afelpado, compacto. Conidias ovoides, septadas, agrupadas en masas conidiales de color negro en forma de conidióforo y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 12 días, con un diámetro de 6.5 cm. La esporulación es abundante.
	MDA (F)	Micelio blanco escaso, afelpado, compacto. Conidias ovoides, agrupadas en masas conidiales de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a 13 días, diámetro de crecimiento promedio de 5.5 cm. La esporulación abundante.
	MA (SF)	Micelio blanco superficial, afelpado, compacto. Conidias ovoides septadas, ovoides, agrupadas en masas conidiales de color negro en forma de picnidio y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, el micelio aéreo mayor que en otros medios, esporulación escasa comienza a los 13 días, diámetro de crecimiento de 5.4 cm.
	V8A	Micelio blanco abundante, afelpado, compacto. Conidias ovoides septadas, agrupadas en masas de color negro en forma de picnidio y distribución concéntrica.	Crecimiento lento, el inicio de la esporulación es a los 4 días con un diámetro de 2 cm, la formación de picnidios es abundante.
38M (Parte media de la rama)	PDA	Micelio blanco- gris -verde oliva, abundante, algodonoso, crecimiento irregular. Conidias , Cilíndricas agrupadas en masas conidiales en forma de picnidios de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento rápido, comienzo de esporulación a los 40 a 50 días, con un diámetro de 9 cm. La formación de picnidios, oscuros, globosos es abundante.
	MDA (F)	Micelio blanco- gris-verde oliva. Micelio escaso, algodonoso, Conidias , Cilíndricas agrupadas en masas conidiales en forma de picnidios de color negro y distribución aleatoria crecimiento irregular.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 20 a 30 días, con un diámetro de 9 cm. Hay formación de picnidios, oscuros, globosos. El micelio aéreo es escaso.
	MA (SF)	Micelio blanco- gris -verde oliva. Micelio superficial, algodonoso, crecimiento irregular o circular. Conidias , Cilíndricas agrupadas en masas conidiales en forma de picnidios de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a 20 a 30 días, con diámetro de 9 cm. Formación de estructuras escasa. Micelio aéreo concentrado en los fragmentos de tallo del medio.
	V8A	Micelio blanco- gris-verde oliva abundante, algodonoso, crecimiento irregular. Conidias , Cilíndricas agrupadas en masas en forma de picnidios de color negro y distribución aleatoria.	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a 15 a 20 días, diámetro de 7.2 cm. La formación de picnidios, oscuros, globosos es escasa.

HONGO	MEDIO	MORFOLOGIA	ESPORULACIÓN
38B (Base de la rama)	PDA	Micelio blanco- gris abundante, algodonoso, crecimiento circular o irregular. Conidias cilíndricas , en masas conidiales agrupadas en picnidios de color negro y distribución aleatoria	Crecimiento rápido, comienzo de esporulación a los 40 a 50 días, con un diámetro de 9 cm. Las estructuras reproductivas son en forma de picnidios.
	MDA (F)	Micelio blanco- gris abundante, algodonoso, crecimiento irregular Conidias cilíndricas, agrupadas en masas conidiales en forma de picnidios negros y distribución aleatoria	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 20 a 30 días, con un diámetro de 9 cm. La formación de picnidios es escasa.
	MA (SF)	Micelio blanco- gris abundante, algodonoso, crecimiento circular o irregular. Conidias cilíndricas , en masas conidiales agrupadas en forma de picnidios de color gris a negro y distribución aleatoria	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 20 a 30 días, con un diámetro de 9 cm. La formación de picnidios es escasa. El micelio aéreo se concentra en los fragmentos de tallo que se encuentran en el medio.
	V8A	Micelio blanco- gris, abundante, algodonoso, crecimiento circular o irregular. Conidias cilíndricas , agrupadas en masas conidiales en forma de picnidios de color negro y distribución aleatoria	Crecimiento lento, comienzo de esporulación a los 15 a 20 días, con un diámetro de 6.5 cm. la formación de picnidios es escasa.

SF: Tallo sin filtrar **F:** Tallo filtrado **V8A:** medio a base de vegetales (Campbell)

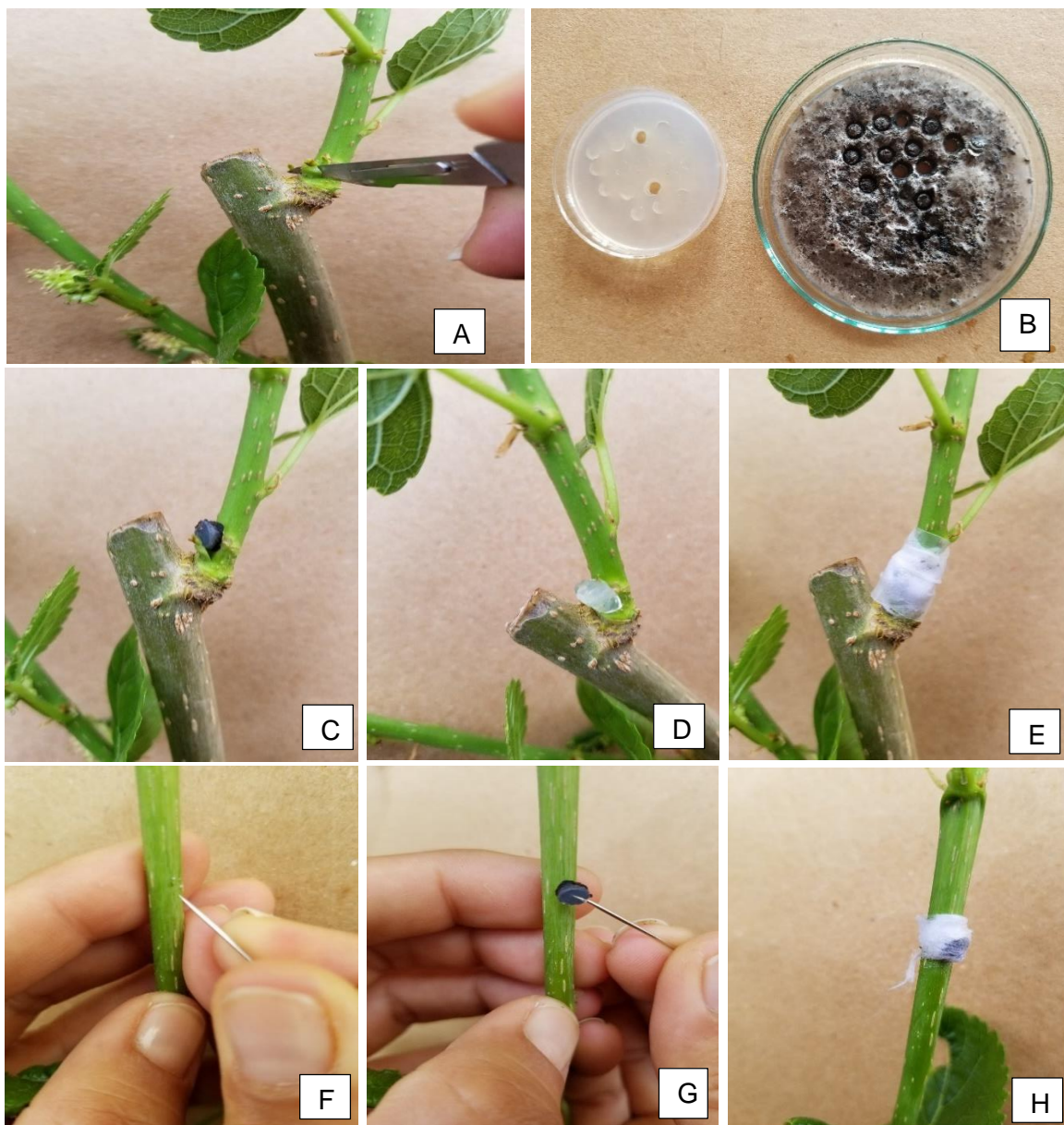
3.4 Material vegetal para inoculación

La obtención del material vegetal se realizó teniendo en cuenta la selección de semilla sana con el fin de garantizar material vegetal libre de la enfermedad, se utilizó estacas de la variedad Kanva obtenidas de la parte media y basal de la rama y enraizadas en una solución de (AIB), las estacas enraizadas fueron trasplantadas 20 días después del tratamiento con fitohormonas a bolsas con sustrato (arena y tierra negra en un proporción 1:1), el cual fue desinfectado con una solución de peróxido de hidrógeno y agua. Posteriormente las plantas fueron separadas en mayores y menores de 30 cm y rotuladas para luego ser inoculadas.

3.5 Métodos de inoculación

La inoculación de los microorganismos que fueron patogénicos (PA1, 38M y 38B) se realizó probando los métodos mediante punción y herida, utilizando como inóculo, suspensión de

esporas o fragmento de micelio. Los tallos fueron inoculados en la base o parte media, para ello se tuvo en cuenta su longitud (mayores y menores de 30cm), (Figura 3.18).



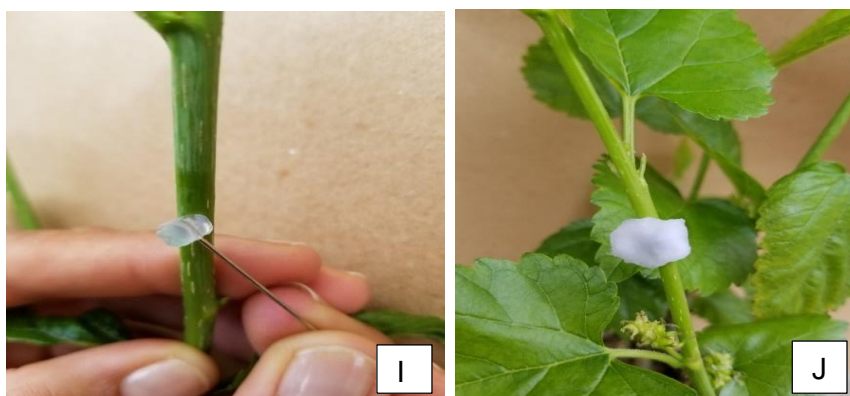


Figura 3.18. Proceso de inoculación de microorganismos. A Aislamientos para inoculación y medio estéril. B Herida con bisturí tipo bolsillo en la base de la rama. C Inoculación con porción de micelio en la base de la rama. D. Inoculación con porción de medio estéril en la base de la rama. E. Micelio cubierto con algodón y Parafilm F Punción con alfiler para inoculación en la parte media de la rama. G. inoculación con porción de micelio. H. Micelio cubierto con algodón y parafilm I. Inoculación con porción de medio estéril en la parte media de la rama. J. Algodón saturado de agua estéril cubriendo la porción de medio.

En las tablas 10,11 y 12 se observa que estadísticamente se encontró diferencias significativas en la inoculación en ramas mayores de 30 cm donde el área de infección fue mayor debido su tamaño, el hongo tiene más tejido donde infectar y se puede desarrollar rápidamente en comparación con los tallos delgados. Los hongos del género 38 B y 38M (aislados de la base y parte media de la rama) inoculados en tallos menores de 30 cm mostraron mayor área de infección con el método de herida debido a que el tejido queda más expuesto al contacto del patógeno con el sistema vascular de la planta haciendo más fácil su penetración, pero en ramas grandes no se encontró diferencias significativas. Las ramas inoculadas con el hongo 38B utilizando una porción de medio con micelio presentaron mayor área de infección en comparación con las inoculadas con suspensión de esporas, posiblemente debido a la baja concentración de esporas empleada, sin embargo, se deben probar otras concentraciones para determinar cuál es más adecuada para causar infección; se esperaría que en un proceso de infección natural tenga mayor participación la infección por esporas.

En el caso de 38M y en el de PA1 no se encontraron diferencias significativas entre los medios de inoculación lo que puede estar indicando que los dos presentan una capacidad de infección similar. Esta información coincide con Trejo (2011), quien afirma que de manera asexual por simple fragmentación del micelio cada una porción del patógeno puede dar lugar a un nuevo

individuo, de igual manera la formación de esporas de forma sexual también es común en la multiplicación de hongos. Estos dos tipos de reproducción están en la capacidad de infectar nuevas plantas de una manera eficiente, cuando se tienen las condiciones ambientales favorables. La inoculación con una porción de micelio posiblemente se vio favorecida al mantener un microambiente húmedo las primeras 48 horas con el uso de algodón cubriendo el patógeno y el riego diario.

En la inoculación con PA1 no se encontraron diferencias significativas entre herida y punción lo que quiere decir que el hongo tiene la capacidad de infectar sin importar el tamaño de la rama. Esta información coincide con la descrita por Agrios (2006) quien afirma que los hongos penetran las plantas a través de heridas y/o aberturas naturales, tejidos lacerados o destruidos, además que estos patógenos en esos tejidos se desarrollan muy bien antes de llegar a tejidos sanos, al parecer los microorganismos se desarrollan en la savia de la planta o en películas de agua presentes en las heridas; luego, invaden la planta por medio de haustorios en las células vegetales adyacentes secretando enzimas que destruyen las células cercanas.

En la zona de inoculación no se encontraron diferencias significativas lo que indica que los hongos pueden infectar tanto en la base como la parte alta de la rama, pero en PA1 el área de infección es mayor en la parte media de la rama, posiblemente debido a que el tejido es menos lignificado y fácil de degradar. En conclusión se puede decir que la longitud de la rama está relacionada con la infección de los microorganismos y en el caso del género 38B y 38M el método de inoculación está relacionado con la infección de la enfermedad. Según Agrios, (2006), la pared celular es la principal barrera que los patógenos deben atravesar para infectar la planta, es una defensa estructural por lo que sus componentes depende que los hongos puedan infectar o no. La pared celular está compuesta por carbohidratos, celulosa y proteínas estructurales, la lignina, la suberina y ceras como la cutina pueden proporcionar a las células vegetales una barrera a la entrada de hongos y a la difusión de toxinas y enzimas fúngicas (Lozovaya *et al.*, 2006).

Castro y Fontes, 2005, afirman que la infección del tejido está relacionada con la intervención de las enzimas de degradación de polímeros de pared celular que producen los hongos fitopatógenos como las glucanasas, xilanasas, pectinasas y ligninasas, que ocasionan la maceración de los tejidos del huésped ocasionando la muerte de la planta y juegan un

importante papel en la patogénesis. La planta invadida por el patógeno también produce inhibidores de proteinasas, defensinas, tioninas, proteínas de transferencia de lípidos y proteínas inhibidoras de polisacaridasas fúngicas, que colaboran en la defensa de la planta frente al patógeno. A su vez, el patógeno contraataca mediante la producción y secreción de toxinas, antibióticos y polisacáridos de oclusión, la emisión de elicitores (activadores de reacciones defensivas) por parte del patógeno puede desencadenar reacciones de hipersensibilidad acompañadas de la liberación de fitoalexinas por parte de las células huésped, provocándose la muerte tanto del patógeno como de la planta (Blanch *et al.*, 2008). En la morera se observó la reacción de la planta a los microorganismos inoculados con la producción de halos necróticos en el caso del hongo 38B y 38M, ocasionando el bloqueo en los haces vasculares para evitar la infección del patógeno, pero como consecuencia la muerte de la rama en pocos días.

Tabla 10 Resultados nivel de significancia del crecimiento de la lesión en pruebas de patogenicidad evaluado por comparación de medias del PA1

Interacción	General	Rama <30	Rama>30
(P<0,05)			
Rama	2.534e-06 *	-	
Zona	0.3878	0.00330 *	0.6886
Inóculo	0.9195	0.455916	0.6886
Método	0.9517	0.477819	.7311
Rama: Zona	0.1117	-	-
Rama: Inóculo	0.5150	-	-
Zona: Inóculo	0.2655	0.523469	0.1604
Rama: Método	0.5590		
Zona: Método	0.8033	0.181257	.7854
Inóculo: Método	0.9195	0.956105	.8973
Rama: Zona: Inóculo	0.1176	-	-
Rama:Zona:Método	0.4488	-	-
Rama: Inóculo: Método	0.8876	-	-
Zona: Inóculo: Método	0.9624	0.150638	.5304
Rama: Zona: Inóculo: Método	0.2599	-	-

*Existen diferencias significativas con un P< 0,05

Rama: longitud de la rama

Zona: inoculación en la parte media o base de la rama

Inóculo: suspensión de esporas o fragmento de micelio

Método: punción o herida

Tabla 11 Resultados nivel de significancia del crecimiento de la lesión en pruebas de patogenicidad evaluado por comparación de medias de 38 (Base de la rama)

Interacción	General	Rama <30	Ramas >30
(P<0,05)			
Rama	0.38925	-	
Zona	0.57555	0.2714	0.53423
Inóculo	0.04209 *	0.1969	0.09658
Método	0.02570 *	0.2463	0.03163 *
Rama: Zona	0.20387	-	-
Rama: Inóculo	0.93291	-	-
Zona: Inóculo	0.29225	0.2857	0.21849
Rama: Método	0.71260	-	-
Zona: Método	1.00000	0.3805	0.59401
Inóculo: Método	0.23131	0.2837	0.73792
Rama: Zona: Inóculo	0.46746	-	-
Rama:Zona:Método	0.15005	-	-
Rama: Inóculo: Método	0.55671	-	-
Zona: Inóculo: Método	0.61142	0.3987	0.38925
Rama: Zona: Inóculo: Método	0.37218	-	-

*Existen diferencias significativas con un P< 0,05

Rama: longitud de la rama

Zona: inoculación en la parte media o base de la rama

Inóculo: suspensión de esporas o fragmento de micelio

Método: punción o herida

Tabla 12 Resultados nivel de significancia del crecimiento de la lesión en pruebas de patogenicidad evaluado por comparación de medias 38 (Parte media de la rama).

Interacción	General	Rama <30	Rama >30
(P<0,05)			
Rama	0.04326 *	-	
Zona	0.09903	0.83205	0.1072
Inóculo	0.35317	0.11450	0.3871
Método	0.72731	0.01865 *	0.7920
Rama: Zona	0.09643	-	-
Rama: Inóculo	0.40976	-	-
Zona: Inóculo	0.38131	0.47421	0.4000
Rama: Método	0.85505	-	-
Zona: Método	0.47238	0.96615	0.4766
Inóculo: Método	0.36687	0.41809	0.3871
Rama: Zona: Inóculo	0.40670	-	-
Rama:Zona:Método	0.47071	-	-
Rama: Inóculo: Método	0.39504	-	-
Zona: Inóculo: Método	0.37840	0.37870	0.4000
Rama: Zona: Inóculo: Método	0.40976	-	-

*Existen diferencias significativas con un P< 0,05 Rama: longitud de la rama

Zona: inoculación en la parte media o base de la rama

Inóculo: suspensión de esporas o fragmento de micelio

Método: punción o herida

3.6 Pruebas de patogenicidad

Los patógenos correspondientes a los aislamientos 38M, 38 B y PA1 inoculados en las plantas de morera fueron re aislados de los tallos que mostraron los síntomas de la enfermedad en la parte media y en la base de la rama comprobando de esta manera que estos microorganismos están estrechamente relacionados a la sintomatología del necrosamiento del tallo en el cultivo de morera (Figura 3.19) al cumplir con los postulados de Koch; posteriormente fueron multiplicados en diferentes medios de cultivo e incubados a dos temperaturas para evaluar su crecimiento y esporulación; los otros aislamientos al no causar síntomas de la enfermedad, se consideraron no patogénicos a este hospedero y fueron descartados.

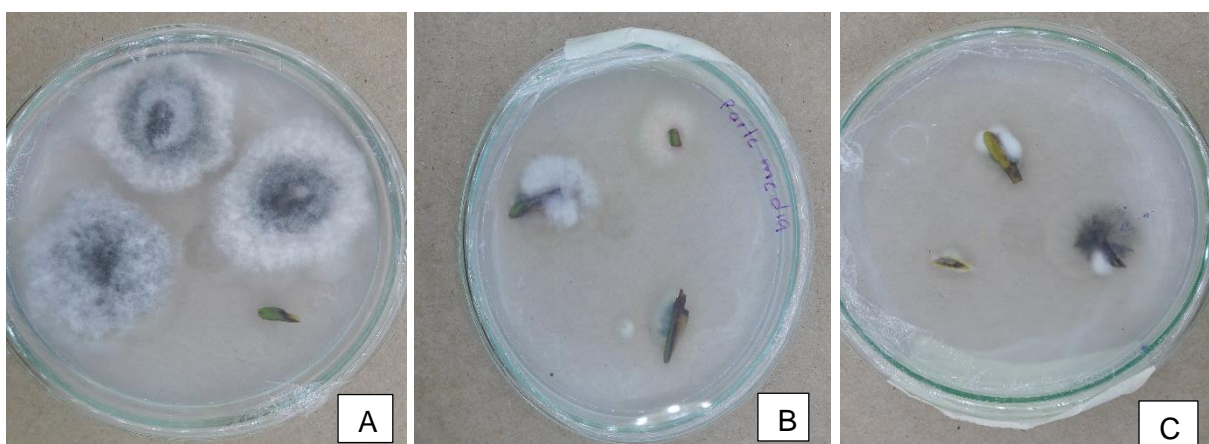


Figura 3.19. Postulados de Koch: re aislamiento de los hongos inoculados en plantas de morera: A. Hongo del aislamiento 38 B de la base de la rama. B. Hongo del aislamiento 38M de la parte media de la rama. C. Hongo del aislamiento PA1 del tallo y de la raíz.

3.7 Genotipificación molecular de aislamientos

El Gel de agarosa mostró la identificación de 3 microorganismos, produciendo fragmentos entre 500 y 600 pb, las variaciones de tamaño son una evidencia inicial de que los microorganismos corresponden a 2 especies diferentes donde la muestra del aislamiento de la planta adulta tiene peso molecular de 569 pb, y los aislados de parte media y base de rama tienen peso molecular de 539 pb. Se observó que los patógenos correspondientes a la parte

media y base de la rama son muy cercanas pero sus bandas no están perfectamente alineadas y es posible que exista una ligera diferencia entre las especies (Figura 3.20)

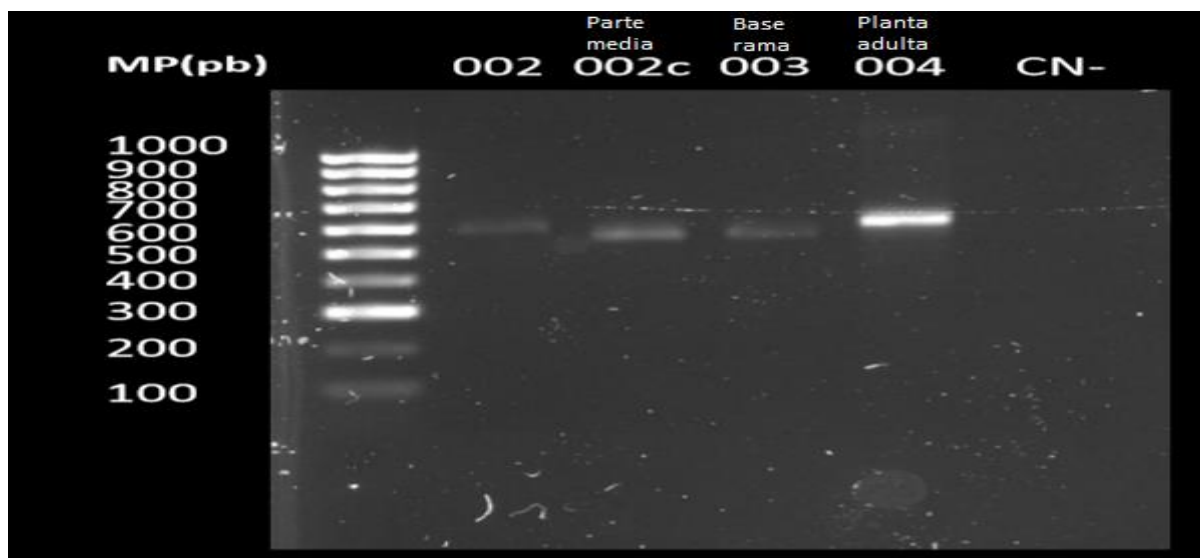


Figura 3.20. Geles de agarosa, que visualizan el amplificado de los aislamientos de parte media, base de la rama y planta adulta, identificados como *Phoma exigua* (parte media y base de la rama) y *Myrothecium verrucaria* (planta adulta).

El análisis proveniente del análisis del alineamiento múltiple de secuencias de la región ITS que fue realizada para los hongos aislados de la parte media, base de la rama y plantas adultas de 16 a 18 meses, el análisis incluyó las secuencias de los aislamientos obtenidos en este estudio y reportes previos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en especies y géneros estrechamente relacionados. Fueron eliminados los segmentos de los extremos que no estaban representados en todas las secuencias y los gaps internos presentes, generando un bloque informativo que fue empleado para realizar la reconstrucción filogenética.

El dendrograma se dividió en dos clados principales representando los géneros *Phoma* y *Myrothecium* correspondiente a los órdenes Dothideales e Hypocreales. Los aislamientos en el primer clado fueron comparados con *Boeremia exigua* var *exigua* strain CBS 289.29, *Boeremia exigua* var *heteromorpha* strain CBS110.33, *Boeremia exigua* var *exigua* strain CBS 596.67 y *Phoma* sp strain daef 45; como grupo externo se usó *Medicopsis romeroi* strain IP

571.61; en este clado se encuentran los dos aislamientos de la base y parte media de la rama los cuales muestran una estrecha relación entre ellos con valores de bootstrap 99%, indicando que los microorganismos son similares genéticamente y se está hablando de la misma especie del hongo, ellos corresponden al género *Phoma*. Los aislamientos se encuentran relacionados con *Boeremia exigua var exigua* y *Boeremia exigua var heteromorfa* con valores de bootstrap de 99% y presentan sinonimia con *Phoma exigua var exigua* y *Phoma exigua var heteromorfa* (Aveskamp *et al.*, 2010).

El segundo clado el aislamiento de la planta adulta se comparó con *Myrothecium isolate endophytic fungi*, *Myrothecium verrucaria strain DCF89* y *Albifimbria verrucaria strain 11*, como grupo externo se usó a *Stachybotrys chartarum strain ATCC 26303*; en este clado se encuentran microorganismos del género Hypocreales donde se encuentran hongos con una relación estrecha en su secuencia genética a *Albifimbria verrucaria strain 11* y *Myrothecium verrucaria strain DCF88* con valores de bootstrap 98%, se debe tener en cuenta que *Albifimbria verrucaria* y *Myrothecium verrucaria* presentan sinonimia (Lombard y Crous, 2016) (Figura 3.21).

Los aislamientos correspondientes a la base de la rama (38B) y parte media de la rama (38M) corresponden a *Phoma exigua* (var. *exigua* o var. *heteromorfa*); para el aislamiento correspondiente a raíces y tallo de plantas adultas (PA1) se encontró un 99% de correspondencia a *Albifimbria verrucaria* (Sin. *Myrothecium verrucaria*); sin embargo, no fue posible la identificación de las subespecies de *Phoma exigua*; hecho que demuestra la variabilidad de la especie en el cultivo de morera. (Anexo F). Según Maikel *et al.*, 2009, el reconocimiento de variedades del género *Phoma* todavía se considera difícil debido a que muchas de estas son el resultado de la variación natural dentro de los taxones y de la expresión de muchos caracteres morfológicos que dependen de pequeñas variaciones en el sustrato y las condiciones de crecimiento.

Los aislamientos obtenidos corresponden con la información reportada por Gupta, Govindaiah y Raju (1997) y (Chattopadhyay *et al.*, 2002 quienes encontraron a *Phoma exigua* afectando el tallo de plántulas de morera y a *Myrothecium verrucaria* ocasionando lesiones y manchas necróticas en hojas de *Morus alba L.* y *M. bombycis* en India.

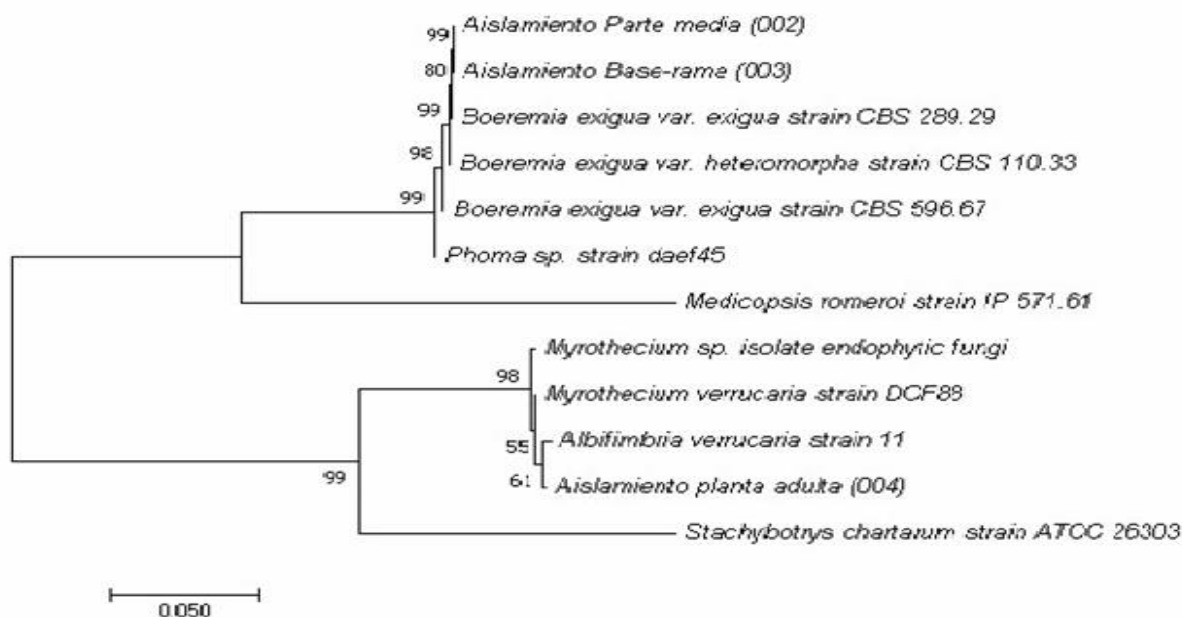


Figura 3.21. Dendrograma. Dendrograma proveniente del análisis del alineamiento múltiple de secuencias de la región ITS de los aislamientos de la parte media, base de la rama y planta mediante la plataforma Blast y bioedit.

3.8 Caracterización morfológica

En la caracterización morfológica se encontró variabilidad entre los hongos *Myrothecium verrucaria* y *Phoma exigua* para el crecimiento diario, forma, de las colonias en los medios de cultivo, siendo el medio PDA donde hay un crecimiento rápido y micelio abundante, el medio V8A esporulación escasa pero rápida, en el MDA(F) el crecimiento es lento y micelio escaso, en el MA(SF) el crecimiento es lento y el micelio se concentra en los fragmentos de tallo. Según, García, 2000, los cambios drásticos en el aspecto macroscópico de las colonias como los observados en la Figura 3.22, muestran que el cultivo periódico puede presentar una actividad celular que induce una alternancia de generaciones de tal manera que después de cierto tiempo, las células conservadas serán descendientes lejanos de las iniciales, mostrando cambios de color, crecimiento y forma.

Por su parte Alarcón, 2006, afirma que la declinación de las características deseables de una cepa, se han atribuido a diferentes factores que actúan en el almacenamiento de la misma, entre ellos se encuentran: carencia o agotamiento de los nutrientes en el medio de cultivo,

acumulación de secreciones tóxicas propias del metabolismo de hongo, luz, alteración del pH en el medio (acidez o alcalinidad), disminución en la concentración de oxígeno y la consecuente acumulación de CO₂.

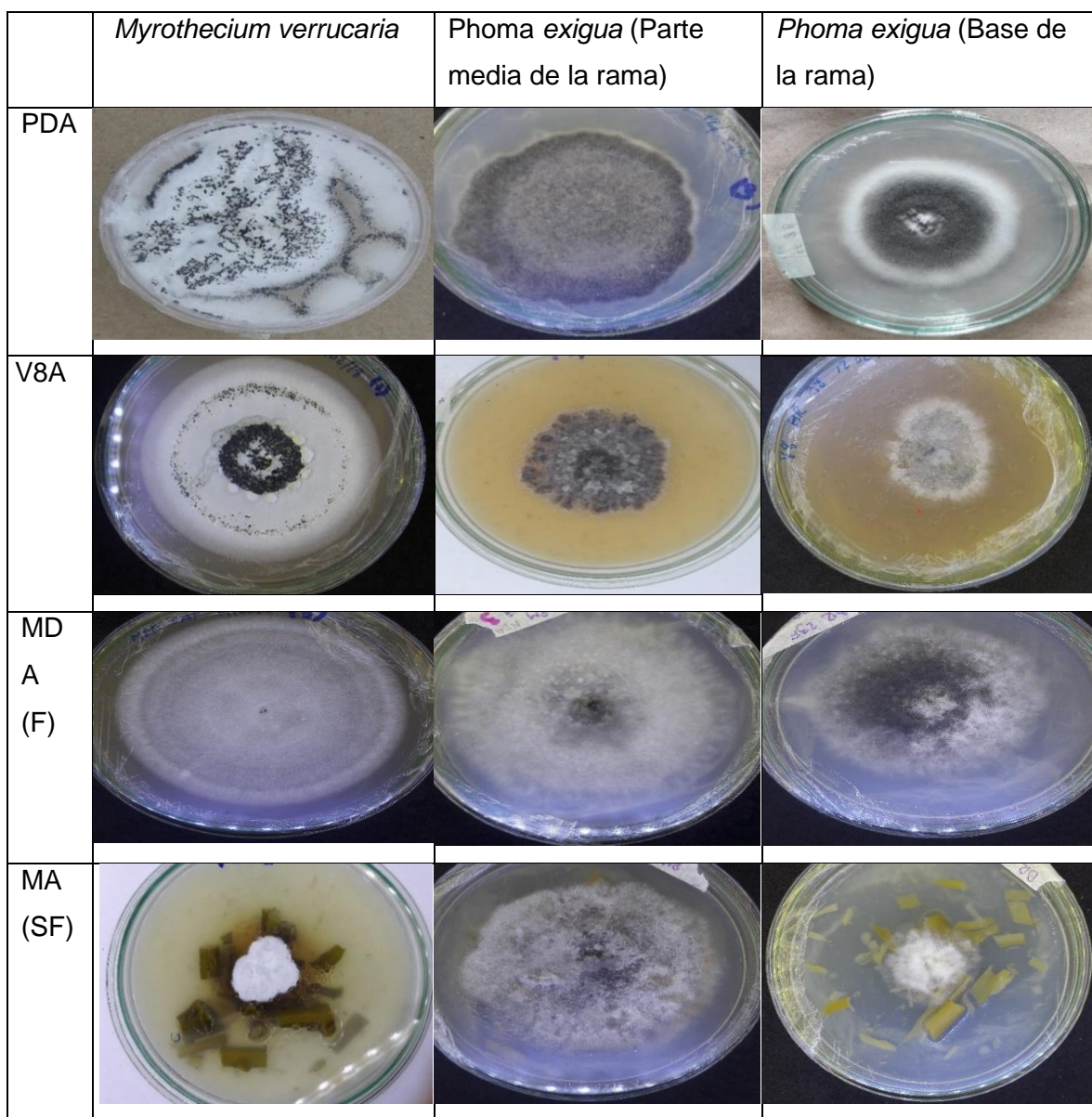


Figura 3.22. Morfología de microorganismos aislados en cuatro medios de cultivo. Se observa el crecimiento de los microorganismos *Myrothecium verrucaria*, *Phoma exigua* (Parte media de la rama) y *Phoma exigua* (Base de la Rama) aislados en medios PDA, V8A, MDA (F) y MA (SF).

3.8.1 Características morfológicas del hongo *Myrothecium verrucaria*. Colonias de crecimiento radial que presentan generación de micelio blanco pulverulento (cremoso al rasparse con asa). Forma estructuras similares a estromas de color verde oscuro-negro. En medio PDA forma pigmento de color amarillo claro en el reverso de la caja. Se observa micelio septado, aéreo abundante y afelpado. Las conidias son hialinas, septadas, ovoides con ápice subagudo los picnidios son de color negro que sobresalen en la parte superior del micelio, en cuyo interior las hifas son hialinas septadas delgadas. Conidióforos simpodiales (Figura 3.23).

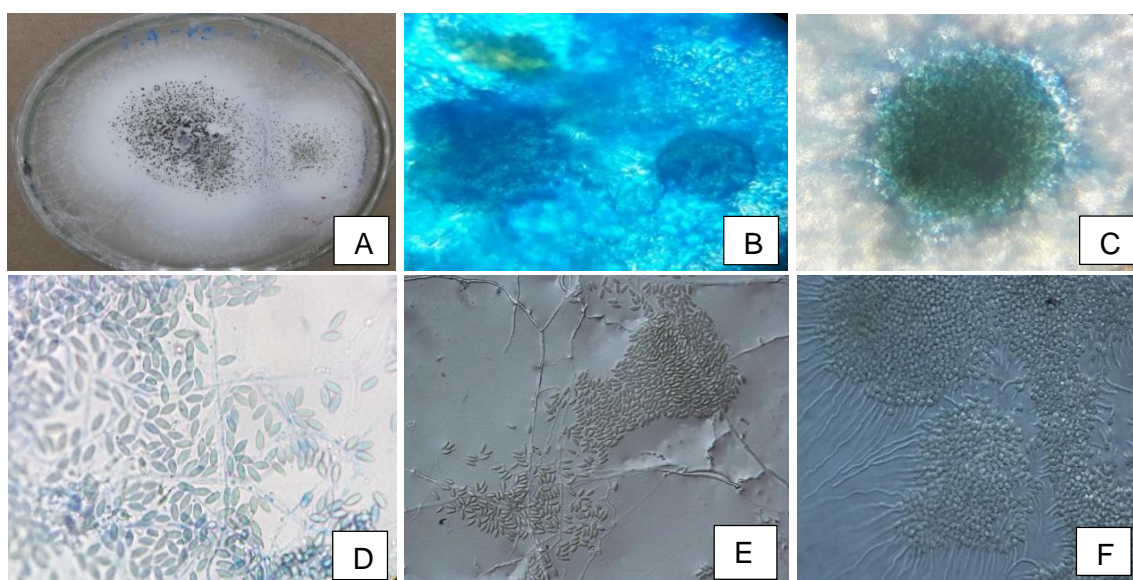


Figura 3.23. Características microscópicas del hongo *Myrothecium verrucaria* a 40x. A crecimiento del hongo *Myrothecium verrucaria* en medio PDA. B y C. Picnidios. D y E. Conidias. F. Germinación de conidias.

3.8.2 Características morfológicas del hongo *Phoma exigua*. En los aislamientos del hongo correspondiente al género *Phoma*, se observan colonias de crecimiento radial, con micelio algodonoso, compacto de pigmentación grisácea tiene micelio septado, sus conidias son cilíndricas y contienen un septo en el centro. Entre los 12 y 20 días de crecimiento se puede observar la formación de picnidios y posteriormente de conidias. Cuando el hongo ha esporulado, se observa una masa de apariencia gelatinosa de color grisáceo, (Figura 3.22 y 3.23).

Características del hongo *Phoma exigua* aislado de la base de la rama

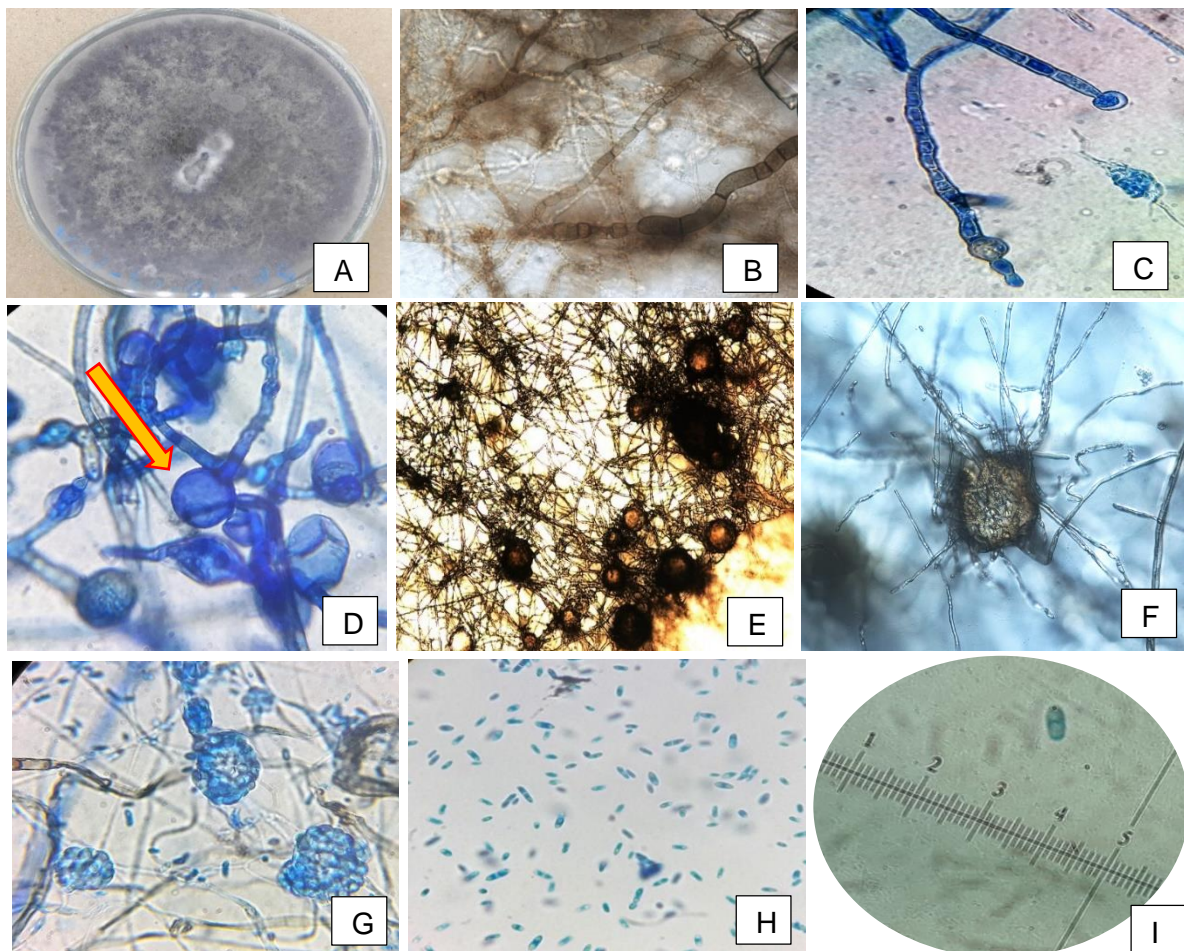


Figura 3.24. Características macroscópicas y microscópicas del hongo *Phoma exigua* a aislado de la base de la rama a 40x y 100x. A. Crecimiento del hongo en medio PDA B. y C. Micelio septado a 40x. D. Formación de clamidosporas. E y F. Picnidios a 40x y 100x G, H, I. Conidias del hongo *Phoma exigua* a 40x y 100x.

Características del hongo *Phoma exigua* aislado de la parte media de la rama.

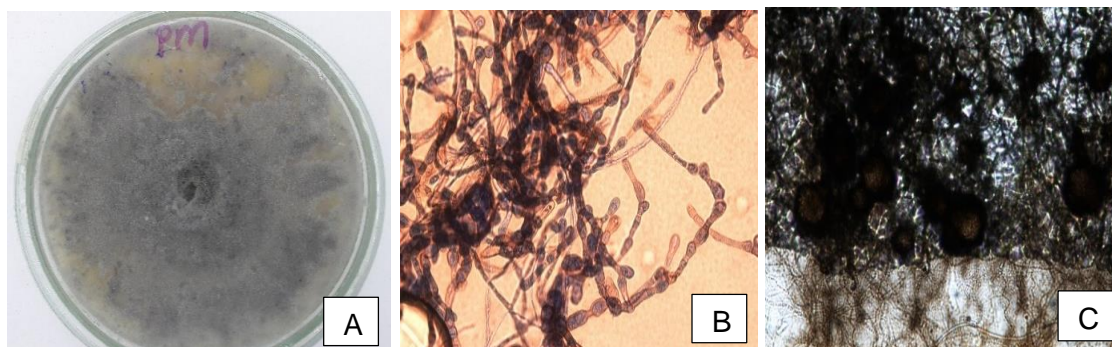




Figura 3.25. Características macroscópicas y microscópicas del hongo *Phoma exigua* a aislado de la base de la rama a 40x y 100x. A. Crecimiento del hongo en medio PDA B. Micelio septado a 40x. C y D. Picnidios a 40x y 100x. E Formación de clamidosporas A 100x F. Conidias del hongo *Phoma exigua* a 100x.

3. 9 Síntomas en ramas inoculadas con *Myrothecium verrucaria*

3.9.1 Síntomas en ramas mayores de 30 cm inoculadas con *Myrothecium verrucaria*. En las ramas inoculadas con este microorganismo se observan síntomas en forma de hundimiento seco que crecen cuando avanza la enfermedad , tanto en la parte media como en la base de la rama; inicialmente la lesión es de color verde oliva claro y posteriormente se torna marrón; en ocasiones se observa hinchazón en la capa de súber alrededor de la herida en forma de chancro, algunas veces se presenta una lesión deprimida sobre el tallo.

Generalmente se observa una grieta central en el centro de la lesión que deja al descubierto tejido necrosado, cuando el tallo esta lignificado; es común en plantas con brotes mayores a los 30 cm, (Figura 3.26). Los síntomas coinciden con los reportados Dudek, (2014), que afirma que *Myrothecium verrucaria* es un patógeno de las plantas perennes que causa la pudrición en el tallo debido a que degrada la celulosa rápidamente, aunque en morera es común afectando la hoja. Los controles experimentales (inoculados con medio estéril o agua destilada estéril) no presentaron síntomas de enfermedad, (Tabla 10).

Es importante mencionar que el hongo *Myrothecium verrucaria*, fue aislado de tallos y raíces de plantas adultas de 14 a 16 meses de edad; también se encontró en estos tejidos

microorganismos del género *Phoma exigua*; es posible que exista una interacción entre estos patógenos para causar la enfermedad.

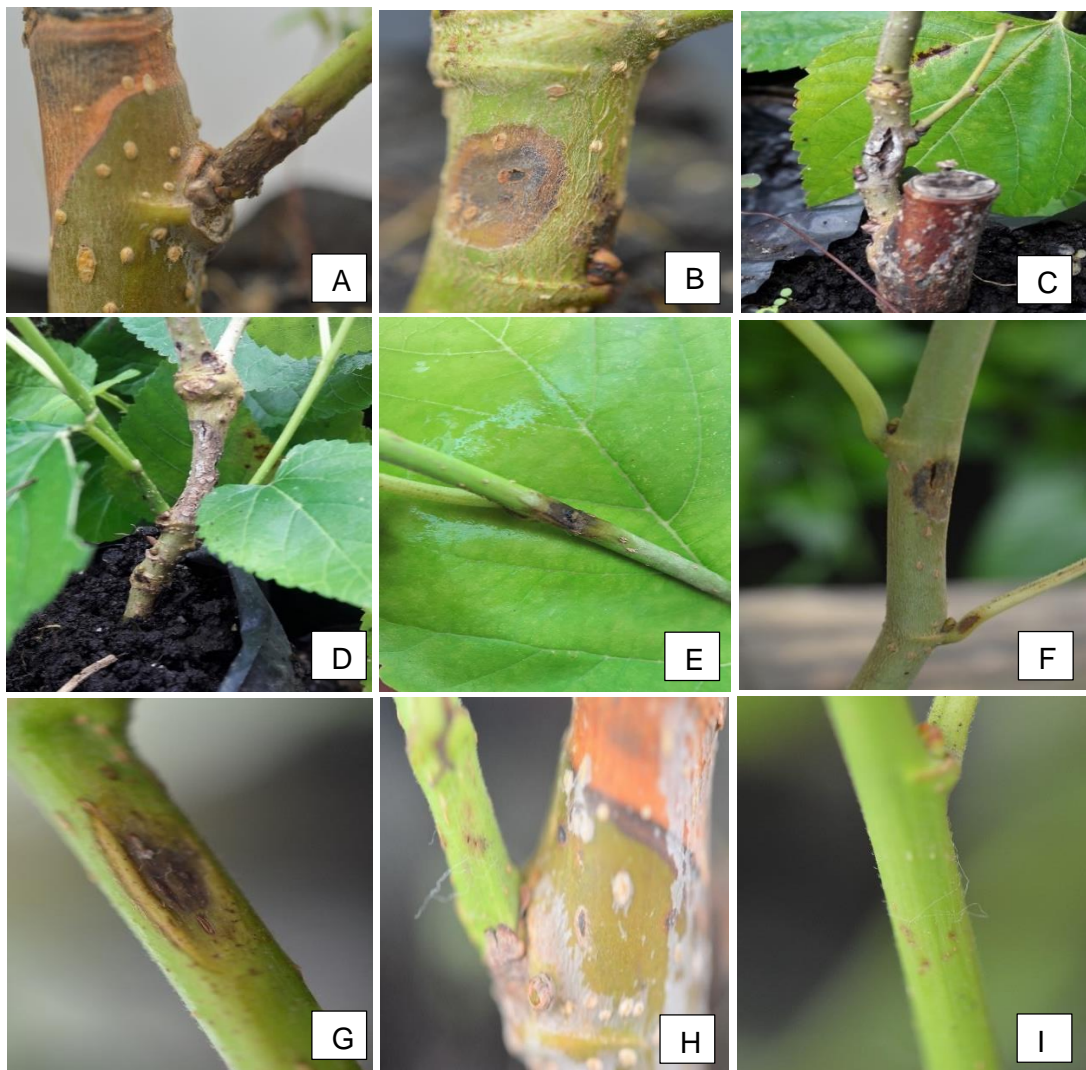


Figura 3.26. Lesiones en plantas mayores de 30 cm, 8 días después de la inoculación. A, B, C y D. Síntomas en planta inoculadas en la base del tallo utilizando como inóculo fragmentos de la colonia del hongo en medio de cultivo. E, F G. Síntomas en plantas inoculadas en la parte media del tallo utilizando como inóculo fragmentos de la colonia del hongo en medio de cultivo. H, I. Testigos inoculados por punción.

3.9.2. Síntomas en ramas menores de 30 cm inoculadas con *Myrothecium verrucaria* . En las ramas inoculadas menores de 30 cm en los primeros días después de la inoculación se observa una lesión de color verde oliva claro, con el avance de la enfermedad se evidencia deshidratación o pérdida de turgencia en el tallo causando una inclinación de este; cuando la lesión abarca toda la sección del tallo ocasiona la muerte de la rama. En las hojas se presentan manchas de color marrón con borde amarillo (Figura 3.27).

En el caso de *Myrothecium verrucaria* Kuti *et al.* 1989, investigaron el proceso de infección en el cultivo de espinaca y encontraron que este microorganismo tiene una alta producción de mico toxinas tricotecenas macro cíclicas, como la roridina E y H, verrucarina A y B que desempeñan un papel en la fitopatogenicidad; además que los tricotecenos de tipo D inhiben la formación del enlace peptídico, evitando así la síntesis de proteínas. Por otro lado, Abbas *et al.* 2002 encontraron que la toxina verrucarina A, es capaz de causar daño celular, la inhibición del crecimiento y la pérdida de clorofila, siendo un metabolito altamente tóxico, lo cual contribuye al rápido proceso de infección. Condición similar a la observada en morera lo cual ocasiono un rápido proceso de infección de los tallos, ocasionada posiblemente por la acción de las toxinas producidas por el microorganismo inoculado. Por otra parte, Murakami *et al.* (2005) informaron que los hongos del género *Myrothecium* producen micotoxinas B y enzimas hidrolíticas que pueden jugar un papel importante en la degradación de tejidos y así penetrar los tejidos en la planta de manera más eficiente.

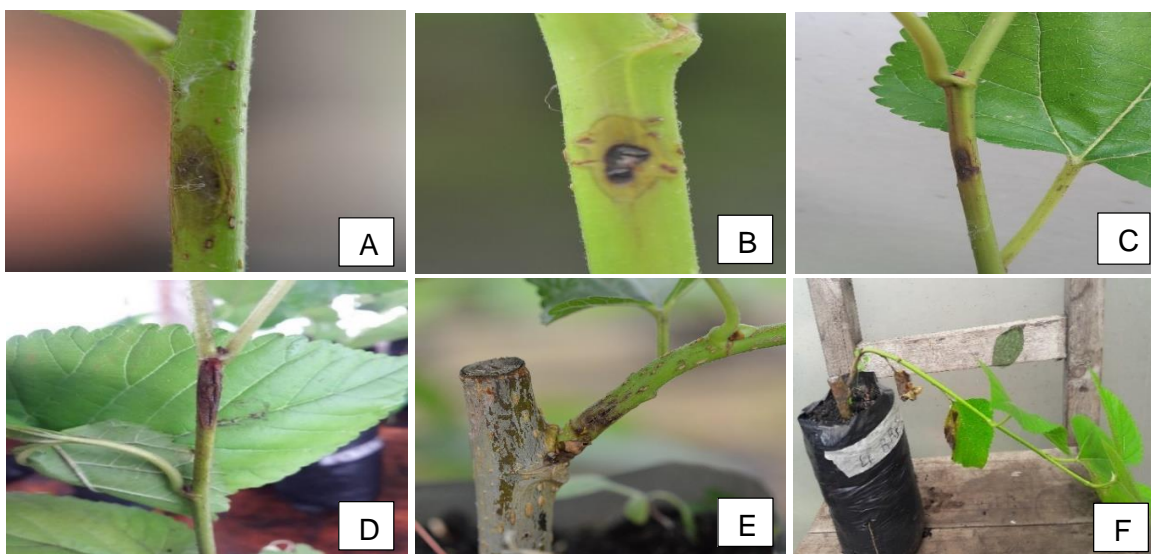




Figura 3.27. Lesión causada por *Myrothecium verrucaria* A. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación con suspensión de esporas y herida . B. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación con punción y utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. C y D Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación con herida utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. E. Lesión en la base de la rama, causada por inoculación por punción utilizando como inóculo suspensión de esporas. F. Lesión en la base de la rama, causada por inoculación por punción utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. G, H. Lesión en la base de la rama, causada por inoculación por herida utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. I) Manchas de color marrón con borde amarillo en las hojas de las plantas inoculadas

3.10 Síntomas en ramas inoculadas con *Phoma exigua*

3.10.1 Síntomas en ramas mayores de 30 cm inoculadas con *Phoma exigua*

(Parte media de la rama). En el caso se la inoculación con el hongo *Phoma exigua*, aislado de la parte media se observa una lesión de color verde oliva 3 días después de la inoculación, posteriormente se torna marrón oscuro con presencia de halo necrótico, pero en tallos mayores de 30 cm puede tardar mas de 30 días en presentar síntomas en el follaje y ocasionar muerte de la rama; no se observan diferencias en la sintomatología de las inoculaciones con punción, herida, micelio o suspensión de esporas del hongo inoculados. Esta información coincide con la descrita por Menza, (2013) quien afirma que en el cultivo de café entre 48 y 72 horas después de la penetración ocurre la maduración de los picnidios y la producción de abundantes esporas, las cuales germinan sobre los tejidos formando un tubo germinativo que penetra por heridas y/o aberturas naturales formando un apresorio.

Según Gil *et al*, 2003 después de la penetración, el apresorio produce hifas que colonizan y avanzan por los espacios intercelulares de la epidermis, invaden inter e intracelularmente el mesófilo colonizando los tejidos expresándose así los síntomas externos. En morera el proceso de infección ocurre en un tiempo similar al descrito por Menza (2013), pero los síntomas externos tardan aproximadamente de 20 a 30 días en expresarse.

El patógeno inoculado muestra el color y halo necrótico característico de la enfermedad. En las ramas inoculadas con el hongo *Phoma exigua* después de 29 días, se observan síntomas en las hojas superiores, como marchitamiento y pequeñas manchas de color marrón oscuro, similar a las que se presentan en el campo. Cuando la lesión causada por el hongo inoculado ya abarca toda la sección del tallo, causa taponamiento de vasos conductores (Figura 9). En las ramas inoculadas mediante punción los síntomas externos en el tallo tardaron más tiempo en presentarse debido a la producción de látex que puede interferir en la colonización del hongo, pero las inoculadas mediante herida mostraron sus síntomas más rápido, porque el patógeno está en contacto directo con el sistema vascular de la planta y así tiene mayor facilidad de causar infección.

Según Deshmuk y Rai (2005) *Phoma exigua* produce fitotoxinas como la calasina B la cual es capaz de permear las membranas celulares, lo que le permite deteriorar las células sin daño de la membrana, una vez dentro, causa efectos negativos acortando los filamentos de actina, esto implica la detención de la división citoplasmática deteniendo el crecimiento de la planta. La citocalasina B impide el transporte de la glucosa y otros azúcares a través de las membranas celulares; esta información podría explicar la disminución en el tamaño de la rama una vez se ha iniciado el proceso de infección.

Los síntomas se presentaron generalmente en las ramas menores de 30 cm inoculadas con el método de punción, donde el tallo es todavía frágil y con una lesión mínima el patógeno puede infectar fácilmente; en las ramas más grandes solo se presentaron con inoculación mediante herida y utilizando fragmentos de micelio en este caso el tallo de morera presenta una mayor lignificación, por tal motivo el patógeno necesita un área de contacto más amplia para realizar el proceso de infección en la planta (Figura 3.28).

Los controles experimentales (inoculados con medio estéril y/o agua destilada estéril) no presentaron síntomas de enfermedad. Es importante anotar que en inoculaciones realizadas en invernadero se tarda más tiempo en mostrar la sintomatología igual a la que se presenta en campo.

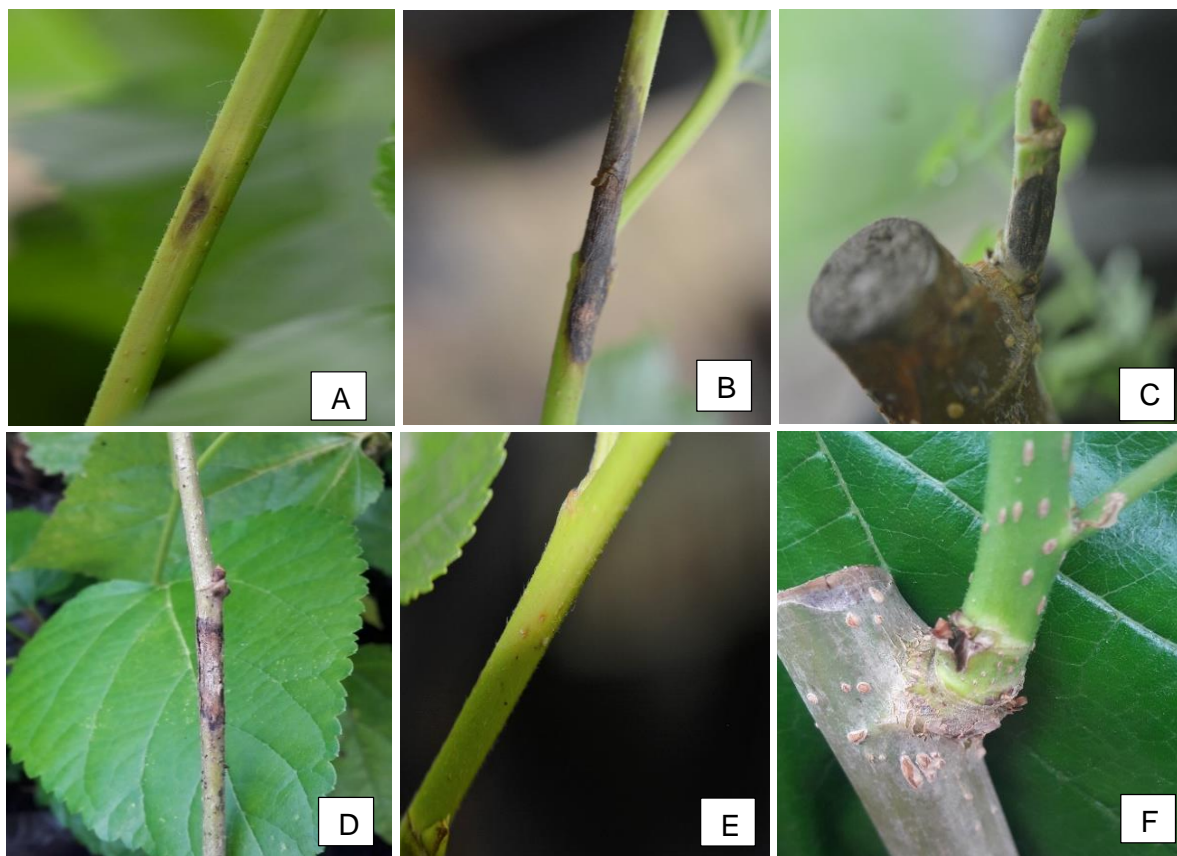


Figura 3.28. Lesiones en la base y parte media de la rama causadas por *Phoma exigua* aislado de la parte media de la rama. A. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación por punción y utilizando como inóculo suspensión de esporas. B Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación con punción y utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. C Lesión en la base de la rama, causada por inoculación con herida de bisturí utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. D. Lesión en la base de la rama, causada por inoculación por herida utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo y mostrando síntomas en las hojas superiores. E Testigo inoculado con punción. F. Testigo mediante el método de herida.

3.10.2 Síntomas en ramas menores de 30 cm inoculadas con *Phoma exigua* (Parte media de la rama).

En el hongo ocasiona una lesión de color verde oliva 3 días después de la inoculación que posteriormente se torna de color negro sin presentar halo necrótico, no se observaron diferencias en la sintomatología que se produjo con las inoculaciones realizadas con métodos de punción, herida o con los medios utilizados como micelio o suspensión de esporas. En ramas inoculadas, después de 15 días, se observa en las hojas superiores, síntomas como marchitamiento con presencia de pequeñas manchas de color marrón oscuro que luego coalescen hasta abarcar toda la hoja, posteriormente la rama muere (Figura 4.29). Los síntomas en ramas inoculadas por medio de punción generalmente se presentaron en los tallos menores de 30 cm, porque en los grandes al realizar la herida hay producción de látex y es posible que esto influenciar la penetración del patógeno.

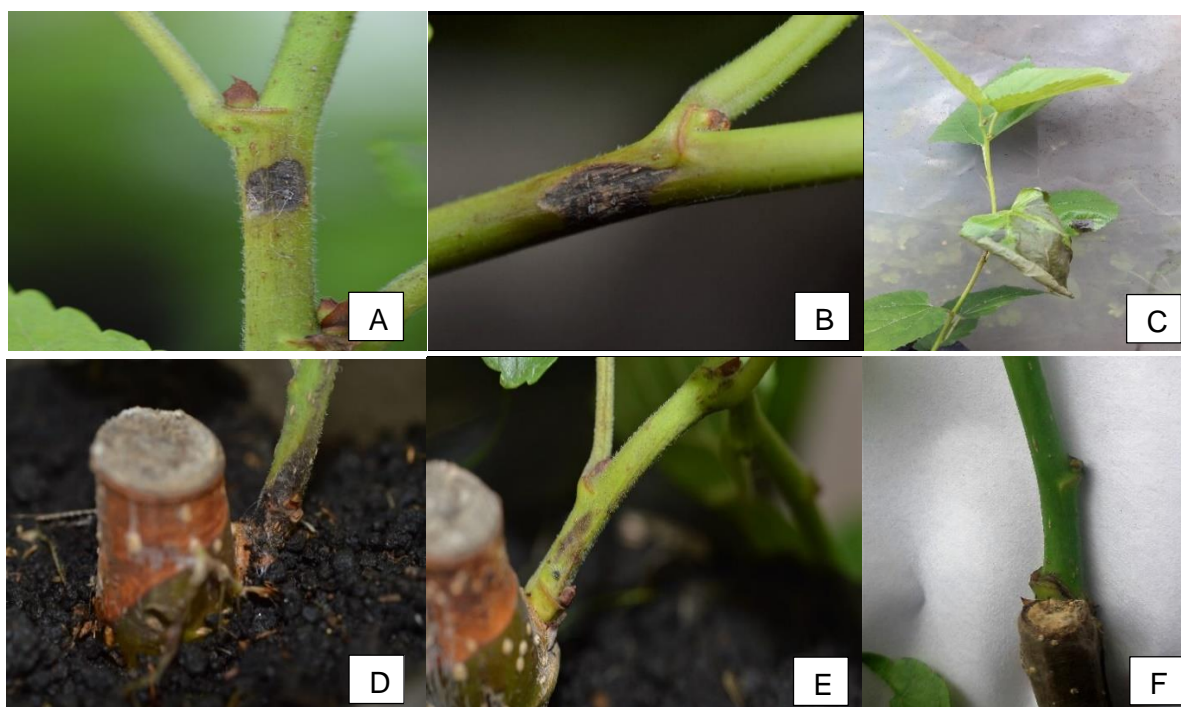
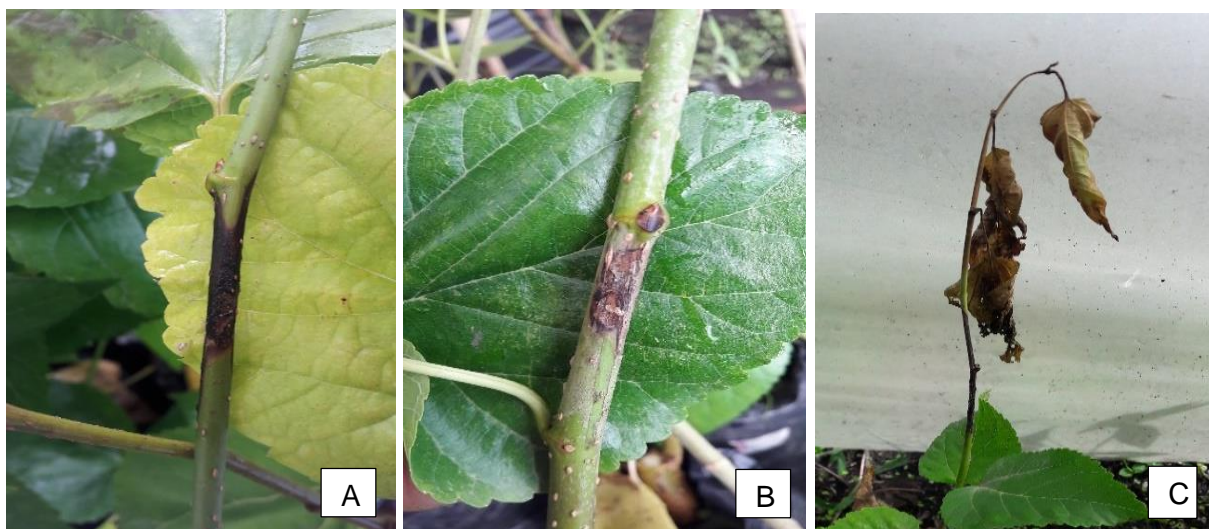


Figura 4.29. Lesiones en ramas menores a 30 cm inoculadas en la base y parte media causadas por *Phoma exigua* aislado de la parte media de la rama. A. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación por punción y utilizando como inóculo suspensión de esporas. B. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación por herida y utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. C. Síntomas en las hojas superiores. D. Lesión en la base de la rama, causada por inoculación por herida y utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. E. Lesión en la base de la rama, causada por inoculación por punción y utilizando como inóculo suspensión de esporas. F. Testigo inoculado mediante el método de herida.

4.10.3 Síntomas en ramas mayores de 30 cm inoculadas con *Phoma exigua* (Base de la Rama). El hongo inoculado causa lesiones que inician de color verde oliva a los 3 días después de la inoculación, posteriormente se tornan marrón oscuro con presencia de halo necrótico.

Los tallos mayores de 30 cm pueden tardar más de 30 días en presentar síntomas en el follaje y morir a causa del deterioro total de la rama, debido a que el microorganismo se caracteriza por afectar brotes y tejidos menos lignificados, según información de Gil *et al.*, 2003, quien afirma que en café *Phoma exigua* generalmente ocasiona daños en este tipo de tejidos, (Figura 3.30); también se puede percibir el halo necrótico característico de la enfermedad; después de 30 días de la inoculación, se observa síntomas en las hojas superiores, como marchitamiento y pequeñas manchas de colores marrón oscuro, similares a las que se presentan en el campo, por causa del taponamiento de vasos conductores (Figura 3.13).

Los controles experimentales (inoculados con medio estéril o agua destilada estéril) no presentaron síntomas de enfermedad.



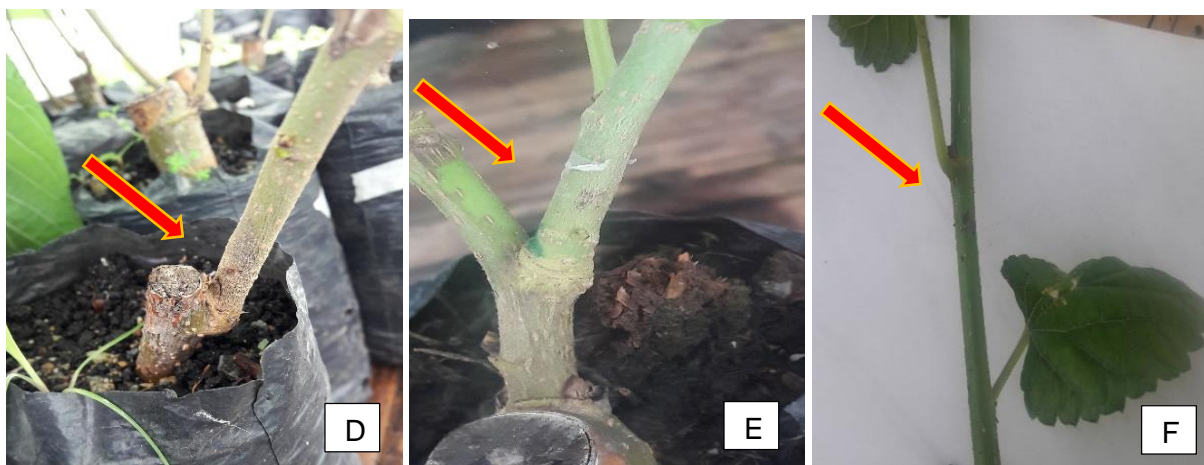


Figura 3.30. Lesiones ocasionadas en la base y parte media de la rama causados por *Phoma exigua* aislado de la base de la rama, en ramas de más de 30 cm A. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación por punción y utilizando como inóculo suspensión de esporas . B. Lesión en la parte media de la rama, causada por herida de bisturí y utilizando como inóculo segmento de la colonia con trozo de crecimiento del hongo en medio de cultivo. C. Síntomas en las hojas por la afección del patógeno. D. Lesión en la base de la rama, causada por herida utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. E, F) Testigos inoculados con punción y herida.

3.10.4 Síntomas en ramas menores de 30 cm inoculadas con *Phoma exigua*

(Base de la Rama). En ramas de menos de 30 cm de longitud el patógeno causa lesiones que inician de color verde oliva a los 3 días después de la inoculación, posteriormente se torna de color verde oliva oscuro y luego a marrón; hay presencia de halo necrótico. La lesión se demora de 15 a 20 días en ocasionar la muerte de la rama (Figura 3.31), esta información coincide con Pawlowski y Hartman (2016), quien afirma que la infección entre el huésped y el patógeno se basa en la segregación de fitotoxinas y enzimas degradadoras de la pared celular para matar el tejido de la planta; las etapas iniciales de la infección comienzan cuando las conidias germinan y forman hifas infectivas que penetran directamente en la epidermis o mediante apresorios; estos excretan una serie de enzimas líticas que incluyen oxidasas, cutinasas y lipasas para degradar la cutícula de la planta, las capas de cera y la pared celular dañando las células e invadiendo los tejidos causando lesiones necróticas.

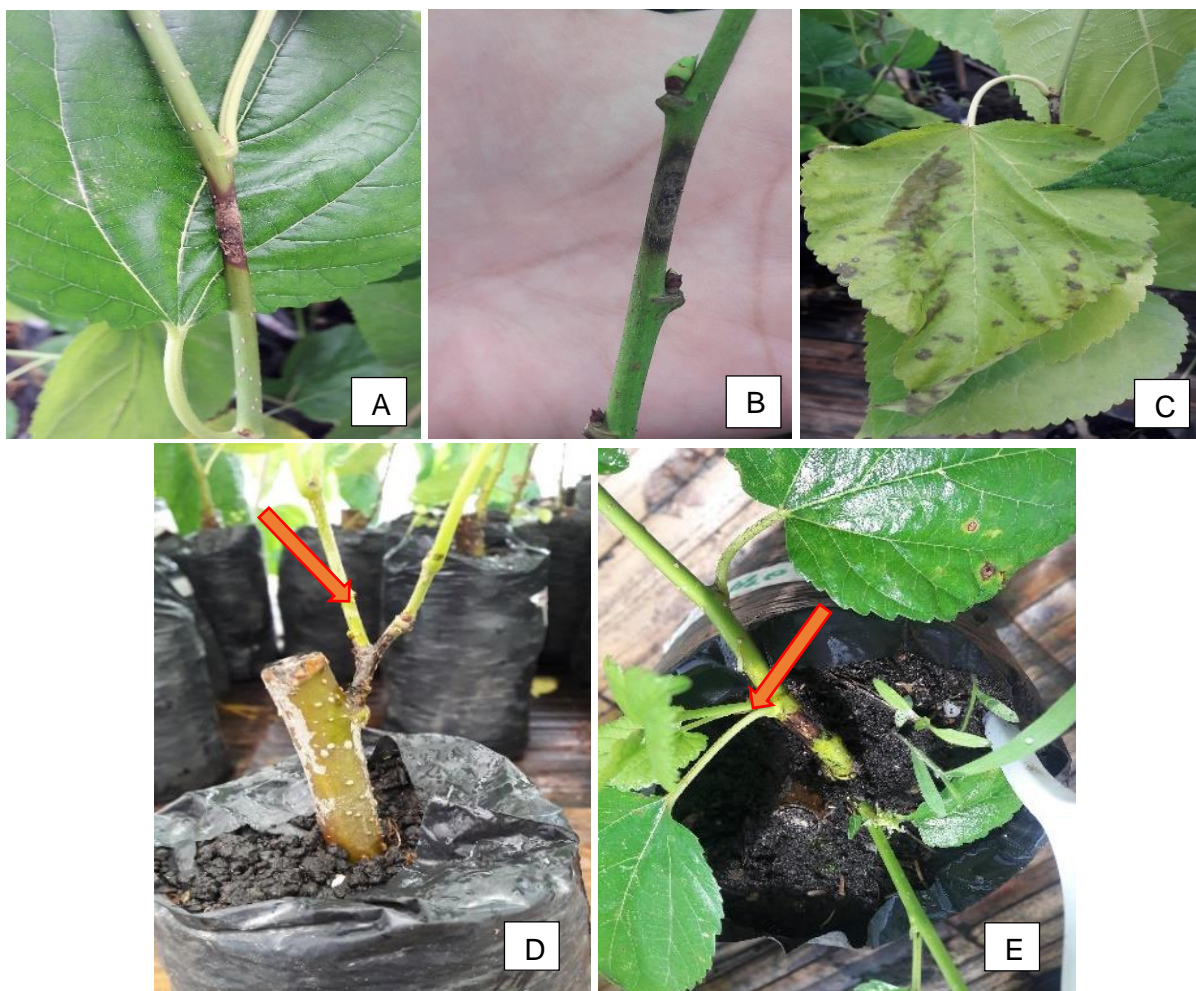


Figura 3.31. Lesiones ocasionadas en la base y parte media de la rama causadas por *Phoma exigua* aislado de la base de la rama con menos de 30 cm de longitud. A. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación por punción y utilizando como inóculo suspensión de esporas. B. Lesión en la parte media de la rama, causada por inoculación por herida y utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo. C. Síntomas en las hojas por la afección del patógeno. D. Lesión en la base de la rama, causada por herida utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo con medio de cultivo. E. Lesión causada por punción utilizando como inóculo segmento de la colonia del hongo en medio de cultivo.

3.11 Análisis microbiológico del suelo

La evaluación microscópica y macroscópica de los microorganismos aislados en los suelos de los lotes 2, 5, 18 y 13, permitió identificar hongos de los géneros *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp,

Fusarium sp y uno sin identificar No se encontraron microorganismos relacionados con el necrosamiento de la base y parte media de la rama del cultivo de morera (Figura 3.32).

***Aspergillus* sp:** Se caracteriza por tener micelio vegetativo compuesto por hifas septadas, ramificadas e incoloras, la estructura conidial es en forma de pedicelos y cabezuelas, paredes gruesas los cuales producen conidióforos (García y Verastegui, 2001).

***Penicillium* sp:** es un hongo de crecimiento rápido con colonias blancas aterciopeladas las cuales se cubren de esporas de diferentes colores según la especie. La colonia está compuesta por hifas delgadas septadas (Guzmán, 1977).

***Fusarium* sp:** crece como colonias de color blanco, el micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macroconidias, también se pueden observar clamidosporas. Algunas especies son patógenas de plantas (Choudhari, 2012).

En la tabla 11 se encuentran las características macroscópicas de los organismos encontrados los cuales no coinciden con los que están afectando el tallo del cultivo.

Tabla 13. Descripción macroscópica de microorganismos encontrados en suelos de los lotes 2, 5, 13 y 18.

Aislamientos						
	A1 <i>Aspergillus</i>	A2 <i>Aspergillus</i>	A3 <i>Aspergillus</i>	A4 <i>Penicillium</i>	A5 <i>Fusarium</i>	A6 <i>Fusarium</i>
Forma	Circular	Circular	Ovalado circular	Circular	Circular	Circular
Color	Gris ceniza	Blanco	Inicialmente blanco- gris	Blanco- gris	Blanco	Blanco
Textura	Aterciopelada	Aterciopelada - granulosa	Aterciopelada – granulosa	Aterciopelada	Aterciopelada	Granulada
Anillos	Bien marcados	No marcados	No marcados	No marcados	No marcados	No marcados

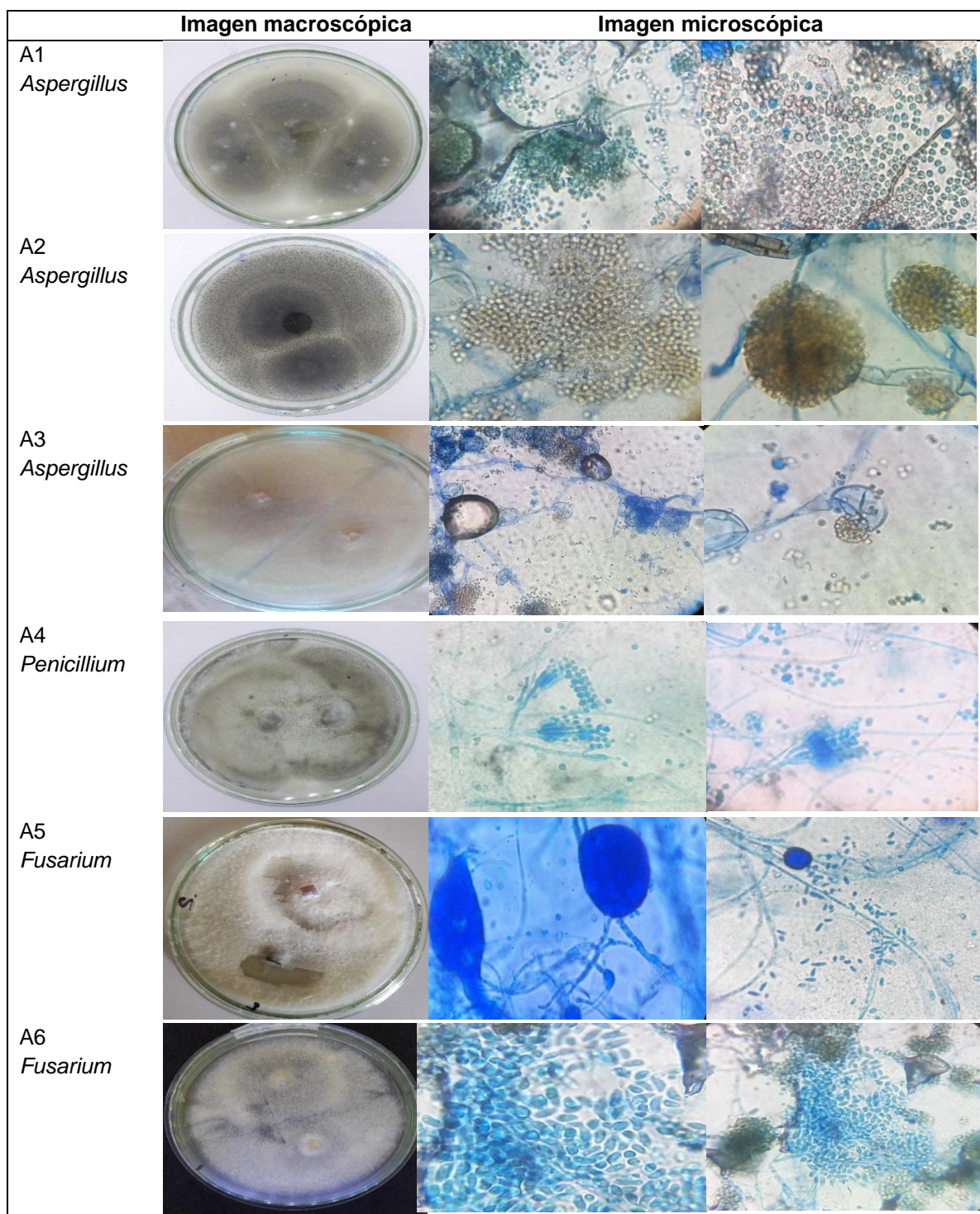


Figura 3.32. Características morfológicas y microscópicas de microorganismos encontrados en suelos de los lotes 2, 5, 13 y 18 a 40x y 100x.

4 Conclusiones

- La sintomatología desarrollada por los hongos (*Phoma* y *Myrothecium*) en inoculaciones dirigidas bajo condiciones controladas, permite asumir que son los causantes de los diferentes síntomas de la enfermedad presente en el cultivo de morera del CEV La Rejoja.
- Mediante pruebas moleculares con cebadores específicos ITS se logró establecer con certeza, que los hongos con códigos de manejo 38B, 38M, y PA1 corresponden a los géneros *Phoma* para los dos primeros, y *Myrothecium* para el tercero, sin embargo estos cebadores no permitieron la identificación de las sub especies de los microorganismos patogénicos.
- Las condiciones ambientales como lluvias prolongadas y alta humedad relativa favorecen el desarrollo de la enfermedad ocasionada por los géneros *Phoma* y *Myrothecium* en el cultivo de morera.
- Se encontraron diferencias en el crecimiento y sintomatología de los hongos del género *Phoma* aislados de la parte media y base de la rama tanto en laboratorio como en campo, por lo tanto es posible que los microorganismos pertenezcan a sub especies diferentes.
- En la caracterización morfológica de los aislamientos, se encontró variabilidad en la tasa de crecimiento y características de las colonias en los diferentes medios de cultivo y temperaturas evaluadas, siendo el medio V8A donde se logró rápida esporulación, pero menor crecimiento de las colonias.
- La severidad de la infección está determinada parcialmente por la longitud de las ramas, los patógenos inoculados causaron mayor área de infección en las ramas mayores de 30 cm de largo pero la muerte de las ramas está influenciada por el tamaño de la lesión, siendo las ramas menores de 30 cm más afectadas debido a la capacidad que tiene el patógeno de dañar los tejidos internos.

5 Recomendaciones

- Es necesario realizar estudios adicionales que confirmen la especie de los organismos causantes de la sintomatología de la parte media y de la base de la rama, debido a que la secuencia de ITS no puede dar información definitiva sobre la especie a la cual pertenecen los aislamientos fúngicos.
- Se deben realizar estudios que identifiquen la relación que existe entre los hongos *Phoma* y *Myrothecium*, debido que al encontrarlos en la parte interna de las plantas de 16 a 18 meses de edad y ser patogénicos, no se pudo determinar la interacción entre ellos para causar la sintomatología de la enfermedad.
- Se hace necesario realizar ensayos de incubación de hongos a temperaturas inferiores a 22 °C para determinar el rango óptimo de esporulación.
- Se deben probar diferentes concentraciones en la suspensión de esporas para la inoculación de hongos del género *Phoma* para determinar la concentración adecuada para la infección.
- Se debe estudiar la epidemiología de la enfermedad, y entender más profundamente el proceso de la infección natural.
- Puesto que el medio V8A mostró buena esporulación con los hongos, pero limitado crecimiento, se deben probar otros métodos de siembra en las cajas Petri para lograr una alta producción de esporas.
- Se recomienda evaluar planes de fertilización donde incluyan sulfitos de cobre y potasio como promotores de fitoalexinas y así fortalecer el sistema de defensa de las plantas.
- Identificar especies controladora de los hongos patógenos como *Trichoderma sp* para establecer un plan de manejo biológico.

6 Bibliografía citada

- Abbas HK, Johnson BB, Shier WT, Tak H, Jarvis BB, Boyette CD (2002) Phytotoxicity and mammalian cytotoxicity of macrocyclic trichothecene mycotoxins from *Myrothecium verrucaria*. *Phytochemistry* (59):309-313.
- Agrios, G. (2006). *Fitopatología*. México. Editorial Limusa. 2da edición. 819p
- Alarcón, I. (2006). Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.
- Andrews, J. H. (1984). "Relevance of r-and K-theory to the ecology of plants pathogens", In: Klug Reddy, C. A. (eds.), *Current perspectives in microbial ecology*. American society of Microbiology, Washington, DC. p. 1-7.
- Aveskamp, M., Gruyter, J. and Crous, P. (2008). Biology and recent developments in the systematics of *Phoma*, a complex genus of major quarantine significance. *Fungal Diversity* (31): 1-18.
- Aveskamp M, Gruyter J, Woudenberg J. (2010). Highlights of the Didymellaceae: a polyphasic approach to characterise *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in Mycology* (65): 1–60.
- Ávila, C. (2004). *Manual de laboratorio de Fitopatología*. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 135p
- Barea, I. (2006). Patometría, incidencia y severidad. Recuperado de <https://es.slideshare.net/jesumamani961/patometria-incidencia-y-severidad>. 30p.
- Babu, A. M., Chowdary , N.B., Kumar ,V., Rajan M.V. Dandin,S. (2008). Infection process of *Colletotrichum dematium* on mulberry leaves: An unusual method of sporulation. Page 290-295. Archives of Phytopathology and Plant Protection.
- Blanch, M.; Legaz, M.E. y Vicente, C. 2008. Xanthan production by *Xanthomonas albilineans* infecting sugarcane stalks. *Journal of Plant Physiology*, (165): 366-374.
- Boerema G. H., Höweler L. H., (1967). *Phoma* sp Desm. and its varieties. *Persoonia*, 5: 15-28.

- Boerema G. H., (1976). The Phoma species studied in culture by Dr R. W. G. Dennis, Trans. Br. Mycol. Soc. (67): 28.
- Boerema G. H., Gruyter J.de, Noordeloos M.E., Hamers M.E.C., (2004). Phoma identification manual. Differentiation of specific and infra-specific taxa in culture. CABI Publishing: 470.
- Buker M., Cintra, W., Azevedo P., Morra C., Avelino C. (2012). Impact of climate change on the Phoma leaf spot of coffee in Brazil. *Interciencia* 37 (4) 272- 278.
- Campos, O. (2017). Epidemiología del derrite, *Phoma costarricensis* Ech. XXIII Simposio Latinoamericano de Caficultura San Pedro Sula, Honduras, agosto de 2017.
- Cano, J., Guarro, J., and Gené, J. (2004). Molecular and morphological identification of *Colletotrichum* species of clinical interest. *Journal of Clinical Microbiology* (42):2450–2454.
- Castellanos, G., Jara, C., Mosquera G. (2012). Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. CIAT. p 4-10
- Castro, M.S. y Fontes, W. (2005). Plant defense and antimicrobial peptides. *Protein Peptide Letters*, (12): 13–18.
- Chande, A., Kövics, G., Sandhu, S., Rai, M. (2010). Morphological and genetic differentiation among four pigment producing Indian species of *Phoma* (Saccardo, 1899). *Indian J Microbiol.* Disponible en: <http://www.catalogueoflife.org>.
- Chattopadhyay S, Maji MD, and Pratheesh Kumar PM, (2003). Sensitivity of mulberry brown leaf spot pathogen *Myrothecium roridum* to different plant extracts. National Conference on Tropical Sericulture for global competitiveness. p5-7.
- Chowdary, N. ; Govindaiah, B. (2008).Influence of Various Inoculum Levels of *Macrophomina Phaseolina* on Sprouting and Root Rot Disease Incidence in Mulberry (*Morus Spp.*). *ICFAI Journal of Life Sciences*;2008, Vol. 2 Issue 2, p15.
- Cifuentes, C. A. y Sohn, W. K. (1998). Manual de Sericultura. Cultivo de la morera y cultivo de gusano en el trópico. Pereira: Fondo Editorial de Risaralda. p 39-108
- Cifuentes, C. (2004). Pablo y el gusano de seda: La morera. Colombia: Red andina de la seda.

- Choudhari, S., Solanke, N., Kareppa, B. (2012). Integrated Management Of Root Rot Disease Of Mulberry Caused By Fusarium Solani . Multilogic in Science. An International Refreed & Indexed Quarterly Journal. Vol II, Issue II.
- Contreras, C. A. (2006). Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de Colletotrichum spp., obtenidos de frutos de lulo (Solanum quitoense Lam), tomate de árbol (Solanum betacea Sendt), granadilla (Passiflora ligularis Juss), mango (Mangifera indica L) y tallos de mora (Rubus glaucus Benth) con síntomas de antracnosis. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias básicas, Bogotá.
- Correa, L., Lavalett, L., Galindo, P., Afanador, L. (2007). Uso de métodos Multivariantes para da agrupación de aislamientos de Colletotrichum spp. con base en características morfológicas y culturales. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. Vol. 60, No.1, P. 3671-3690.
- Cruz M, Hoyos L, Melgarejo LM (2012). Ecofisiología del cultivo de la gulupa-(Passiflora edulis Sims) Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. 123p
- Dag, O., Dolgun, A., Konar, N.M. (2018). onewaytests: An R Package for One-Way Tests in Independent Groups Designs. The R Journal, (10):1, 175-199.
- Dayakar Yadav BR, Sukumar J, (1987). Occurrence of a new stem- blight and collar- rot disease of mulberry from India. Sericologia, 27(2): 205-206.
- Del Rio, J., González, M., Fuster, M., Botia, J., Gómez, P., Frias, V. (2002). Formación de tilosas y cambios en los compuestos fenólicos de raíces de viña infectadas con Phaeomoniella Chlamydospora y Phaeoacremonium sp. Universidad de Murcia. España. Phytopatologia mediterránea.
- Deshmukh, S., Rai, M. (2005). Biodiversity of fungi, Their Role in human life. Phoma saccardo and related genera: some new perspectives in taxonomy and biotechnology. Cap 6. Oxford . new delhi.
- Dickinson, C.H. (1987). Patología vegetal y patógena de plantas. Noriega Editores. Editorial Limusa S.A. México. p.11-179.
- Dudek, T, (2014). Myrothecium: A stem, crown and leaf spot disease of floriculture crops. Extensión de la Universidad Estatal de Michigan, y Jan Byrne, Servicios de Diagnóstico de MSU, Departamento de Ciencias de Plantas, Suelos y Microbianos. Universidad de Michigan. 2p

- Fox, J., Weisberg, S. (2011). En Companion to Applied Regression, Second Edition. Thousand Oaks CA: Sage. URL: <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>.
- Gaetan, S.; Madia, M. y Rodríguez, A. (2001). Pie Negro o Necrosis del Cuello [Phomalingam (Tode: Fr.) Desmaz.] en cultivos de colza canola en la Argentina. Boletín Sanidad Vegetal. Plagas. Madrid, España. Vol 27, 159-168.
- García, C., Krause, H. (2000). Estudio de adaptación de materiales promisorios de morera en la zona central colombiana. Cenicafe, 51(1), 54-65.
- García, M.C. (2008). Análisis de Ideomorfos MAT en Colletotrichum Lindemuthianum . : 22–50.
- García, L., Verastegui, L. (2001). Determinación de metabolitos secundarios a partir de una cepa nativa de Aspergillus sp aislada del paramo de Tablazo, Departamento de Cundinamarca. Tesis de pregrado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogota. 72 pg.
- Gil, V., Legizamon, (2003). La muerte descendente del cafeto (Phoma sp), Avances técnicos Cenicafe. 278: 1-4.
- Gilchrist, S, L., G; Fuentes, D, C; Martínez, C, R. M; López, A, E; Duveiller, R. P; Singh, M. Henry e I. García A. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. Segunda edición. México, D.F.: CIMMYT. 68p.
- González, D., Peña F., Costales, D., Falcón, A. (2014). Efecto de diferentes medios de cultivo sobre el desarrollo de Phytophthora nicotianae Breda de Haan. Rev. Protección Veg. vol.29 no.1. p 33-41. La Habana.
- Gupta, V.P., Govindaiah, S., Raju, H.V. (1997). Diseases and associated fungal pathogens of mulberry nurseries. Indian Phytopathology. 50 (3): 402-407.
- Guzmán, M. (1977). Micología médica. Instituto Nacional de Salud. Bogota. Colombia. 386 pg.
- Gross, J., Ligges, U. (2015). Tests for Normality. R package version 1.0-4. <https://CRAN.R-project.org/package=nortest>

- Jian Y, Zhen B, Xiu W, Guo X. (2009). Polygalacturonase, pectate lyase and pectin methylesterase activity in pathogenic strains of *Phytophthora capsici* incubated under different conditions. *Journal of Phytopathology*;157:585-591.
- Kim, K. H., Jeong, L. y Park, H. N. (2005). Biological Efficacy of Silk Fibroin Nanofiber Membranes for Guided Bone Regeneration. *Journal Biotechnology* (120), 327-339.
- Hara, K. (1925). *Pathology of Practical Crops*. Youkendo, Tokyo. 36 (2): p 89-95
- Koike, S., Subbarao, K., Verkley, G., Fogle, D., O'Neill, T. (2006). Phoma Basal Rot of Romaine Lettuce in California Caused by *Phoma exigua*: Occurrence, Characterization, and Control. *Plant Dis.* ;90(10):1268-1275.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kuti JO, Ng TJ, Bean GA (1989) Possible involvement of a pathogen-produced trichothecene metabolite in *Myrothecium* leaf spot of muskmelon. *Physiol Mol Plant Pathol* (34):41-54.
- Hernández, E., Villanueva, J., Mosquera, R, Mora, J. (2004). Efecto de la Erradicación de Plantas Enfermas por el PRSV-P en un Sistema de Manejo Integrado del Papayo (*Carica papaya* L.) en Veracruz, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 22, núm. 3. p. 382-388, México
- Hyde, K.D., Cai, L., Cannon, P.F., Crouch, J.A., Crous, P.W., Damm, U., Goodwin, P.H., Chen, H., Johnston, P.R., Jones, E.B.G., Liu, Z.Y., McKenzie, E.H.C., Moriwaki, J., Noireung, P., Pennycook, S.R., Pfenning, L.H., Prihastuti, H., Sato, T., Shivas, R.G., Tan, Y.P., Taylor, P.W.J., Weir, B.S., Yang, Y.L. and Zhang, J.Z. (2009). *Colletotrichum* – names in current use. *Fungal Diversity* 39: 147-183.
- Janardhan J.L., Philip T., Govindaiah, Sharma D.D., Bajpai A.K. y Datta R.K. (1996). Anthracnose of mulberry - First report from India. *Sericologia*, (36): 567-571.
- Lalaoui F, Halama P, Dumortier V, Paul B. (2000). Cell wall-degrading enzymes produced in vitro by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness. *Plant Pathology*.(49):727-733.
- Lombard, L., Crous, (2016). *Albifimbria verrucaria*. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF. p6-11.
- López, G. (2019). Enraizamiento de estacas de morera, (*Morus* sp) empleando auxinas y un sistema de inmersión en agua, en la meseta de Popayán. Tesis de maestría sin publicar. Universidad del Cauca. Colombia.

- Lozovaya, A., Zemora, O., Widhim, J., Hartman, G. (2006). Lignin degradation by *Fusarium solani*. *Plant dis* (90): 77-82.
- Liu, X.Y., Duan, J.X. and Xie, X.M. (2007). *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. *Mycotaxon* (100): 137-144.
- Machowicz, z., Zimowska, B., Zalewska, E. (2008). The occurrence and pathogenicity of *Phoma* sp. var. sp for selected species of herbs. *Acta Agrobotanica* Vol. 61 (2): 157–166.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. (2003). *Biología de los microorganismos*. 10 ed. Madrid: Prentice-Hall. 1080p.
- Maikel, M., Aveskam, J., Woudenberg, H., Gruter, J., Crous, P. (2009). Development of taxon specific sequence characterized amplified region (SCAR) markers based on actin sequences and DNA amplification fingerprinting (DAF): a case study in the *Phoma exigua* species complex. *Molecular plant pathology*, 10 (3), 403 – 414.
- Marcinkowska, I. Roze-Kaluźny and W. Kaluźny. (2005). Pathogenicity of Some *Phoma* Sp isolates. Warsaw Agricultural University, Warsaw, Poland. *J. Phytopathol. Pol.* (38): 35–44 © The Polish Phytopathological Society, Poznań
- Medina, M., García, D. y Moratinos, L. (2009). La morera, *Morus* sp, como recurso forrajero: Avances y consideraciones de investigación. *Zootecnia Tropical*, 27(4). Recuperado de http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_ci/ZootecniaTropical/zt2704/pdf/medina_m
- Menza, H (2013). Epidemiología de la muerte descendente del cafeto (*Phoma* sp) en cuatro sistemas de producción en la Estación Experimental El Tambo del departamento del Cauca. Tesis de maestría. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira Facultad de ciencias agropecuarias, Palmira, Colombia.
- Merino, L.A., y G. Giusiano. (2011). Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos. Asociación Argentina de Microbiología, Buenos Aires, ARG.p 124-126.
- Murakami, R. Shirata, A. and Inoue, H. (2005). A selective medium containing the toxins of *Myrothecium roridum* for isolation from soil. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 67(5):381-387.
- Pademer. (2003). Sistematización de experiencias locales proyecto de apoyo al desarrollo de la microempresa rural. Popayán. 22p

- Pawłowski, M., Hartman, G. (2016). Infection Mechanisms and Colonization Patterns of Fungi Associated with Soybean. p 25.
- Pescio, F., Zunini, H., Basso, C. Divo, S. M. (2008). Sericultura. Manual para la producción. Buenos Aires: Editorial INTI. 182p
- Prihastuti, H., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E.H.C. and Hyde, K.D. (2009). Characterization of Colletotrichum species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. Fungal Diversity (39): 89-109.
- Rajendran, C., Ahmed, A., And Rao, K. (1983). Coffee blight – a new disease of coffee in India. Journal of Coffee Research 13 (2): 35 – 39.
- Ramirez, M., Marulanda, M., Isaza, L. (2007). Antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera Identification of Colletotrichum specie Responsable for Anthracnose of Andean Blackberry in Crops Grown in Colombia. Systematics (37): 585–90.
- Ranvindrán, S. (1997). Distribution and Variation in Mulberry Germplasm. Indian Journal Plant Genetic Resources, 10(2), 233-242.
- Ritsuko M., Takao K., Kokichi T. (2005). Myrothecium leaf spot of mulberry caused by Myrothecium verrucaria. J Gen Plant Pathol (2005). (71):153–155.
- Rios, O. (2011). Diagnóstico fitosanitario de las especies forrajeras cultivadas en el Centro De Investigación Santa Lucía, Barrancabermeja, Santander. Revista Citecsa. Volumen 2, numero 2. Barrancabermeja. Colombia.
- Roca, M.M.G., Ongarelli, M.G., Davide, L.C., and Mendes, C.M.C. (2000). Ultrastructural aspects in perithecial hyphae septal pores of Glomerella cingulata f. sp. phaseoli. Brazilian Journal of Microbiology. (31):223–225
- Rodríguez, J. y González, F. (2000). Cultivos arbóreos tradicionales y biodiversidad. Contribución a su conocimiento y conservación en la Región de Murcia. Murcia: Universidad de Murcia. 17 p.
- Rodríguez, A., Vargas, J., Ventura, A., Martínez, A., Rodríguez., Ehsan, M., Lara, F. (2012). Manual De Sericultura En Hidalgo. 103 p
- Roncero, M.; Di Pietro, A. (2005). Papel de enzimas líticas de la pared celular en la patogenicidad de Fusarium oxysporum. Rev. Iberoam. Micología (Venezuela). (17): S47-S53.

- Roussel, S.; Nicole, M.; López, F.; Renard, M.; Chevre, A.M., Brun, H. (1999). Cytological Investigation of resistance to *Leptosphaeria maculans* conferred to *Brassica napus* by introgressions originating from *B. Juncea* or *B. Nigra* genome. *Phytopathology*, Vol 89, 12: 1200-1213.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RStudio Team (2017). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, Inc., Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Salas, J. E., Agramonte, D., Barbón, R. y Jiménez, F. (2006). Caracteres morfológicos de plantas de *Morus alba* derivadas de cultivo in vitro en condiciones de campo. *Revista Ra Ximhai*, 2(2), 469-479.
- Salgado, M., Pfenning, L. (2000). Identificao e caracterizacao morfológica de especies de *Phoma* do cafeeiro no Brasil. In simposion de pesquisa dos Cafes do Brasil. Setembro 26-29, Resumos expandidos. Ministerio de agricultura e do Abastecimiento. 4p.
- Samarakoon, M., Persoh, D., Hyde, K., Bulgakov, T., Manawasinghe, I., Jayawardena R., Promputtha, I. (2018). *Colletotrichum acidiae* sp. nov. from northern Thailand and a new record of *C. dematium* on *Iris* sp. *Mycosphere* 9(3): 583–597
- Sánchez, M. D. (2000). Mulberry, an Exceptional Forage Available Almost Worldwide. Recuperado de <http://www.fao.org/ag/AGA/AGAP/FRG/Mulberry/Papers/HTML/Mulbwar2.htm>
- Santacruz, C. (2013). Caracterización morfológica, patogénica y molecular de especies de *Colletotrichum* spp., causantes de la antracnosis del fruto de ají y pimentón *Capsicum* spp en el Valle del Cauca. Universidad Nacional de Colombia. Tesis de maestría. Palmira.
- Soria, S.; Salice, G.; Avendaño, F. (2001). Guía práctica de sericultura. Roma. IILA., p 79-84; 109-112.
- Sengupta, K., Govindaiah., Kumar, P. (1991). Diseases and pest of Mulberry and their control. Central sericultural research. India. 63p.
- Sharma, A., Sharma, R. y Machii, H. (2000). Assessment of Genetic Diversity in a *Morus* Germplasm Collection Using Fluorescence-Based AFLP Markers. *Theoretical and Applied Genetics*, (101), 1049-1055.

- Shenoy, B.D., Jeewon, R. and Hyde, K.D. (2007). Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity*. (26): 1-54
- Sutton, B.C. (1980). *The coleomycetes: the fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and estromata*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Surrey, England. 661 p.
- Takahashi, R., Kronka, S. N., y Hirose, T. (2000). Desenvolvimento da glândula sericígena do bichoda-seda, *Bombyx mori* L., sob a influencia de diferentes tipos de adubajao na amoreira. *Boletim da Indústria Animal, Nova Odessa*, 47(2), 121-125.
- Tang, Kashem, K.A Samad, and N. Absar. (2005). "Cercospora Moricola." *Biological Bulletin* 1(8): 127–31.
- Téliz, D.; Mora, A. (2007). *El Aguacate y su Manejo Integrado*. Segunda Edición. Grupo Mundi–Prensa. México, D.F. 321 p.
- Torres, F. (1997). Factores que influyen en la producción de hoja de morera. *Avances técnicos del CDTs*, (18), 12-14.
- Torres, C. (2016). *Guia para tomar, consevar y enviar muestras vegetales para diagnostico fitosanitario*. 10 p.
- Trejo,E. (2011). *Obtencion y evaluacion biológica de polisacaridos aparteir de cultivo liquido de micelio de Pleurotus spp*. Instituto politécnico nacional, unidad profesional de biotecnología. Tesis de maestria. México.
- Troches, J., Viquez, A. (2016). *Desarrollo de un protocolo para la propagación in vitro de dos variedades de morera (Morus alba L): Taig song y Kamva 2*. Tesis de pregrado.Universidad del Cauca. Colombia.
- Vijayan, K., Saratchandra, B. y Teixeira da Silva, J. A. (2011). *Germplasm Conservation in Mulberry, Morus sp*. *Scientia Horticulturae*, (128), 371-379
- Vivas, N., y Morales, S. (2005). *Evaluación agronómica y producción de grano de diez accesiones de Guandul cajanus cajans en la meseta de Popayán*, *Biotecología en el sector agropecuario*, vol 3 No 1, p 31 – 36.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. And LANE, DJ. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*. (173) p. 697 – 703plificación (Tab

Wickham, H. (2009). *Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York.

Yoshida, Shigenobu, Akira Shirata, and Syuntaro Hiradate. (2002). *Ecological Characteristics and Biological Control of Mulberry Anthracnose*. 89–95. Japan.

Zuur, A. F., Ieno, E. N., Elphick, C. S. (2010). A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. *Methods in Ecology and Evolution*, 1(1), 3–14.

Anexos

Anexo A. Medios de cultivo

Anexo A1. Protocolo de preparación de medio, Papa- Dextrosa - Agar (PDA)

Se utilizó la metodología de Ávila (2004) con modificaciones

Para un litro de medio se utilizan:

23 gramos de agar

30 gramos de dextrosa

300 gramos de papa

1000 ml de agua destilada

Procedimiento:

1. Se pelan las papas y se parten en una porciones pequeños
2. En un beaker se cocina las papas en 500 cm de agua destilada durante 30 minutos.
3. Se filtra el líquido resultante a través de una gasa.
4. El filtrado se coloca en un Erlenmeyer y se completa hasta 1000 ml con agua destilada
5. Se agregan la dextrosa y el agar en el Erlenmeyer y se disuelven los ingredientes por agitación
6. Se tapa el Erlenmeyer con un tapón de algodón y se cubre con papel aluminio
7. Se esteriliza en la autoclave a 121 °C por 15 minutos
8. Después de esterilizar, se agrega 10 cm de cloranfenicol al medio y se agita.
9. El medio se vierte en cajas Petri esterilizadas dentro de una cámara de flujo laminar.

Anexo. A2. Medio morera dextrosa agar MDA (F)

Para un litro de medio se utilizan:

23 gramos de agar

30 gramos de dextrosa

300 gramos de tallos tiernos de morera

1000 ml de agua destilada

Procedimiento:

1. Los tallos de morera se parten en trozos de 2 a 3 cm de largo
2. Se maceran en un mortero con agua destilada
3. En un beaker se lleva a ebullición el macerado en 500 cm de agua destilada durante 30 minutos.
4. Se filtra el líquido resultante a través de una gasa.
5. El filtrado se coloca en un Erlenmeyer y se completa hasta 1000 ml con agua destilada
6. El filtrado se mezcla con la dextrosa y el agar en el Erlenmeyer, se disuelven los ingredientes por agitación.
7. Se tapa el Erlenmeyer con un tapón de algodón y se cubre con papel aluminio
8. Se esteriliza en la autoclave a 121 °C por 15 minutos
9. Después de esterilizar, se agrega 10 cm de cloranfenicol (para evitar contaminación por bacterias) al medio y se agita. El medio se vierte en cajas petri esterilizadas dentro de una cámara de flujo laminar.

Anexo A.3. Medio morera dextrosa agar MA (SF)

Para un litro de medio se utilizan:

23 gramos de agar

300 gramos de tallos tiernos de morera

1000 ml de agua destilada

Procedimiento:

1. Los tallos de morera se parten en trozos de 2 a 3 cm de largo
2. Se maceran en un mortero con agua destilada
3. En un beaker se lleva a ebullición el macerado en 500 cm de agua destilada durante 30 minutos.
4. El filtrado se coloca en un Erlenmeyer y se completa hasta 1000 ml con agua destilada
5. El filtrado se mezcla con el agar en el Erlenmeyer, se disuelven los ingredientes por agitación.
6. Se tapa el Erlenmeyer con un tapón de algodón y se cubre con papel aluminio
7. Se esteriliza en la autoclave a 121 °C por 15 minutos
8. Después de esterilizar, se agrega 10 cm de cloranfenicol (para evitar contaminación por bacterias) al medio y se agita. El medio se vierte en cajas petri esterilizadas dentro de una cámara de flujo laminar.

Anexo. A.4. Medio V8A

Para un litro de medio se utilizan:

23 gramos de agar

200 ml de jugo V8A

3 gramos de carbonato de calcio

1000 ml de agua destilada

Procedimiento:

1. Agregar al jugo V8A, el carbonato de Calcio, el agar y el agua destilada en un Beaker.
2. Calentar hasta disolver completamente
3. Se tapa el Erlenmeyer con un tapón de algodón y se cubre con papel aluminio
4. Se esteriliza en la autoclave a 121 °C, por 15 minutos
5. Después de esterilizar se agrega 10 cm de cloranfenicol (para evitar contaminación por bacterias) al medio y se agita. El medio se vierte en cajas petri esterilizadas dentro de una cámara de flujo laminar.

Anexo B. Protocolo de Inoculación

Inicialmente se inocularon hongos provenientes de la base y parte media del tallo, y la raíz de plantas afectadas; se siguió el siguiente protocolo:

1. Las plantas a inocular se mantuvieron con humedad relativa entre 90 y 100% bajo condiciones controladas para propiciar las condiciones adecuadas para el desarrollo del hongo.
2. Se lavó con agua destilada la zona del tallo a inocular y se realizaron punciones con alfileres entomológicos, o herida tipo bolsillo con bisturí No.11 en la base del tallo y en la parte media de este.
3. Se colocó un disco de agar de 0,5 cm de diámetro con micelio proveniente de una colonia y se recubrió con parafilm.
4. En el caso de inoculación con suspensión de esporas se realizó un raspado de las colonias en las cajas de petri y se mezcló con un volumen conocido de agua destilada estéril.
5. Una vez homogenizada la solución se filtra a través de una malla, luego se toma una gota de la suspensión con una pipeta Pasteur y se coloca en el centro de la cámara de Neubauer; para hacer el conteo y calibrar la solución
6. Una vez calibrada la solución se realiza la inoculación saturando un algodón estéril de la solución y colocándolo en el sitio a inocular, luego se cubre con parafilm.
7. En el caso de las plantas usadas como controles, se inocularon con un disco de agar estéril o con un algodón estéril saturado con agua destilada estéril y se cubrió con parafilm y se retiró a las 48 horas después de la inoculación.
8. La evaluación se realizó transcurridos 3 días después de la inoculación, procediéndose a registrar el tipo de reacción.

9. Los parámetros evaluados fueron: longitud de la lesión, signos y síntomas. Se realizó riego por micro-aspersión para mantener la humedad relativa entre 80 y 100%, bajo ambiente controlado y así propiciar las condiciones adecuadas para el desarrollo del hongo.

Anexo C. Protocolo de enraizamiento de estacas

Para el enraizamiento de las estacas se siguieron los protocolos utilizados por Troches y Viquez (2016) en el manejo de las estacas, y el de López, G (2018 sin publicar) en la utilización del fitorregulador AIB:

1. Se cortan estacas de 6 cm, las cuales deben de tener una yema en el extremo distal con relación a la rama de proveniencia.
2. Las estacas cortadas se desinfectan sumergiéndolas por 15 minutos en una suspensión de hipoclorito de sodio al 0,5%.
3. Las estacas se sujetan con una banda de caucho en grupos de 20 ubicando la yema en una misma dirección
4. Los grupos de estacas se sitúan de forma vertical con las yemas hacia arriba, y se sumergen hasta la mitad en una solución de AIB a 150 ppm por 24 horas (López, 2018 sp)
5. Las estacas se lavan con agua de grifo
6. Las estacas se colocaron en bandejas con agua de grifo que se cambia cada 4 días para evitar presencia de algas y bacterias.

Anexo D. Incidencia de la enfermedad y precipitación en el año 2017

Meses	Precipitación (mm)	% incidencia Lote 2	% incidencia Lote 5	% incidencia Lote 13	% incidencia Lote 18
Enero	288	0	91,7	78,3	86,6
Febrero	84	5	0	98,3	100
Marzo	382	40	31,6	0	0
Abril	306	41,6	71,6	0	63,3
Mayo	368	51,6	83,3	40	90
Junio	24	98,3	0	68,3	91,6
Julio	0	0	78,3	0	0
Agosto	0	0	91,7	8,3	15
Septiembre	12	11	0	31,6	36,2
Octubre	78	28,6	5	58,3	65,2
Noviembre	124	36,3	29	95,2	82,9
Diciembre	205	100	52,3	100	100

Anexo E. Análisis de varianza de pruebas de patogenicidad

Anexo E.1. PA1 (*Myrothecium verrucaria*) Análisis general

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Rama	1	1.47350	1.47350	32.5786	2.534e-0
6*					
Zona	1	0.03467	0.03467	0.7665	0.3878
Inóculo	1	0.00047	0.00047	0.0104	0.9195
Método	1	0.00017	0.00017	0.0037	0.9517
Rama:Zona	1	0.12100	0.12100	2.6753	0.1117
Rama: Inóculo	1	0.01960	0.01960	0.4334	0.5150
Zona: Inóculo	1	0.05810	0.05810	1.2846	0.2655
Rama:Método	1	0.01577	0.01577	0.3486	0.5590
Zona:Método	1	0.00285	0.00285	0.0631	0.8033
Inóculo:Método	1	0.00047	0.00047	0.0104	0.9195
Rama:Zona: Inóculo	1	0.11702	0.11702	2.5872	0.1176
Rama:Zona:Método	1	0.02660	0.02660	0.5882	0.4488
Rama: Inóculo:Método	1	0.00092	0.00092	0.0203	0.8876
Zona: Inóculo:Método	1	0.00010	0.00010	0.0023	0.9624
rama:zona: Inóculo:método	1	0.05950	0.05950	1.3156	0.2599

Residuals	32	1.44733	0.04523
-----------	----	---------	---------

Anexo. E.2. PA1 (*Myrothecium verrucaria*) ramas <30

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Zona	1	0.142604	0.142604	1.8878	0.003308
*					
Inóculo	1	0.007004	0.007004	0.5839	0.45591
6					
Método	1	0.006338	0.006338	0.5283	0.47781
9					
Zona:Inóculo	1	0.005104	0.005104	0.4255	0.52346
9					
Zona:Método	1	0.023438	0.023438	1.9538	0.18125
7					
Inóculo:Método	1	0.000038	0.000038	0.0031	0.95610
5					
Zona:Inóculo:Método	1	0.027337	0.027337	2.2789	0.15063
8					
Residuals	16	0.191933	0.011996		

Anexo. E.3. PA1 (*Myrothecium verrucaria*) , rama >30

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F Value	Pr(>F)
Zona	1	0.01307	0.013067	0.1665	0.6886
Inóculo	1	0.01307	0.013067	0.1665	0.6886
Método	1	0.00960	0.009600	0.1224	0.7311
Zona: Inóculo	1	0.17002	0.170017	2.1669	0.1604
Zona:Método	1	0.00602	0.006017	0.0767	0.7854
Inóculo: Método	1	0.00135	0.001350	0.0172	0.8973
Zona: Inóculo:Método	1	0.03227	0.032267	0.4112	0.5304
Residuals	16	1.25540	0.078463		

Anexo. E.4. M38 (Género *Phoma* sp, aislado de la parte media de la rama), análisis general

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Rama	1	4.844	4.8442	4.4300	0.04326 *
Zona	1	3.156	3.1563	2.8864	0.09903 .
Inóculo	1	0.971	0.9707	0.8877	0.35317
Método	1	0.135	0.1353	0.1238	0.72731
Rama:Zona	1	3.208	3.2078	2.9335	0.09643 .
Rama: Inóculo	1	0.763	0.7629	0.6977	0.40976

Zona: Inóculo	1	0.862	0.8617	0.7881	0.38131
Rama:Método	1	0.037	0.0371	0.0339	0.85505
Zona:Método	1	0.578	0.5783	0.5289	0.47238
Inóculo:Método	1	0.916	0.9162	0.8378	0.36687
Rama:Zona: Inóculo	1	0.773	0.7730	0.7069	0.40670
Rama:Zona:Método	1	0.583	0.5827	0.5329	0.47071
Rama: Inóculo:Método	1	0.813	0.8127	0.7432	0.39504
Zona: Inóculo:Método	1	0.872	0.8725	0.7979	0.37840
Rama:Zona: Inóculo:Método	1	0.763	0.7629	0.6977	0.40976
Residuals	32	34.992	1.0935		

Anexo E5. M38 (Género *Phoma* sp, aislado de la parte media de la rama), rama >30

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Zona	1	6.364	6.3640	2.9129	0.1072
Inóculo	1	1.727	1.7273	0.7906	0.3871
Método	1	0.157	0.1570	0.0719	0.7920
Zona: Inóculo	1	1.634	1.6335	0.7477	0.4000
Zona:Método	1	1.161	1.1610	0.5314	0.4766
Inóculo:Método	1	1.727	1.7273	0.7906	0.3871
Zona: Inóculo:Método	1	1.634	1.6335	0.7477	0.4000
Residuals	16	34.956	2.1847		

Anexo E6. M38 (Género *Phoma* sp, aislado de la parte media de la rama), rama <30

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Zona	1	0.000104	0.0001042	0.0465	0.83205
Inóculo	1	0.006247	0.0062468	2.7866	0.11450
Método	1	0.015362	0.0153622	6.8529	0.01865 *
Zona: Inóculo	1	0.001204	0.0012042	0.5372	0.47421
Zona:Método	1	0.000004	0.0000042	0.0019	0.96615
Inóculo:Método	1	0.001549	0.0015488	0.6909	0.41809
Zona: Inóculo Método	1	0.001838	0.0018375	0.8197	0.37870
Residuals	16	0.035867	0.0022417		

Anexo E.7. B38 (Género *Phoma* sp, aislado de la base de la rama), análisis general

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Rama	1	0.00794	0.007936	0.7619	0.38925
Zona	1	0.00333	0.003333	0.3200	0.57555

Inóculo	1	0.04670	0.046700	4.4832	0.04209 *
Método	1	0.05702	0.057022	5.4741	0.02570 *
Rama:Zona	1	0.01753	0.017526	1.6825	0.20387
Rama: Inóculo	1	0.00008	0.000075	0.0072	0.93291
Zona: Inóculo	1	0.01194	0.011945	1.1467	0.29225
Rama:Método	1	0.00144	0.001439	0.1381	0.71260
Zona:Método	1	0.00000	0.000000	0.0000	1.00000
Inóculo:Método	1	0.01551	0.015509	1.4888	0.23131
Rama:Zona: Inóculo	1	0.00563	0.005633	0.5408	0.46746
Rama:Zona:Método	1	0.02265	0.022655	2.1749	0.15005
Rama: Inóculo:Método	1	0.00367	0.003675	0.3528	0.55671
Zona: Inóculo:Método	1	0.00274	0.002742	0.2632	0.61142
Rama:Zona: Inóculo:Método	1	0.00853	0.008533	0.8192	0.37218
Residuals	32	0.33333	0.010417		

Anexo E.8. B38 (Género *Phoma* sp, aislado de la base de la rama), rama >30

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Zona	1	0.002786	0.002786	0.4036	0.53423
Inóculo	1	0.021516	0.021516	3.1164	0.09658 .
Método	1	0.038288	0.038288	5.5456	0.03163 *
Zona: Inóculo	1	0.000586	0.000586	0.0849	0.77452
Zona:Método	1	0.011327	0.011327	1.6407	0.21849
Medio:Método	1	0.002042	0.002042	0.2958	0.59401
Zona: Inóculo: Método	1	0.000800	0.000800	0.1159	0.73792
Residuals	16	0.110467	0.006904		

Anexo E 9. B38 (Género *Phoma* sp, aislado de la base de la rama), Rama <30

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Zona	1	0.018073	0.018073	1.2975	0.2714
Inóculo	1	0.025259	0.025259	1.8134	0.1969
Método	1	0.020172	0.020172	1.4482	0.2463
Zona: Inóculo	1	0.016992	0.016992	1.2199	0.2857
Zona:Método	1	0.011327	0.011327	0.8132	0.3805
Inóculo:Método	1	0.017141	0.017141	1.2306	0.2837
Zona: Inóculo:Método	1	0.010475	0.010475	0.7520	0.3987
Residuals	16	0.222868	0.013929		

Anexo E.10. Análisis de varianza de crecimiento de hongos en medios de cultivo

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Hongo	2	11.7905	5.8953	248.5070	< 2.2e-16 ***
Medio	3	4.9931	1.6644	70.1591	< 2.2e-16 ***
Temp	1	1.0109	1.0109	42.6137	3.897e-08 ***
Hongo:Medio	6	7.6270	1.2712	53.5843	< 2.2e-16 ***
Hongo:Temp	2	0.3766	0.1883	7.9375	0.001052 **
Medio:Temp	3	3.2365	1.0788	45.4762	4.537e-14 ***
Hongo:Medio:Temp	6	0.2893	0.0482	2.0325	0.079393 .
Residuals	48	1.1387	0.0237		

Anexo F. Análisis molecular



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Sede Bogotá

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, A.A. 14490
Bogotá D.C.

LABORATORIO UNIDAD DE ANALISIS
Registro ICA 002816

Bogotá, D.C., Enero 22 de 2019

Señores
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
Atn.: Dra MARTHA ALMANZA
Popayan
malmanza@unicauca.edu.co

Ref.: Resultados análisis PARA IDENTIFICACION MOLECULAR muestra PARTE MEDIA

Con la presente reportamos los resultados de los análisis identificación molecular de microorganismos realizados a la muestra **Parte Media** recibido en septiembre de 2018

CÓDIGO INTERNO DE LA MUESTRA 2018SEP002 (Parte Media)	FECHA ENTRADA MUESTRA	Septiembre 11 de 2018
	FECHA INICIO ENSAYO	Septiembre 21 de 2018
	FECHA FINAL ENSAYO	Diciembre 11 de 2018
	FECHA EMISION RESULTADOS	Diciembre 11 de 2018

TIPO DE MUESTRA	Método de análisis
Se reciben 03 cajas en medio sólido (no especificado por el cliente) con el aislamiento a identificar. Las 03 cajas recibidas no presentaban microorganismos fungicos o bacterianos contaminantes por lo que se consideraron puras para s procesamiento	Identificación por análisis de Secuencia ITS
Características generales	
Morfología	Se observan colonias de crecimiento radial, con micelio algodonoso, compacto de pigmentacion grisacea. No se observó la producción de pigmentos en el reverso de las cajas de petri analizadas tras 15 dias de incubación (contados a partir del momento de recepción de la muestra)
Tinción con Azul de Lactofenol	Se observan colonias de crecimiento radial, con micelio algodonoso, compacto de pigmentacion grisacea. No se observó la producción de pigmentos en el reverso de las cajas de petri analizadas tras 15 dias de incubación (contados a partir del momento de recepción de la muestra)
RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN	
SECUENCIA ITS	gcggaaggatcattacccatgaggtgtagccttgcctaccaTCTCTACCCATGTCTTTGAG TACCTTCGTTTCCTCGGCGGGTCCGCCCGCCGATTGGACAACTTAAACCCTT TGTAATTGAAATCAGCGTCTGAAAAACATAATAGTTACAACCTTCAACAACG GATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAGT GTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCC TTGGTATCCATGGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCTTCAAGCTCT GCTTGGTGTGGGTGTTGTCTCGCCTTTGCGGTGAGACTCGCCTTAAAAACA TTGGCAGCCGGCGTATTGATTTCCGAGCGCAGTACATCTCGCGCTTTGCACTC ATAACGACGACGTCCAAAAAGTACTTTTAcactcttgacctcgat caggtaggataccgctgaacttaagca



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Sede Bogotá

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, A.A. 14490
Bogotá D.C.

LABORATORIO UNIDAD DE ANALISIS

Registro ICA 002816

	Microorganismo (Vecino cercano)	% similitud	Valor -e
ANÁLISIS DE TAXONOMIA	<i>Phoma exigua var exigua</i> 26its22	100	0,0
	<i>Boeremia exigua var. exigua</i> (Sin. <i>Phoma exigua var. exigua</i>) CBS285,70	100	0,0
	<i>Boeremia exigua var. heteromorpha</i> (Sin. <i>Phoma exigua var. heteromorpha</i>) CBS110,33	100	0,0
Análisis adicionales	Ninguno. Se anexan imágenes de las observaciones macroscópicas y microscópicas de la muestra analizada (2018-SEP-002-MICROSCOPIA.PDF).		
CONCLUSION	Identificación de <i>Phoma sp</i>		
OBSERVACIONES			
El análisis de la secuencia obtenida se realizó mediante la plataforma BLASTn. Se adjuntan al presente resultado las secuencias originales obtenidas, las secuencias curadas y la secuencia consenso usadas. Los vecinos cercanos reportados se seleccionaron con base en los resultados generados por el análisis en la plataforma BLASTn. Se recuerda que la secuencia de ITS no puede dar información definitiva sobre la variedad a la cual pertenece un aislamiento fúngico por lo que se recomiendan ensayos adicionales que permitan diferenciar entre las dos variedades a las que pertenecen los aislamientos cercanos a la muestra evaluada.			

Los resultados reportados corresponden únicamente a la muestra analizada

MAURICIO BERNAL MORALES
Director Técnico
UNIDAD DE ANALISIS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Sede Bogotá

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, A.A. 14490
Bogotá D.C.

LABORATORIO UNIDAD DE ANALISIS
Registro ICA 002816

Bogotá, D.C., Enero 22 de 2019

Señores
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
Atn.: Dra MARTHA ALMANZA
Popayan
malmanza@unicauca.edu.co

Ref.: Resultados análisis PARA IDENTIFICACION MOLECULAR muestra BASE RAMA

Con la presente reportamos los resultados de los análisis identificación molecular de microorganismos realizados a la muestra **Base Rama** recibido en septiembre de 2018

CÓDIGO INTERNO DE LA MUESTRA 2018 SEP003 (Base Rama)	FECHA ENTRADA MUESTRA	Agosto 30 de 2018
	FECHA INICIO ENSAYO	Septiembre 21 de 2018
	FECHA FINAL ENSAYO	Diciembre 11 de 2018
	FECHA EMISIÓN RESULTADOS	Diciembre 11 de 2018

TIPO DE MUESTRA	Método de análisis
Se recibieron 4 cajas en medio solido con el aislamiento a identificar sin identificación probable. Las 04 cajas recibidas no presentaban microorganismos fungicos o bacterianos contaminantes por lo que se consideraron puras para procesamiento	Identificación por análisis de Secuencia ITS
Características generales	
Morfología	Se observan colonias de crecimiento radial, con micelio algodonoso, compacto de pigmentacion grisacea. No se observó la producción de pigmentos en el reverso de las cajas de petri analizadas tras 15 días de incubación (contados a partir del momento de recepción de la muestra)
Tinción con Azul de Lactofenol	Se observan hifas septadas hialinas (micelio joven blanco aun sin pigmentación) o dematiaceas (micelio de pigmentación grisacea), clamidiosporas en cadena intercaladas y conidios hialinos con un único septo. No se observaron otras estructuras
RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN	
SECUENCIA ITS	tgcttaagttcagcgggtatccctacctgatccgaggtcaagagtgtAAAAAGTACTTTTTGGAC GTCGTCGTTATGAGTGCAAAGCGCGAGATGTAAGTCTGCGCTCCGAAATCAATAC GCCGGCTGCCAATTGTTTTAAGGCGAGTCTACACGCAAAGGCGAGACAAACA CCCAACCCAAGCAGAGCTTGAAGGTACAAATGACGCTCGAACAGGCATGCC CCATGGAATACCAAGGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTGATGATTCAGT AATTCTGCAATTCACACTACTTATCGCATTTCGCTGCGTTCATCGATGCC AGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTGTAAGTATTATGTTTTTTCAGACGC TGATTTCAATTACAAAGGTTTAAAGTTTGTCCAATCGGCGGGCGGACCCGCCG AGGAAACGAAGGTACTCAAAGACATGGGTAAGAGAtggtaggcaaacctacaact ctaggaatgatcctccgca
ANALISIS DE	Microorganismo (Vecino) % similitud Valor -e

Carrera 30 No. 45 - 03, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, IBUN, Edificio 224
Teléfono 216 5412 / Fax 2165413 Correo electrónico: (57-1) 316 5000 Ext. 16972 / 16951 / 16967 o Fax 16953
Correo electrónico: biotecnologia@unal.edu.co / www.ibun.unal.edu.co
Bogotá, D. C., Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Sede Bogotá

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, A.A. 14490
Bogotá D.C.

LABORATORIO UNIDAD DE ANALISIS
Registro ICA 002816

TAXONOMIA	cercano)		
	<i>Phoma exigua</i> var <i>exigua</i> 26its22	100	0,0
	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>exigua</i> (Sin. <i>Phoma exigua</i> var. <i>exigua</i>) CBS285,70	100	0,0
	<i>Boeremia exigua</i> var. <i>heteromorpha</i> (Sin. <i>Phoma</i> <i>exigua</i> var. <i>heteromorpha</i>) CBS110,33	100	0,0
Análisis adicionales	Ninguno. Se anexan imágenes de las observaciones macroscópicas y microscópicas de la muestra analizada (2018-SEP-003-MICROSCOPIA.PDF).		
CONCLUSION	Identificación de <i>Phoma sp</i>		
OBSERVACIONES			
El análisis de la secuencia obtenida se realizó mediante la plataforma BLASTn. Se adjuntan al presente resultado las secuencias originales obtenidas, las secuencias curadas y la secuencia consenso usada. Los vecinos cercanos reportados se seleccionaron con base en los resultados generados por el análisis en la plataforma BLASTn. Se recuerda que la secuencia de ITS no puede dar información definitiva sobre la variedad a la cual pertenece un aislamiento fúngico por lo que se recomiendan ensayos adicionales que permitan diferenciar entre las dos variedades a las que pertenecen los aislamientos cercanos a la muestra evaluada (<i>var. exigua</i> y <i>var. heteromorpha</i>).			

Los resultados reportados corresponden únicamente a la muestra analizada

MAURICIO BERNAL MORALES
Director Técnico
UNIDAD DE ANALISIS



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Sede Bogotá

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, A.A. 14490
Bogotá D.C.

LABORATORIO UNIDAD DE ANALISIS
Registro ICA 002816

Bogotá, D.C., Enero 22 de 2019

Señores
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
Atn.: Dra **MARTHA ALMANZA**
Popayan
malmanza@unicauca.edu.co

Ref.: Resultados análisis PARA IDENTIFICACION MOLECULAR muestra PLANTA ADULTA

Con la presente reportamos los resultados de los análisis identificación molecular de microorganismos realizados a la muestra **Planta Adulta** recibido en septiembre de 2018

CÓDIGO INTERNO DE LA MUESTRA 2018SEP004 (Planta Adulta)	FECHA ENTRADA MUESTRA	Septiembre 11 de 2018
	FECHA INICIO ENSAYO	Septiembre 21 de 2018
	FECHA FINAL ENSAYO	Diciembre 11 de 2018
	FECHA EMISIÓN RESULTADOS	Diciembre 11 de 2018

TIPO DE MUESTRA	Método de análisis
Se reciben 02 cajas en medio sólido (no especificado por el cliente) con el aislamiento a identificar. Las 02 cajas recibidas el 11/09/2018 presentaban crecimiento de dos colonias fúngicas con diferencias fenotípicas macro y microscópicas, por lo cual se solicitan nuevas muestras. Ante la solicitud se reciben 02 cajas nuevas que no presentaban contaminación macroscópica y fueron analizadas para su identificación	Identificación por análisis de Secuencia ITS
Características generales	
Morfología	Colonias de crecimiento radial que presentan generación de micelio blanco pulverulento (cremoso al rasparse con asa). Forma estructuras similares a estromas de color verde oscuro-negro tras 10 días de incubación (contados a partir de la recepción de las muestras). En medio PDA forma pigmento de color amarillo claro en el reverso de la caja
Tinción con Azul de Lactofenol	Hifas hialinas septadas delgadas. Conidioforos sinpodiales. Conidios ovoides hialinos y sin septos (abundantes).
RESULTADOS DE IDENTIFICACIÓN	
SECUENCIA ITS	gatatgcttaagttcagcgggtattcctacatccgaggtcaacttcagaagtggggtggttaacgg catggccaccgcccgttccaactgcgagGTTGTGCTACTACGCAGAGGAGGACTACAG CGAGACCGCCACTAGATTTTCGGGGCCGGCGGCCTTGCGAGAAGGCTGGGCCG ATCCCCAACACCAGGCACTGGGGCCGTGAGGGTTGAAATGACGCTCGAACAG GCATGCCCGCCAGAATACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTCAAAGATTCGATGA TTCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATC GATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTTATTTATTTGTTTATGT GTCACCTCAGAGGAGAAAACCACTAAAGACATAAGAGTTTGGGGCCTCCGGCG

Carrera 30 No. 45 - 03, INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, IBUN, Edificio 224
Teléfono 316 5412 / Fax 3165415 Comutador: (57-1) 316 5000 Ext. 16972 / 16951/ 16967 o Fax 16953
Correo electrónico: biotecnologia@unal.edu.co / www.ibun.unal.edu.co
Bogotá, D. C., Colombia, Sur América



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Sede Bogotá

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia
Ciudad Universitaria, Edificio Manuel Ancizar, A.A. 14490
Bogotá D.C.

LABORATORIO UNIDAD DE ANALISIS

Registro ICA 002816

GGCGCCTGGTTCCGGGCCCGAAGGCGCCGGGGCGGTCCCCGCCGAAGCAACA ATATGGTAAGGTtCACAAAGGGTTKGRGagtttgtaaactcggaatgatccctccgcaggt taccctacgg			
ANÁLISIS DE TAXONOMIA	Microorganismo (Vecino cercano)	% similitud	Valor -e
	<i>Myrothecium sp.</i>	99	0,0
	<i>Myrothecium verrucaria</i> aislamiento DCF88	99	0,0
	<i>Albifimbria verrucaria</i> aislamiento 11 (Sin. <i>Myrothecium verrucaria</i>)	99	0,0
Análisis adicionales	Ninguno. Se anexan imágenes de las observaciones macroscópicas y microscópicas de la muestra analizada (2018-SEP-004-MICROSCOPIA.PDF).		
CONCLUSION	Identificación de IDENTIFICACION DE <i>Myrothecium sp.</i>		
OBSERVACIONES			
El análisis de la secuencia obtenida se realizó mediante la plataforma BLASTn. Se adjuntan al presente resultado las secuencias originales obtenidas, las secuencias curadas y la secuencia consenso usada. Los vecinos cercanos reportados se seleccionaron con base en los resultados generados por el análisis en la plataforma BLASTn.			

Los resultados reportados corresponden únicamente a la muestra analizada

MAURICIO BERNAL MORALES
Director Técnico
UNIDAD DE ANALISIS

