

A mi Madre, por su invaluable
sacrificio y estímulo de superación,

A mi Abuelo por sus consejos
y sabias enseñanzas en vida.

AGRADECIMIENTOS

- Expreso mi agradecimiento a mi *Alma Mater* la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, centro que imparte cultura, ciencia y tecnología.
- Al Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria INIA – Estación Experimental CANAAN - Ayacucho, por el gran apoyo en materiales y equipos de laboratorio.
- A la plana docente de la Facultad de Ciencias Biológicas, por su orientación y valiosa enseñanza durante mi formación profesional.
- Al Mg. Blgo. Serapio ROMERO GAVILAN, por su acertada dirección para la culminación de la presente investigación.
- Al Mg. Ing. Abraham VILLANTOY PALOMINO, por su valioso e incondicional apoyo, en el proceso de investigación de este trabajo.
- A los familiares y amigos que de una u otra manera contribuyeron en el logro del presente trabajo.

ÍNDICE

	Pag.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	v
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCOTEÓRICO	3
A. ASPECTOS GENERALES DE LA TUNA	3
1. ORIGEN Y ASPECTOS ECOLÓGICOS DE LA TUNA	3
2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS DE LA TUNA	4
3. SISTEMÁTICA DE LA TUNA	6
4. FISIOLÓGÍA DE LA TUNA	7
5. CULTIVO DE LA TUNA	8
B. ENFERMEDADES DE LA TUNA	8
1. ENFERMEDADES CAUSADAS POR PROCARIONTES	9
2. TIPOS Y SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS	12
3. FACTORES DE LA ENFERMEDAD	16
4. AISLAMIENTO DE FITOPATÓGENOS	19
5. CONTROL DE LAS ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LAS PLANTAS	23
C. ANTECEDENTES	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
1. UBICACIÓN DE LA ZONA DEL ESTUDIO	27
2. RECOLECCIÓN DE MUESTRAS	28
3. METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO DEL PATÓGENO	29
4. OBTENCIÓN DE CULTIVO PURO	30
5. IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE PATOGENICIDAD	31
6. ESTUDIOS Y PRUEBAS PRELIMINARES DE LA INTERACCIÓN HOSPEDADOR PARÁSITO	33
7. ANÁLISIS DE DATOS	34
IV. RESULTADOS	35
V. DISCUSIÓN	49
VI. CONCLUSIONES	68
VII. RECOMENDACIONES	70
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	74

Agentes microbianos asociados a enfermedades en *Opuntia* spp. "tuna".

Ayacucho 2001 – 2002.

Autor : Bach. Héctor Hidson RUERO SILVA.
Asesores : Mg. Blgo. Serapio ROMERO GAVILAN.
Mg. Ing. Abraham VILLANTOY PALOMINO.

RESUMEN

La investigación de la etiología de enfermedades bacterianas en la "tuna" se llevó a cabo entre los meses de mayo del 2001 a diciembre del 2002, en el Laboratorio de Fitopatología del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas del INIA – Ayacucho. El muestreo biológico se realizó en la Provincia de Huanta (localidades de Atoccpampa y Huanchacc), el Distrito de Huamanguilla; la Provincia de Huamanga: Distritos de Quinua, Pacaycasa, San José de Ticllas (localidad de Simpapata) y Ayacucho (Estación Experimental Canaan). Las enfermedades en la "tuna" son producidas por insectos, hongos y bacterias, estas últimas han tenido un crecimiento explosivo en los últimos años causando pérdidas en los cultivos, por lo cual se planteó la presente investigación, con los objetivos de aislar e identificar al agente etiológico de las enfermedades en los morfotipos de "tuna" y realizar la infección experimental en campo para determinar la etiología caracterizando los signos y relacionar las enfermedades con las variables ambientales. Se aislaron bacterias y agentes relacionados causantes de la enfermedad, se comprobó la presencia de 02 tipos de bacilos Gram-negativos y una levadura; con cepas puras se realizaron las pruebas de patogenicidad en campo; estas consistieron en aplicar los postulados de Koch, empleando la técnica de inoculación por inyección de cladodios sanos en condiciones de campo; demostrándose que las bacterias estaban asociadas con la enfermedad, desarrollando síntomas característicos como las: ampollas de formas regulares e irregulares, inicialmente amarillas tornándose poco después de color marrón oscuro y algunas veces eliminando un líquido viscoso oscuro al medio externo, asociadas a una levadura que incrementa la virulencia de estas. Posteriormente las bacterias fueron identificadas por medios diferenciales, correspondiendo una al Género *Xanthomonas* y otra por el Test LOPAT (+++-) al Género *Pseudomonas* Grupo IVa, especie probable *P. marginalis* o miembros pectolíticos de *P. fluorescens*.

Palabras clave: Bacterias, levaduras, fitopatogenos, tuna.

I. INTRODUCCIÓN

La “tuna” *Opuntia spp.* tiene importancia económica no sólo por que es el hospedero de la “cochinilla”, que se utiliza para la obtención del carmín, sino también por la producción de frutos. Originarias del continente americano y de las islas del Caribe, donde las tunas silvestres se incorporan como parte de la vegetación natural, encontrándose bosques en la meseta central de México y los andes del Perú y Bolivia.

Desafortunadamente por la falta de asistencia técnica e investigaciones este recurso no ha alcanzado altos niveles de producción, más al contrario se ve afectado por factores negativos como la aparición de enfermedades y plagas.

En la Región Ayacucho existen trabajos de investigación en “tuna”, generalmente sobre enfermedades producidas por hongos e insectos, muy pocos referidos a enfermedades producidas por bacterias, que actualmente están causando daños severos en las plantaciones de tunaes.

Las plantaciones de tuna en los valles de Huanta – Ayacucho se han incrementado con fines de producción comercial de la “cochinilla” y frutos. Con el incremento de las plantaciones se ha registrado un incremento de la frecuencia y aparición de enfermedades de origen probablemente bacteriano, adquiriendo importancia por los daños que ocasionan, provocando caída de cladodios por

putrición y reduciendo el área de desarrollo de la "cochinilla" (INIA – CONAFRUT, 1998; Informe Anual MIP 2002).

Para contrarrestar este problema se viene optando el uso agrotóxicos: fungicidas e insecticidas, sin resultados satisfactorios, ni conocer exactamente el agente etiológico, causando daños ecológicos y resistencia a estos, por ende los costos de producción se incrementan y los efectos nocivos a la salud del hombre, además de la pérdida de variabilidad genética de los biotipos naturales.

El presente trabajo de investigación se orientó a realizar la identificación en laboratorio de las enfermedades de origen bacteriano en la tuna que producen síntomas muy característicos en las pencas de forma circular a irregular de color marrón oscuro y al nivel de campo de las que se aislaron para tener la cepa pura y probar su infección experimental en plantas sanas, para comprobar que el agente etiológico es el que se aisló de la "tuna" y su posterior identificación. Las enfermedades microbianas adquieren importancia por que las diferentes formas de expresarse deben ser conocidas a fin de hallar el momento para efectuar su control antes de que llegue a ser económicamente dañinas, y evitar el uso indiscriminado de pesticidas sin conocer el agente patógeno; para tal efecto se consideraron los siguientes objetivos:

- 1.- Aislar e identificar al agente etiológico de las enfermedades producidas por microorganismos en los morfotipos de "tuna" *Opuntia spp.*
- 2.- Realizar la infección experimental para determinar la etiología de la enfermedad, caracterizando los signos que presentan al nivel de campo y describir su desarrollo.
- 3.- Relacionar las enfermedades bacterianas de tuna con las variables medio ambientales, tales como: edad de los cladodios, temperatura, incidencia de rayos solares y volumen de inóculo de los patógenos.

dependiendo de las condiciones del clima, población de plantas, fertilidad y humedad del suelo (Tenorio, 1998).

Es una planta xerofítica, que ha sufrido modificaciones en su morfología y fisiología puesto que puede sobrevivir casi del aire y sirviéndose del suelo casi únicamente para el sostén, las plantas del género *Opuntia* son arbóreas o arbustivas, de tronco bien definido y casi siempre ramificado desde la base, de dimensiones bastante variadas, de consistencia tierna y suculenta con cladodios espinosos, provistas de hojas rudimentarias y caducas cuando tiernas, luego son reemplazadas por espinas (Piña, 1977).

2.1. Raíz.- Es muy fibrosa, alargada y gruesa, crece superficialmente y se introduce con mucha facilidad en las grietas que presentan las rocas o los suelos duros (Palomino, 1985).

2.2. Tallo.- Son aplanados suculentos, de formas ovoides denominados cladodios. Está adaptado a ambientes secos, su epidermis es bastante gruesa con cutículas muy duras y estomas hundidos, por debajo se encuentra capas de colénquima seguidos de parénquima acuífero con abundante mucilago que tiene la capacidad de almacenar agua (Palomino, 1985).

El floema es muy desarrollado y contiene agua, mucilagos y sustancias nutritivas. El xilema es duro en tallos viejos, constituyen un tejido de reserva (León, 1968; Juscamaita, 1992).

Estas pencas se encuentran en activo crecimiento, muy suculentos provistos de pequeñas hojas que caen rápidamente para ser reemplazados por un conjunto de espinas que se ubican en las cavidades denominadas areolas. Las verdaderas ramas son los cladodios, las cuales poseen en toda su superficie areolas, donde se encuentran insertas las cloquídeas, espinas y yemas foliares (Palomino, 1983).

2.3. Flor.- Las flores son grandes y atractivas de colores vistosos, son generalmente hermafroditas, cáliz y corola coloreada, el ovario es ínfero y se encuentra generalmente cubiertos por areolas, espinas, pelos; el estigma es polilobulado posee placentación parietal, el androceo posee numerosos estambres libres que nacen en la base de los pétalos (Palomino, 2000).

2.4. Fruto .- Es una baya ovoidal jugosa y carnosas de color verde cuando es tierno y blanco por dentro, luego se torna amarillo, roja, violáceo u otro color cuando madura. El fruto en su interior tiene pulpa dulce gelatinosa, con muchas semillas reniformes (Palomino, 1998).

3. SISTEMÁTICA DE LA TUNA.

De acuerdo a Engler y Prantl (citado por De la Cruz, 1991), la tuna pertenece a la siguiente taxa:

Reino	: Plantae.
División	: Antophyta.
Clase	: Dicotiledónea.
Sub Clase	: Archyclamidea.
Orden	: Opuntiales (Cactales)
Familia	: Opuntiaceae (Cactaceae)
Sub Familia	: Opuntioidea
Género	: <i>Opuntia</i>
Especie	: <i>Opuntia spp.</i>
N.V.	: "tuna", "nopai".

4. FISIOLÓGÍA DE LA TUNA.

Para Bidwel (1979), la producción de hidratos de carbono en el proceso fotosintético de la "tuna" se caracteriza por la fijación del CO₂ durante las noches, mediante la B-descarboxilación del fosfo enol piruvato (PEP) para formar malato, este se acumula en la vacuola de las células y su descarboxilación en el citoplasma durante el día para producir anhídrido carbónico el cual se fija y es reducido en el cloroplasto mediante el ciclo de Calvin. La fuente de PEP en la noche es el almidón, este se forma durante el día. Las especies del género *Opuntia* se consideran como plantas MAC obligadas (Metabolismo Ácido de las Crasuláceas). Esta afirmación está basada en que estas plantas no cambian de metabolismo fotosintético en respuesta a la aplicación de agua de lluvia o de riego (Pimienta, 1990).

La acumulación de ácido málico durante el transcurso de la noche ocasiona que los cladodios reduzcan su pH, es decir acidifican los tejidos. Esta acidificación o acumulación de ácidos es más intensa en cladodios jóvenes que en adultos, y dentro del cladodio es más en el clorenquima que en el parénquima medular. El parénquima medular se considera como un tejido de almacenamiento de agua. La acidificación es más intensa de cladodios jóvenes, que también indican que es mayor en las primeras horas del día (Pimienta, 1990).

En un caso extremo, una cactácea con sus estomas cerrados durante todo el día, situación perfectamente normal, apenas si pierde agua, pero, al mismo tiempo, carecería por completo de anhídrido carbónico necesario para la fotosíntesis. Involucra la síntesis de ácido málico por carboxilación durante la noche y el rompimiento de dicho ácido málico durante el día con liberación de CO₂ para la fotosíntesis. Este tipo de metabolismo les permite efectuar fotosíntesis aun cuando sus estomas están firmemente cerrados durante el día

por el calor y sequedad, usando el CO₂ que absorbieron durante la noche más fresca y húmeda (Bidwell. 1979, citado por Juscamaita. 1991).

5. CULTIVO DE LA TUNA.

5.1. Requerimientos Climáticos.- La tuna se desarrolla bien en climas áridos, en zonas con 100 a 125 mm de lluvia al año; los excesos de humedad provocan enfermedades fungosas y daños por insectos. La especie *Opuntia ficus indica* Miller, puede soportar temperaturas extremas de 10 °C y 50°C, mínima y máxima respectivamente, pero prefiere climas templados cálidos con una temperatura máxima media de 20 °C a 30 °C. Su óptimo desarrollo se presenta con temperaturas entre los 18 °C y 25 °C. Es una planta resistente a la sequía, pero se beneficia si tiene agua en los meses de verano, dando grandes y abundantes frutos (Juscamaita, 1991).

5.2. Requerimientos Edáficos.- Crecen en terrenos arenos – calcáreos, sueltos, relativamente poco profundos, con sub suelo permeable. No obstante, se adapta a cualquier tipo de suelo, debiendo el pH ser neutro a alcalino (pH 7.0 – 9.5); no tolera suelos húmedos. Aunque vegeta bien y produce en suelos pobres. Las cosechas importantes, en cantidad y calidad están en relación directa a la calidad del suelo, su textura y su riqueza en elementos nutritivos, y en estrecha relación con la disponibilidad del agua de riego (Juscamaita, 1991).

B. ENFERMEDADES DE LA TUNA.

La producción de la tuna y cochinilla se ven afectados permanentemente por enfermedades que inciden en los cladodios, fruto y en la cochinilla, allí la importancia del estudio de las enfermedades que alteran la producción óptima, ocasionando pérdidas económicas a los productores. Con frecuencia se encuentran enfermedades producidas por hongos como: la Cercosporiosis

(*Cercospora opuntiae*), la "mancha plateada" (*Mycosphaerella sp.*) y la "mancha amarilla" (*Trimmatostroma sp.*). Estas enfermedades tienen gran incidencia en varias zonas tuneras de nuestra localidad principalmente en la provincia de Huanta (Palomino, 1983). La "roya anaranjada" deformante enfermedad fungosa causada por *Aecidium sp.*, poco es el daño que produce normalmente, tiene la particularidad de presentarse con fuerte incidencia de manera imprevista como las alteraciones se presentan en los cladodios y frutos (Barrantes, 1985).

"Yana pususu", causada por *Pseudomonas sp.*, es una infección bacteriana al tejido de los cladodios, los que ingresan por los estiletes de los insectos o heridas de poda o cosecha y "Erwinia", ocasionada por *Erwinia sp.*, esta enfermedad ocasiona la muerte total de los cladodios terminales o jóvenes por pudrición, la que se inicia en el ápice y llega hasta el punto de inserción con otro cladodio para posteriormente momificarse y desprenderse (Reynel y León, 1990; FAO, 1998).

1. ENFERMEDADES CAUSADAS POR PROCARIONTES.

Dos clases de procariontes ocasionan enfermedades en las plantas: las bacterias, que tienen membrana celular y una pared celular rígida y, con frecuencia uno o más flagelos, y los mollicutes, organismos semejantes a fitoplasmas, los cuales carecen de pared celular y sólo poseen una membrana unitaria típica. Las bacterias fitopatógenas son el grupo más grande de procariontes, causan varios síntomas de enfermedad en las plantas y son los que mejor se conocen. Aun así, algunos tipos de bacterias fitopatógenas, como las bacterias fastidiosas vasculares, por varios años se pensó que eran organismos semejantes a las rickettsias, de ahí que sus propiedades y relaciones con las demás bacterias sean poco conocidas (Agrios, 1998).

Se han encontrado que cerca de 80 especies de bacterias, muchas de las cuales constan de numerosos patovares (variedades patógenas, es decir cepas que solo difieren debido a las especies vegetales que ellas infectan). La mayoría de las bacterias patógenas son organismos saprófitos facultativos y pueden cultivarse artificialmente en medios nutritivos, pero las bacterias fastidiosas vasculares son difíciles de mantener en medio de cultivo e incluso algunas de ellas tienen que mantenerse en medios nutritivos para poder crecer (Agrios, 1998).

1.1. Características de las bacterias fitopatógenas.

1.1.1. Morfología.- La mayoría de las bacterias fitopatógenas tienen forma de bastón, la única excepción es *Streptomyces* que es filamentosa. En ocasiones se dan variaciones de la forma de bastón en forma de una masa, una Y o una V y otras formas ramificadas, incluso algunas bacterias en ocasiones, pueden encontrarse dispuestas en pares o en cadenas cortas. La mayoría de estas bacterias poseen flagelos a menudo más largos que las células que las formaron, en algunas especies, cada bacteria presenta un solo flagelo, mientras que otras poseen un ramillete de flagelos en uno de sus extremos. Algunas tienen un flagelo simple o un ramillete de ellos en cada extremo y todavía otras poseen flagelos peritricos. La mayoría de las especies de bacterias están cubiertas por un material viscoso gomoso que puede ser delgado, caso en el cual se le denomina capa mucilaginosa (Agrios, 1998).

Cuando se cultivan en medio nutritivo, las colonias de las distintas especies de bacterias varían de tamaño, forma de los bordes, elevación y color u otras características y en ocasiones dichas variaciones son características de una determinada especie. Las colonias de la mayoría de las especies son de

color blancuzco y grisáceo, aunque algunas son amarillas, rojas o de otros colores. Algunas producen pigmentos que se difunden en el agar (Agrios, 1998).

Los géneros patógenos son colonias de color blanquecino, crema o amarillo. Realizando la tinción Gram se descarta como no patógena toda bacteria esférica o bacilo Gram-Positivo, que no tenga las características de *Corynebacterium*. Ninguna bacteria patógena produce endosporas, pero una observación negativa no es definitiva. Las colonias varían en tamaño, fluidez (tendencia a fluir y por lo tanto, toman formas no circulares), translúcidas (French, 1980).

1.1.2. Ecología y diseminación de las bacterias fitopatógenas.

La mayoría de las bacterias fitopatógenas se desarrollan principalmente como organismos parásitos en las plantas hospedadoras parcialmente en el suelo como saprófitos, sin embargo, hay grandes diferencias entre especies, en cuanto al grado de desarrollo en uno u otro ambiente (Agrios, 1998).

En caso de que hospedadores susceptibles se desarrollen en ese suelo durante varios años, podría liberarse una cantidad suficientemente alta de bacterias para causar un incremento neto en su número poblacional en el suelo de una estación a otra. Sin embargo, puede considerarse a la mayoría de las bacterias fitopatógenas como organismos colonizadores del suelo que pueden existir como células libres o que pueden penetrar en el suelo o en el tejido de sus hospedadores, y debido a que muestran una mínima capacidad para competir como saprófitos, persisten en el suelo mientras los tejidos del hospedador resistan a la descomposición por estos últimos o por un tiempo variable en lo venidero, dependiendo de la especie bacteriana y de las condiciones de temperatura y humedad existentes en el suelo (Agrios, 1998).

La diseminación de las bacterias fitopatógenas de una planta a otra o a otras partes de la misma planta, se lleva a cabo principalmente a través del agua, los insectos, diversos animales y el hombre. Aun bacterias que poseen flagelos se desplazan sólo a distancias muy cortas. La lluvia, por su efecto “de lavado” o salpicador, lleva o distribuye bacterias de una planta a otra, de uno de sus órganos a otro y del suelo a las partes inferiores. El agua también lleva y separa bacterias que se encuentran sobre o en el suelo hasta otras áreas donde puede haber plantas hospedantes. Los insectos no sólo llevan las bacterias hasta las plantas sino que las inoculan en ellas al introducirlas en determinadas zonas, donde casi siempre se desarrollan. En algunos casos las bacterias fitopatógenas persisten también en los insectos y dependen de ellos para sobrevivir y diseminarse. Los pájaros, y otros animales que frecuentan y se mueven entre las plantas, pueden ser portadores de las bacterias. El hombre contribuye a la diseminación local de las bacterias cuando manipula plantas o realiza prácticas de cultivo, pero también las lleva a grandes distancias al transportar plantas infectadas u órganos de ellas, hasta otras áreas nuevas o al introducir plantas de otras partes (Agrios, 1998).

2. TIPOS DE SÍNTOMAS PRODUCIDOS POR LAS BACTERIAS FITOPATÓGENAS

Las bacterias fitopatógenas ocasionan casi tantos tipos de síntomas en las plantas que infectan como los que producen los hongos. Producen manchas y tizones foliares, pudriciones blandas de frutos, raíces y órganos almacenadores, marchitamientos, crecimientos excesivos, sarnas, canchros o chancros (Anexo – Figura N° 5). Cualquiera de estos síntomas pueden ser producidos por bacterias patógenas de varios géneros y cada género contiene algunos patógenos capaces de producir diferentes tipos de enfermedades. Sin embargo, las

crecimientos excesivos de tejidos vegetales desorganizados, como la mayoría de las agallas o pueden ser proliferaciones de tejido que se desarrollan en órganos teratomórficos más o menos organizados. Las bacterias que inducen agallas penetran en las plantas a través de heridas y estimulan las células a dividirse y agrandarse.

2.5. Cancros bacterianos.

Relativamente pocas enfermedades cancerosas de las plantas son producidas por bacterias, pero algunas de ellas se encuentran ampliamente distribuidas y presentan efectos devastadores, de ahí que ocasionen grandes pérdidas o se requieran de grandes esfuerzos para proteger a las plantas de ellas, son producidas generalmente por *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. En todos los cancros bacterianos, los síntomas de la enfermedad en tallos, ramas o ramitas solo son parte del síndrome de la enfermedad, de ahí que los síndromes directos de ésta que se manifiestan en frutos, hojas, yemas o inflorescencias pueden ser al menos tan importantes en el efecto total de la enfermedad sobre la planta como lo son los cancros (Agrios, 1998).

2.6. Sarna bacteriana.

Este grupo de enfermedades comprende principalmente a las que afectan a los órganos subterráneos de las plantas y cuyos síntomas consisten en lesiones costrosas mas o menos localizadas que afectan principalmente los tejidos superficiales de esos órganos, las bacterias de la sarna son *Streptomyces* y *Pseudomonas* (Agrios, 1998).

Casi todas las bacterias fitopatógenas pertenecen a uno de seis géneros. Las especies de *Corynebacterium*, el único género Gram-Positivo, causan enfermedades sistémicas como agallas y fasciaciones. La mayoría de las especies de *Erwinia*, Gram-Negativas y con flagelos peritricos, causan pudriciones blandas. Mientras que las especies de *Agrobacterium*

morfológicamente similares, causan deformaciones y agallas. *Pseudomonas* y *Xanthomonas*, ambas Gram-Negativas y con flagelos polares, causan pudriciones blandas, con frecuencia localizadas en la forma de manchas foliares (Manners, 1986).

3. FACTORES DE LA ENFERMEDAD.

Ningún organismo sobre la tierra puede vivir aislado de su medio ambiente, cuyos factores gravitan sobre su salud. Los agentes etiológicos pueden ser hongos, bacterias, virus, insectos, etc., cada uno de estos agentes tienen sus propiedades, así como la biológica, composición química y la morfología. Otra de las propiedades de los agentes biológicos, es su sensibilidad a los agentes quimioterápicos y/o antibióticos, frente a los que el agente puede adquirir cierta resistencia (Manners, 1980).

En Ayacucho se diferencian dos épocas bien marcadas: la seca y fría; la lluviosa y cálida. Las plantas de tuna y sus parásitos y otros factores abióticos se rigen por este tipo de clima. La temperatura, la lluvia, la humedad del aire, son los que activan las enfermedades (Lara, 1993).

Aunque la mayoría de los patógenos bacterianos producen un tipo de síntoma principal, algunas enfermedades bacterianas ocasionan un síndrome de tres o más síntomas distintos.

3.1. Fases de penetración en la planta hospedadora.

Las bacterias no pueden entrar a la planta a través de cutículas intactas, por lo que lo hacen a través de heridas o aberturas naturales como los estomas, lenticelas e hidátodos (Manners, 1986).

3.1.1. Penetración a través de estomas, lenticelas e hidátodos.

Las bacterias suelen infectar a través de estomas debido a que son unicelulares. En general, ingresan a través de los estomas y sólo cuando hay agua en la superficie de las hojas, por lo general infectan a sus hospedadores a través de las lenticelas. En caso de todas las bacterias, la lenticela puede actuar como causal de entrada sólo cuando no está sellada por una capa de cierre de células suberizadas. Las bacterias que se acumulan en el agua secretada por los hidátodos entran en la planta, cuando el agua se contrae a medida que se seca la planta (Manners, 1986).

3.1.2. Penetración a través de heridas.

Muchos patógenos no especializados son incapaces de entrar en la planta intacta, pero pueden entrar a través de heridas causadas por algún otro agente. Los patógenos entran con frecuencia a través de heridas causadas por insectos. Cuando el insecto transmite la enfermedad y proporciona un punto de entrada, la relación es algunas veces específica (Manners, 1986).

Cuando el xilema es fragmentado por abscisión o por cualquier otro mecanismo, el agua que está al principio, cerca del punto de fragmentación retrae el vaso al cabo de unos cuantos minutos, llevando consigo cualquier patógeno que se ha depositado sobre su superficie rota. Muchos patógenos entran en el hospedador a través de las heridas causadas por una amplia gama de factores, entre las cuales pueden mencionarse las heladas, el granizo, los relámpagos y las operaciones efectuadas por el hombre (Manners, 1986).

3.2. El inóculo y la planta enferma.

Las enfermedades de las plantas causadas por agentes patógenos son contagiosas. Para que ciertas partículas del agente patógeno logren enfermar más plantas en un campo, deberán entrar en contacto con las plantas cuando

están sanas y establecer nuevas infecciones. Estas partículas constituyen el inóculo, según la naturaleza del agente patógeno, el inóculo puede producirse dentro de la planta, en la superficie, en desechos de plantas o en materia orgánica del suelo. Las bacterias se reproducen dentro del hospedero (Manners, 1986).

3.2.1. Traslado del inóculo.

Para producir nuevas infecciones, el inóculo debe ser trasladado desde su fuente hasta un tejido susceptible. El proceso de traslado varía según la naturaleza del agente patógeno y sus adaptaciones ecológicas al medio ambiente y los demás organismos. Los medios principales para la dispersión del inóculo son el aire, el agua, los desechos de plantas, los insectos, los animales, incluso el hombre (Manners, 1986).

El inóculo liberado puede ser latente o activo; si es activo puede producir inmediatamente la infección, en una planta susceptible. El inóculo latente, que a menudo está dotado de larga vida, necesita que transcurra cierto tiempo antes de poder germinar y producir infección (Manners, 1986).

3.2.2. Relación entre la cantidad de inóculo y las enfermedades.

Debido a que el inóculo posee el potencial de provocar enfermedades, este potencial resulta mayor cuando el inóculo es abundante, cuando se encuentra en el sitio donde ocurre infección, cuando están presentes muchos hospedadores susceptibles y cuando todas las circunstancias favorecen la infección. Potencialmente, una sola unidad del inóculo es capaz de producir una infección; sin embargo, el poder infeccioso, de las diversas unidades varía dentro de una misma población de inóculo; por tanto, la proporción de la población de inóculo a menudo está asociada con la infección (Manners, 1986).

El término potencial de inóculo se ha introducido para expresar la relación existente entre la cantidad del patógeno presente y el grado de infección. Se

supone que el nivel de infección es proporcional a la cantidad de inóculo. Las bacterias como fitopatógenos, una vez dentro de la planta, primero se multiplican dentro de los espacios intercelulares. Después de esto, secretan enzimas pectolíticas que les permita agrandar el espacio donde se encuentran y moverse a través de los tejidos. Puede producirse la muerte celular debido a las toxinas o enzimas pectolíticas producidas por las bacterias, después de lo cual las células son invadidas. La mayoría de las bacterias patógenas son necróticas (Manners, 1986).

4. ASILAMIENTO DE FITOPATÓGENOS.

4.1. Pruebas de patogenicidad.

La patogenicidad de un microorganismo se verifica utilizando los postulados de Koch, Él postuló que para comprobar que un parásito causa enfermedad se debe demostrar que el patógeno y la enfermedad no sólo están correlacionados, sino relacionadas en cuanto a causa, la causa verídica y directa de la enfermedad, esto depende de la separación del patógeno, y su reintroducción a un organismo, con la subsiguiente producción de síntomas, incluyendo la reaparición (multiplicación) del agente causal en el organismo enfermo. Estos se formalizan a continuación:

- 1) El microorganismo siempre debe estar asociado con la enfermedad no debe presentarse sin que el organismo o agente causal se encuentre presente, o haya estado presente.
- 2) El microorganismo en cuestión debe ser aislado en cultivo puro y sus características determinadas.
- 3) La inoculación del microorganismo debe resultar en los mismos síntomas de la enfermedad.

- 4) El microorganismo debe ser reaislado y sus características deben coincidir con las determinadas en el segundo postulado (French, 1980).

4.2. Diagnósis de la enfermedad.

El diagnóstico de enfermedad de plantas requiere la ejecución de varios pasos consecutivos, que pueden variar según las circunstancias, pero generalmente consisten en los siguientes:

- a) Observación de síntomas.
- b) Determinación de las circunstancias particulares del caso: condiciones climáticas; relieve del terreno; distribución de la enfermedad en el campo; historial de cultivos previos; y aplicación de fertilizantes, insecticidas, fungicidas, nematocidas y herbicidas (estos últimos dos en años anteriores pueden tener efectos duraderos).
- c) Observación de señas de patógenos.
- d) Correlación de lo observado con la bibliografía pertinente (French, 1980).

4.3. Aislamiento y purificación de bacterias.

Los métodos para aislar bacterias deben tener en cuenta que las poblaciones bacterianas se deben considerar como mezclas, en las cuales en ciertos momentos pueden predominar las patógenas, pero en otros estas pueden llegar a ser menos numerosas. Además deben reconocer que en un medio de cultivo, los saprófitos contaminantes pueden crecer más rápido que el patógeno de interés quedando enmascarado. Las bacterias saprófitas como las parásitas casi siempre andan acompañadas por otras. Las bacterias fitopatógenas tienden a ser reemplazadas por variantes avirulentas o bacterias saprófitas, cuando muere el tejido vivo que ha sido favorable para su multiplicación (French, 1980).

Los métodos usuales para aislar o purificar los microorganismos son las preparaciones de estriados y las series de dilución, por medio de las cuales se consiguen colonias separadas con gran probabilidad de que su origen provenga

de una sola célula. Para lograr estos métodos es necesario comenzar por hacer una suspensión de los microorganismos.

Suspensión.- Como los microorganismos se encuentran por millones en los tejidos enfermos, para preparar una suspensión sólo se requiere una porción pequeña de tejido afectado. En un tubo de prueba con unos 5 ml de agua estéril se le agrega tejido afectado y se deja unos 10 minutos para que las bacterias se difundan en el agua. Si el agua se vuelve lechosa, se diluye en otro tubo de agua estéril y utilizar ambas suspensiones para intentar el aislamiento usando uno de los métodos que se describen a continuación.

Siembra.- Las bacterias son favorecidas por medios de reacción neutra (pH 6.5 – 7.5) mientras que los hongos prefieren o toleran mejor los medios ácidos de pH 4.0 – 6.0. El medio más usado para las bacterias fitopatógenas es el Agar Nutritivo cuya reacción es neutra.

Estriado: Utilizando placas con Agar Nutritivo o medio Tetrazolio preparadas con un día de anticipación para que la superficie sea firme y sin agua libre (almacénelas invertidas). Pasar una gota de suspensión asépticamente, con una ansa en forma de aro, a un extremo del medio en una placa cuya tapa solo debe levantarse lo necesario para la operación, distribuya la gota sobre la superficie haciendo estrías rápidas en forma de zigzag sin superponer las estrías.

Dilución: Cuando se trate de una situación difícil, como cuando el material está en un estado avanzado de descomposición y la bacteria patógena se encuentra en condición minoritaria, se procede a realizar la serie de dilución clásica; con una pipeta estéril pasar 1 ml de suspensión original a un tubo con 9 ml de agua estéril y mezclar bien. Pasar 1 ml de la primera dilución a un segundo tubo con 9 ml de agua estéril, y así sucesivamente hasta completar una serie de 9 tubos (dilución final 10^{-9}). De cada dilución o sólo de las últimas 3 ó

4 según se considere prudente pasar 0.1 ml a la superficie el medio de unas 3 placas con medio Agar Nutritivo o Tetrazolio. Distribuir la suspensión en cada placa con un esparcidor de varilla de vidrio. Incubar las placas Invertidas a la temperatura disponible más propicia según el organismo diagnosticado, o de no tener un diagnóstico se aconseja utilizar temperaturas de 18 – 20 y 28 – 30°C. si se trabaja en un ambiente de laboratorio, es preferible una temperatura de alrededor de 23°C.

Selección de Colonias.- Observar las placas diariamente, lo más probable es que de un día al otro se vean algunas colonias de crecimiento rápido cerca del estriado, que pueden tratarse de de contaminantes secundarios. Los géneros patógenos son colonias de color blancuzco, crema o amarillo, sin considerar el rojo que se produce en medio Tetrazolio, pudiéndose dejar de lado las de otras coloraciones. Las colonias, además, varían en tamaño, fluidez y por lo tanto toman formas no circulares, especialmente cuando se inclina la placa, translucidez, color y en olor (detectable en cultivo puro). Tomando en cuenta todas estas características se deben hacer cultivos puros de todos los tipos distinguibles, transfiriendo bacterias de unas 5 o 6 colonias similares a uno o más tubos de agua estéril, para obtener una representación más amplia de la variabilidad genética característica de muchas bacterias, e inoculando estas suspensiones a tubos inclinados de Agar Nutritivo. De cada suspensión en agua se deben estriar en placas para constatar que todas las colonias que se desarrollan sean similares, si no lo son, el proceso de purificación debe continuar. La suspensión en agua es, para muchas especies, la mejor forma de mantenimiento. Los cultivos en Agar Nutritivo son una alternativa. Es mejor mantener el cultivo en agua a temperaturas al rededor de 20°C, y parte de los de Agar Nutritivo a esa temperatura y otra parte a unos 5°C.

Los cultivos puros estriados pueden caracterizarse en probables patógenos y en saprófitos. En la primera categoría están los de coloración blanquizca, crema o amarillo; y en la segunda. Los de otras coloraciones, especialmente si su crecimiento es muy rápido. Realizando la tinción de Gram con colonias de 1 – 2 días se descarta como no patógena, toda bacteria esférica o bacilo Gram-Positivo que no tenga las características de *Corynebacterium*. Todo bacilo cuyo ancho promedio sea mayor de 1 micra puede considerarse saprofito ya que ningún patógeno conocido es de mayor ancho. La formación de endosporas es también un criterio útil, ya que ningún fitopatógeno la produce. A veces se pueden ver en preparaciones teñidas pero como su formación no es siempre frecuente, una observación negativa no es definitiva, se realiza una prueba de endosporas para confirmar su presencia (Klement y Col., 1990).

5. CONTROL DE LAS ENFERMEDADES BACTERIANAS DE LAS PLANTAS.

Las enfermedades bacterianas comúnmente son muy difíciles de controlar. Con frecuencia, se requieren de una combinación de varios métodos de control para combatir una determinada enfermedad bacteriana. Debe evitarse la infestación de los campos o de las cosechas debida a las bacterias patógenas, introduciendo y sembrando semillas o plantas sanas (Agrios, 1998).

Son muy importantes las medidas sanitarias que permitan disminuir la cantidad de inóculo en un área de cultivo al trasladar y quemar las plantas o ramas infectadas y al limitar la propagación de las bacterias de planta en planta mediante la desinfección de las herramientas y manos después de haber manipulado plantas enfermas. El ajuste de ciertos métodos de cultivo como la fertilización e irrigación, de tal forma que las plantas no sean extremadamente succulentas durante el período en que se produce la infección, puede también

reducir la incidencia de la enfermedad. La rotación de cultivo puede ser muy efectiva con respecto a bacterias patógenas que tengan un rango de hospedadores limitado, pero es impráctica e ineficaz con respecto a bacterias que atacan muchos tipos de plantas cultivadas (Agrios, 1998).

El uso de variedades resistentes a ciertas enfermedades bacterianas es una de las mejores formas de evitar grandes pérdidas. En las variedades de una especie vegetal pueden darse varios grados de resistencia y se han hecho grandes esfuerzos en las estaciones de mejoramiento de cultivos por incrementar la resistencia de las variedades de plantas hasta ahora populares o para introducir nuevos tipos de resistencia. Las variedades resistentes, complementadas con prácticas de cultivo adecuadas y aplicaciones de compuestos químicos, son los medios efectivos para controlar las enfermedades bacterianas, especialmente cuando las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de la enfermedad. El uso de compuestos químicos para controlar las enfermedades bacterianas ha sido, en general, mucho menos exitoso que el control químico de las enfermedades fungosas. De los productos químicos aplicados en forma de aspersiones foliares, los compuestos de cobre han dado los mejores resultados. Sin embargo, rara vez dan un control satisfactorio de la enfermedad cuando las condiciones ambientales favorecen el desarrollo y propagación del patógeno. El Caldo Bordelés, los compuestos de cobre fijados y el Kocide son los que con mayor frecuencia se utilizan en el control de los tizones y manchas foliares bacterianas. El Zineb se utiliza también para el mismo fin, especialmente en plantas jóvenes que pudieran ser dañadas por los compuestos de cobre (Agrios, 1998).

Los antibióticos se han utilizado en los últimos años para combatir algunas enfermedades bacterianas y los resultados obtenidos son alentadores. Algunos antibióticos son absorbidos por la planta y distribuidos sistémicamente.

Pueden aplicarse en forma de aspersiones como baños para trasplantes. Los antibióticos antibacterianos más importantes en la agricultura son las formulaciones de Estreptomicina o de Estreptomicina y Oxytetraciclina. Algunas enfermedades bacterianas aparecen como necrosis continuas pero la mayoría se usan sólo experimentalmente. Se han encontrado fagos específicos para ciertas bacterias fitopatógenas, alguna vez se tuvo la esperanza de que los fagos serían de mucho valor en el control de las enfermedades bacterianas de las plantas, sin embargo, hasta ahora, este método de control de las enfermedades bacterianas no se ha desarrollado lo suficiente. Se ha logrado el control biológico satisfactorio de las enfermedades bacterianas de las plantas, al tratar las semillas o las cepas de los viveros con cepas antagónicas de la misma bacteria productoras de bacteriocinas, tratando los tubérculo, semillas y otros órganos aéreos de las plantas hospedante (Agrios, 1998).

C. ANTECEDENTES.

La producción de la tuna y cochinilla se ven afectados permanentemente por enfermedades que inciden en los cladodios, fruto y en la cochinilla, ahí la importancia del estudio de las enfermedades que afectan la producción óptima, ocasionando pérdidas económicas a los productores. Con frecuencia se encuentran enfermedades producidas por hongos como: la Cercosporiosis (*Cercospora opuntiae*), la "mancha plateada" (*Mycosphaerella sp.*) y la "mancha amarilla" (*Trimmatostroma sp.*). Estas enfermedades tienen gran incidencia en varias zonas tuneras de nuestra localidad principalmente en la provincia de Huanta.

Barrantes (1996) comenta que la bacteriosis en la tuna es una enfermedad localizada, que abarca básicamente los departamentos de Ayacucho (Cangallo, Pampas, Huanta y Huamanga), Apurímac y Huancavelica

(Churcampa y Huancavelica) debido a posiblemente factores climáticos y barreras geográficas, no reportándose en otras regiones.

El único trabajo en la región relacionado a enfermedades producidas por bacterias es la realizada por Juscamaita (1991) describiendo la enfermedad conocida como “yana pususu”, que puede presentarse en todos los lugares donde se cultiva o crece la tuna, de preferencia en la variedad amarilla silvestre con espina, su incidencia está regulada por la temperatura y lluvias; tiene carácter estacional se presente entre marzo y mayo. La enfermedad se presenta en ambos lados del cladodio sobre todo en los de 1 a 2 años de edad. El síntoma inicial aparece como una pequeña zona de aspecto húmedo translucido que va cambiando de color rápidamente y surgen las ampollas que van del color amarillento al marrón, algunas veces eliminan al medio externo un líquido viscoso y en otras esta pudrición cesa sin causar posterior daño al cladodio.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. UBICACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

1.1. LOCALIDAD.

Abarcó específicamente las Provincias de Huanta (Luricocha, Fundo Huanchacc, Huamanguilla) y Huamanga (Quinua, Pacaycasa, San José de Ticllas: anexo Simpapata y Canaan), en la Región Ayacucho.

1.2. ALTITUD.

Las zonas de estudio están ubicadas a una altitud de: Ayacucho 2 760 m.s.n.m.; Huanta 2 380 m.s.n.m.

1.3. ECOLOGÍA: (zonas de vida)

Abarcó básicamente dos zonas de vida:

ee-MBS = Estepa Espinosa Montano Bajo Subtropical, la precipitación máxima total por año fue de 590.4 mm y el promedio mínimo fue de 216.1mm. La biotemperatura media anual máxima fue de 17.7 °C y media anual mínima de 12.8°C. El relieve topográfico es predominantemente empinado, ocupando laderas largas de flancos de los cerros y las paredes de los valles interandinos.

bs-MBS = Bosque Seco Montano Bajo Subtropical la precipitación máxima total por año fue de 1124.0 mm. La biotemperatura media anual máxima fue de 18.1°C y la media anual mínima de 11.7°C. La topografía varía de suave a plano,

hasta inclinado, típico de las laderas que encierran a valles andinos (Ramírez, 1985).

Existe una vegetación estacional que es aprovechada para el pastoreo de ganado vacuno, ovino y caprino principalmente.

Entre las especies más importantes consideradas como indicadoras están *Opuntia ficus indica* "tuna", *Acacia macracantha* "huarango", *Agave americana* "cabuya", *Schinus molle* "molle".

Ayacucho tiene temperaturas máximas medias mensuales de 24°C, siendo los meses más calientes los de octubre y noviembre, los meses más fríos junio y julio y los meses más lluviosos enero y febrero, que se caracterizan por tener época seca y alta insolación y otra húmeda con lluvias dispersas (Ramírez, 1985).

2. RECOLECCIÓN DE MUESTRA BIOLÓGICA.

Se basó en trabajos previos, considerando las plantas enfermas y la sintomatología. Se visitó campos de "tuna" (*Opuntia spp*) de Luricocha y el Fundo Huanchacc y Huamanguilla comprensión de la Provincia de Huanta; Quínuá, Pacaycasa, SanJosé de tiillas y Canaan comprensión de la Provincia de Huamanga, donde se encuentran las mayores plantaciones de tunales en el departamento y en las cuales se observaron con frecuencia la presencia de enfermedades; entre los meses de noviembre, diciembre del 2001 y enero, febrero del 2002; se recolectaron cladodios con manchas circulares de diferente diámetro e irregulares de consistencia blanda que van de color transparente a marrón oscuro y fueron llevadas al Laboratorio de Manejo Integrado de Plagas y Fitopatología del INIA– Estación Experimental Canaan, para ser procesadas.

- Para el aislamiento de microorganismos se muestrearon aleatoriamente los cladodios con signos y síntomas de enfermedades, en táperes especiales, los cuales se trasladaron al laboratorio para su aislamiento e identificación. Los cladodios fueron marcados adecuadamente para saber el lugar de su procedencia.
- Se determinó las circunstancias particulares del caso: condiciones climáticas; distribución de la enfermedad en el campo; historial de cultivos previos; y aplicación de fertilizantes, insecticidas, fungicidas, nematicidas, y herbicidas.
- Se observaron las señas de patógenos (French, 1982).

3. METODOLOGÍA PARA EL AISLAMIENTO DEL PATÓGENO:

Se emplearon para el aislamiento cladodios enfermos, obtenidos de las zonas de muestreo (Figura N° 01, Anexo 10).

3.1. Lavado de tejidos afectados.- Los cladodios fueron lavados con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1%. Se utilizó lejía marca "Clorox" (5.25% NaClO aproximadamente) por sumersión durante 5 minutos, los tejidos aparentemente limpios no necesitaron lavado, excepto el que se hizo durante la desinfección.

3.2. Desinfección.- Se utilizó alcohol etílico al 75%, sumergiendo los cladodios un instante y luego flameados.

3.3. Siembra.- Se obtuvieron pequeños trozos de tejidos internos con avance de la enfermedad en los cladodios, eliminándose previamente las partes blandas de los tejidos, con ayuda de un bisturí desinfectado, luego fueron colocados en tubos conteniendo agua destilada estéril, dejándose hasta que el liquido se torne turbio al ser agitado, característica de la presencia de células bacterianas. Se hizo la tinción Gram y observación microscópica previa en detrito de tejidos y suspensiones.

3.4. Incubación.- Se realizaron cultivos en placas Petri conteniendo Agar Nutritivo, por estrías, para observar la formación de colonias independientes, incubándolas a temperatura ambiente.

- Las placas incubadas se observaron diariamente, a partir de las 24 horas, debido a que algunos patógenos tenían crecimiento muy rápido.
- A partir de las colonias desarrolladas se tomaron asadas y se repicaron en nuevas placas con Agar Nutritivo, para obtener colonias más dispersas y puras.
- Las colonias con características bacterianas típicas (blanquecinas y amarillentas) (French, 1980), fueron reaisladas en cultivo puro, en tubos de prueba con tapa rosca conteniendo 10 ml de agua destilada estéril conservadas a temperatura ambiente para su posterior estudio.
- Estas fueron sembradas nuevamente para realizar las pruebas de patogenicidad, en placas conteniendo Agar Nutritivo.

3.5. Observación de colonias.- Inicialmente se identificó a las bacterias patógenas empleando la coloración Gram; se preparó el frotis, una vez fijada y coloreada la muestra, se observó con el objetivo de inmersión del microscopio compuesto y las bacterias que presentaron características propias de fitopatógenas fueron conservadas para su estudio.

4. OBTENCIÓN DE CULTIVO PURO

Tomando las características antes descritas se obtuvieron cultivos puros de todos los tipos distinguibles, transfiriendo bacterias de unas 5 ó 6 colonias similares a tubos con agua estéril, para una representación más amplia de la variedad de las bacterias. De cada suspensión se realizaron siembras por estrías

en placas con Agar Nutritivo, para constatar que todas las colonias que se desarrollaron fueran similares, luego reaisladas y mantenidas en agua estéril.

5. IDENTIFICACIÓN Y PRUEBA DE PATOGENICIDAD.

Una vez obtenidas las cepas, se procedió a probar su patogenicidad, para demostrar que el microorganismo es patógeno (Postulados de Koch), además de otras pruebas.

5.1. Preparación del inóculo y la suspensión bacteriana.- El inóculo consistió en una asada de masa bacteriana que se tomó de las cepas conservadas en tubos con agua destilada estéril, se sembraron en Agar Nutritivo a temperatura ambiente por 24 horas.

Las colonias de más de 24 horas, se lavaron con 10 ml de agua destilada estéril para obtener caldo lechoso, utilizando hisopos estériles; la concentración bacteriana se estandarizó a 2.0 de densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm que se midió con un espectrofotómetro, que representa concentraciones de 10^8 UFC/ml.

5.2. Inoculación en campo (pruebas en pencas).- Se utilizó la técnica de "inyección", consistió en introducir subepidérmicamente suspensiones del patógeno en concentraciones de 10^8 UFC/ml, en plantas aparentemente sanas, utilizando una aguja insertada en una jeringa con volúmenes de 0.5 ml y 0.1 ml., las heridas profundas fueron selladas con vaselina. También se utilizó blancos (agua destilada estéril y agua destilada con suspensión de medio de cultivo). Previamente se desinfectó la superficie del cladodio con agua destilada estéril y con alcohol al 75%.

La respuesta se observó cada 12 h, determinando los signos y síntomas que produjo el agente, correlacionando el tipo de lesión del que fue aislado

inicialmente y considerando el tiempo de aparición de estos. El daño sobre las pencas se consideró en área y volumen.

5.3. Lugar de inoculación en el cladodio.- Para la inoculación, cada cladodio se dividió longitudinalmente en tres tercios: superior, medio e inferior; con el fin de observar al tercio más susceptible del cladodio. En cada tercio se inocularon al azar 0.5 y 0.1 ml de la suspensión bacteriana.

5.4. Edad del cladodio.- Se consideró a fin de conocer la susceptibilidad de los tejidos del hospedero según su madurez, se utilizaron cladodios de 0.5, 1 y 2 años de edad, teniendo en cuenta, que estos patógenos no afectan cladodios de mayor edad según las observaciones de campo. Se emplearon 06 repeticiones en cada caso (180 inoculaciones); considerando también la incidencia de los rayos solares.

Se registraron los datos meteorológicos como la temperatura y precipitación y las horas de luz, considerando la zona con mayor iluminación solar de los cladodios durante el día para determinar el efecto sobre el desarrollo de la enfermedad. Se hizo la inoculación de controles en cada caso: agua destilada estéril y dilución del medio de cultivo estéril utilizada para la multiplicación.

5.5. Recuperación del agente patógeno.- Una vez producida la infección en los cladodios, se procedió al reaislamiento, utilizando la técnica inicial. La muestra fue sometida nuevamente a purificación, para su posterior identificación (Figura N° 02, Anexo 11).

5.6. Diferenciación e identificación de géneros fitopatógenos.- En el Laboratorio de Fitopatología del INIA se realizó la identificación del género, confirmando las pruebas bioquímicas básicas propuestas por Klement (1990) según la Figura N° 3, Anexo 12.

6. ESTUDIOS Y PRUEBAS PRELIMINARES DE LA INTERACCION HOSPEDADOR – PARÁSITO.

Se hicieron para obtener mayor información de los patógenos, respecto a su desarrollo en el hospedador habitual y otras plantas, que también sirvieron para la identificación del género de bacteria.

6.3. Prueba en Tubérculos.- Se evaluó el porcentaje de daño producido en cortes de tubérculos (papa y zanahoria), a partir de los cuales se realizó microcultivos, se observaron el grado de pudrición y el tiempo de duración de la degradación de los tejidos en cámara húmeda estéril (Figura N° 4, Anexo 13).

6.4. Prueba en Plantas Susceptibles.- Suspensiones del agente biológico aislado, se inocularon en plantas indicadoras como el tomate, a unos 15 a 20 cm de altura, colocando una gota de suspensión la que se introdujo punzándola con una aguja de disección estéril, hasta alcanzar el sistema vascular del tallo. Las plantas inoculadas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que marchiten; finalmente se inocularon testigos con agua destilada estéril, suspensión de medio de cultivo y suspensión de bacterias no patógenas para evitar falsos positivos.

6.5. Observación de síntomas.- Al momento de los muestreos realizados se observaron y describieron los síntomas particulares del agente en las pencas de las plantas, como un diagnóstico preliminar y luego observar las diferentes fases del desarrollo de la enfermedad en las pruebas realizadas.

6.6. Circunstancias particulares.- Se observaron también los factores no bióticos donde crece el hospedero y que pudieran afectar directa o predisponer a los agentes causantes de la enfermedad. Se registró datos climatológicos (temperatura, precipitación y HR), la disposición de agua y nutrientes (tipo de suelos), presencia de cultivos asociados, exóticos o nativos, historial de aplicación de agentes químicos y distribución de la enfermedad en el campo.

6.7. Señas del patógeno.- Se observaron las señas de los agentes patógenos de interés, que sirvieron como diagnóstico preliminar de probables infecciones bacterianas, como son la formación de manchas translúcidas, pudriciones y presencia de exudados.

7. ANÁLISIS DE DATOS

Para la interpretación de los resultados de la parte experimental del presente trabajo se realizó análisis individual de las lesiones considerando finalmente los promedios por tipo de lesión. Se elaboraron cuadros de datos cualitativos, cuantitativos y análisis de variancia (experimento factorial $axbxc$) para determinar las interacciones entre los factores estudiados, figuras estadísticas que representen la información obtenida de acuerdo a los objetivos.

IV. RESULTADOS

Cuadro N° 01.- Características de muestras de cladodios y tejidos enfermos de “tuna“ *Opuntia spp.* por lugar de procedencia. Ayacucho 2001 – 2002.

Muestra N°	Procedencia	Tipo de Muestra	Signos	Altitud m.s.n.m.
1	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro regular	2,300
2	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro regular	"
3	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Forma lcuada dela penca (invasiva) irregular	"
4	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro regular	"
5	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro regular	"
6	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro regular	"
7	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Forma lcuada dela penca (invasiva) irregular	"
8	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Forma lcuada dela penca (invasiva) irregular	"
9	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Puntos marrones (colonias ciculares pequeñas)	"
10	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno y superficial)	Puntos amarillos en la superficie	"
11	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno y superficial)	Puntos amarillos en la superficie	"
12	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno y superficial)	Puntos amarillos en la superficie	"
13	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno y superficial)	Puntos amarillos en la superficie	"
14	Huanta	Cladodio y tejido enfermo (corte interno y superficial)	Formación de ampolla marrón oscuro	"
15	Huanta	Tejido enfermo (corte superficial- epitelio)	Puntos amarillos en la superficie	"
16	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Formación de ampolla marrón oscuro	"
17	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Formación de ampolla marrón oscuro	"
18	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Mancha necrótica circular clordíca ampollada.	"
19	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Formación de mancha circular marrónoscuro ampollada.	"
20	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Formación de mancha circular regular marrón oscura ampollada.	"
21	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Mancha necrótica circular.	"
22	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Mancha necrótica circular.	"
23	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Mancha necrótica circular.	"
24	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Mancha necrótica circular que produce agujero.	"
25	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Formación de mancha circular marrónoscuro ampollada.	"
26	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Mancha necrótica circular que produce agujero.	"
27	Huanta	Tejido enfermo (corte)	Clorosis en cloquideas	"
28	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	2,100
29	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	"
30	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	"
31	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	"
32	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	"
33	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	"
34	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	"
35	Simpapata	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro irregular	"
36	Huamanguilla	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Puntos marrones (colonias ciculares pequeñas)	3,100
37	Huamanguilla	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Puntos marrones (colonias ciculares pequeñas)	"
38	Ayacucho	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro circular	2,700
39	Ayacucho	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Putrición total de la penca -marron oscuro	"
40	Ayacucho-	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Putrición en penca	"
41	Ayacucho	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Putrición en penca	"
42	Ayacucho	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Putrición en penca	"
43	PESCS	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Putrición en penca	"
44	PESCS	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Mancha necrótica ampollada.	"
45	Canaan	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Costra negra con puntos	2,720
46	Canaan	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Costra negra con puntos	"
47	Quinua	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro	2,900
48	Quinua	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro	"
49	Quinua	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro	"
50	Quinua	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro	"
51	Quinua	Cladodio y tejido enfermo (corte interno)	Formación de ampolla marrón oscuro	"

Nota. Los tejidos internos fueron colocados en tubos de baquelita conteniendo H₂O destilada estéril para luego ser sembradas en placas Petri con Agar Nutritivo, tambien los pedazos de tejidos obtenidos fueron sembrados directamente en Agar Nutritivo.

Cuadro N° 02.- Características de crecimiento y reacción Gram de los microorganismos aislados a partir de tejidos enfermos de cladodios de "tuna" *Opuntia spp.* Ayacucho 2001 – 2002.

Muestra N°	Procedencia	Desarrollo de colonias en Agar Nutritivo	Tiempo de desarrollo (hr.)			Coloración Gram
			18-24	24-36	36->	
1	Huanta	pequeña / blanca / cremosa	(-)	(++)	(++++)	Negativo
2	Huanta	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(-)	(++)	(++++)	Negativo
3	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
4	Huanta	X				
5	Huanta	X				
6	Huanta	blanquesina / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
7	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(-)	(+)	Negativo
8	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
9	Huanta	X				
10	Huanta	XX				
11	Huanta	XX				
12	Huanta	XX				
13	Huanta	XX				
14	Huanta	X				
15	Huanta	X				
16	Huanta	X				
17	Huanta	X				
18	Huanta	blanquesina / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
19	Huanta	pequeñas / blanquesina / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
20	Huanta	regulares / amarilento-transparente /	(-)	(++)	(+++)	Negativo
21	Huanta	irregulares / amarilento-transparente /	(-)	(+)	(++++)	Negativo
22	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(++)	(++++)	Negativo
23	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(++)	(+++)	Negativo
24	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
25	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
26	Huanta	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(+)	(++)	Negativo
27	Huanta	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(-)	(+)	(++)	Negativo
28	Simpapata	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(+)	(++)	(++++)	Negativo
29	Simpapata	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(-)	(++)	(++++)	Negativo
30	Simpapata	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(-)	(++)	(++++)	Negativo
31	Simpapata	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(-)	(++)	(++++)	Negativo
32	Simpapata	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(-)	(++)	(+++)	Negativo
33	Simpapata	pequeña / blancas/ cremosa -amarilenta	(-)	(++)	(++++)	Negativo
34	Simpapata	X				
35	Simpapata	X				
36	Huamanguilla	X				
37	Huamanguilla	crema -blanquesina / cremosa	(+)	(++++)	(++++)	Negativo
38	Ayacucho	crema -blanquesina / cremosa	(-)	(+)	(++++)	Negativo
39	Ayacucho	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(+)	(+++)	Negativo
40	Ayacucho-	blanca amarilenta / cremosa	(+)	(+++)	(++++)	Negativo
41	Ayacucho	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(++)	(+++)	Negativo
42	Ayacucho	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(++)	(+++)	Negativo
43	PESCS	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(++)	(++++)	Negativo
44	PESCS	crema -blanquesina / cremosa /	(+)	(++++)	(++++)	Negativo
45	Canaan	crema -blanquesina / cremosa /	(+)	(++++)	(++++)	Negativo
46	Canaan	crema -blanquesina / cremosa /	(+)	(++++)	(++++)	Negativo
47	Quinua	X				
48	Quinua	X				
49	Quinua	blanca amarilenta / cremosa	(+)	(+++)	(++++)	Negativo
50	Quinua	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(++)	(++++)	Negativo
51	Quinua	blanca amarilenta / cremosa	(-)	(++)	(++++)	Negativo

Legenda:

- X Cepa descartada: Gram positivas/contaminación
- XX No desarrolló
- (-) sin crecimiento
- (+/-) crecimiento lento
- (+++ /++++) crecimiento abundante

Nota:

Se observa el crecimiento de levaduras en casi todas las placas, así como la de la observación directa de frotis del tejido infectado. Las cepas observadas por la coloración Gram fueron seleccionadas por sus características morfológicas y culturales (tamaño al microscopio, crecimiento, color, consistencia en cultivo en Agar Nutritivo).

Cuadro N° 05.- Daño del tejido por acción de las cepas inoculadas a diferentes volúmenes en cladodios de “tuna“ *Opuntia spp.*, infectadas experimentalmente en campo, evaluadas a los 60 días.

Ayacucho 2001 – 2002.

Cepa	Volumen de inóculo [10^8 UFC/ml]	
	0.5ml	0.1 ml
	Tejido infectado (cm ³)	Tejido infectado (cm ³)
<i>Xanthomonas</i>	4.6	2.8
<i>P. marginalis</i>	3.5	4.0
Levadura	4.5	4.0
<i>Xanthomonas</i> + Levadura	6.1	7.7
<i>P. marginalis</i> + Levadura	5.9	4.7

Cuadro N° 06.- Daño del tejido por acción de las cepas inoculadas en cladodios de “tuna” *Opuntia spp.* de diferentes edades, infectadas gexperimentalmente en campo, evaluadas a los 60 días.

Ayacucho 2001 – 2002.

Cepa	Edad del cladodio (años)		
	0.5	1	2
	Tejido infectado (cm ³)	Tejido infectado (cm ³)	Tejido infectado (cm ³)
<i>Xanthomonas</i>	2.2	3.2	5.7
<i>P. marginalis</i>	4.6	4.1	2.5
Levadura	3.4	2.4	6.9
<i>Xanthomonas</i> + Levadura	4.3	7.9	8.4
<i>P. marginalis</i> + Levadura	4.3	5.5	6.1

**Cuadro N° 07.- Daño del tejido por acción de las cepas inoculadas en el haz y envés de cladodios de "tuna" *Opuntia spp.*, infectadas experimentalmente en campo, evaluadas a los 60 días.
Ayacucho 2001 – 2002.**

Cepa	Lugar de inoculación en el cladodio			
	"haz" (A)		"envés" (E)	
	Sintomatología	Tejido infectado (cm ³)	Sintomatología	Tejido infectado (cm ³)
<i>Xanthomonas</i>	Rápido / más visible	4.6	Lento/ menos visible	2.8
<i>P. marginalis</i>	Rápido / más visible	3.5	Lento/ menos visible	4.0
Levadura	Rápido/más visible	5.4	Lento/ menos visible	3.2
<i>Xanthomonas</i> + Levadura	Rápido / más visible	7.8	Lento/ menos visible	5.9
<i>P. marginalis</i> + Levadura	Rápido / más visible	7.5	Lento/ menos visible	3.1

Leyenda:

"haz" (A) : cara con más horas de incidencia de luz directa del sol.

"envés" (E) : cara con menos horas de incidencia de luz directa del sol.

Rápido/más visible : aparición de los primeros síntomas entre el 2° y 3° día.

Lento/menos visible : aparición de los primeros síntomas al 5° día.

**Cuadro N° 10.- Prueba de patogenicidad en “papa” y “zanahoria”,
 crecimiento a temperatura ambiente (20-23°C).
 Ayacucho 2001 – 2002.**

Muestra N°	papa % Daño (1-2 días)	zanahoria % Daño (1-2 días)	Observaciones
<i>Xanthomonas</i>	0.0	0.0	
<i>P. marginalis</i>	10.0 - 15.1	30.0 - 40.0	Putridión marrón-negruzco con hundimiento de la superficie
Levadura	0.0	0.0	

**Cuadro N° 11.- Prueba de hipersensibilidad en planta susceptible
(*Lycopersicum esculentum* "tomate") de las cepas patógenas de "tuna"
Opuntia spp. Ayacucho 2001 – 2002.**

Cepa N°	Plantulas de "tomate" (25 - 30 días) inoculadas		Observaciones
	Efecto (24 - 48 hr.)	Efecto a los 5 días	
<i>Xanthomonas</i>	(-)	(++)	Bacterias, amarillamiento de hojas y marchitez.
<i>P. marginalis</i>	(-)	(+)	Bacterias, amarillamiento de hojas y marchitez.
Levadura	(-)	(-)	Levadura, ningun efecto.
Testigo	(-)	(-)	Agua destilada, ningun efecto.

**Cuadro N° 12.- Identificación de las especies bacterianas patógenas de
 “tuna” *Opuntia spp.* del grupo de *Pseudomonas* Fluorescentes por el Test
 LOPAT. Ayacucho 2001–2002.**

Cepa	Caracterización presuntiva LOPAT					Grupo	Especie
	L	O	P	A	T		
<i>P. marginalis</i>	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	Iva	<i>Pseudomonas marginalis</i> , miembros pectolíticos de <i>P. fluorescens</i>

Leyenda:

- L= Levan tipe colonies
- O= Oxidasa reaction
- P= Potato rot or pectate gel liquefaction
- A= Arginina dihidrolase
- T= Tobacco hypersensitivity

Test propuesto por Lelliot, 1987.

Cuadro N° 13: Evaluación de la reacción a bacteriosis de los diferentes morfotipos de “tuna” *Opuntia spp.* en el Banco de Germoplasma del INIA - Huanchacc 2,380 m.s.n.m. Ayacucho 2001 – 2002.

N° Accesión	N° Plantas	Caract.	Color Fruto	REACCIÓN A LA ENFERMEDAD (02 meses)
107	2	SE	Sin fruto	SIN INFECCIÓN
108	2	SE	Sin fruto	SIN INFECCIÓN
115	1	SE	Sin fruto	SIN INFECCIÓN
116	1	CE	Sin fruto	SIN INFECCIÓN
29	4	CE	Morada	RESISTENTE
69	2	SE	Anaranjada	RESISTENTE
93	2	CE	Morada	RESISTENTE
33	3	CE	Blanca-morada	MODERADAMENTE RESISTENTE
73	2	CE	Sin fruto	MODERADAMENTE RESISTENTE
90	2	CE	Morada	MODERADAMENTE RESISTENTE
106 Accesiones	-	-	-	SUSCEPTIBLES

Leyenda:

116 accesiones evaluadas.

Reacción de las accesiones a bacteriosis:

(+) Resistente.

(++) Moderadamente resistente

(+++)

(++++)

(+++++)

CE = Con Espinas.

SE = Sin Espinas.

V. DISCUSIÓN

1. Aislamiento y purificación del patógeno.

Se colectaron 51 muestras de diferentes lugares (Cuadro Nº 01), observando y anotando las características de la lesión y su desarrollo en campo.

Para la extracción de agentes patógenos de las lesiones se procedió con cuidado y con asepsia, la infección en sus etapas iniciales facilitó el aislamiento por el hecho de que los patógenos están restringidos a la zona de infección.

2. Coloración Gram.

Se preparó frotices de cada una de las muestras y se observó bajo objetivo de inmersión de un microscopio con luz incorporada, resultando microorganismos Gram Negativos de formas bacilares en la mayoría de los casos (35 muestras), los microorganismos Gram Positivos fueron descartados, después de cultivarlos en Agar Nutritivo y ser reobservados; considerando las características propias de las bacterias fitopatógenas, se iniciaron las pruebas únicamente con las 35 Cepas Gram Negativas, que fueron agrupadas en 02 grupos: Cepa 1: Xanthomonas y Cepa 2: Pseudomonas por mostrar características de crecimiento y morfología similares, incluyendo también un

Cepa 3: Levaduriforme para las pruebas de patogenicidad por su presencia en las lesiones, Cuadro N° 02.

3. Purificación de las cepas seleccionadas.

La purificación de los microorganismos fue en Agar Nutritivo, resultando ser el medio más conveniente para la multiplicación posterior, al igual que el Agar Papa Dextrosa, debido a que existe buen crecimiento en estos medios y se forman las colonias típicas.

Los microorganismos purificados se mantuvieron viables hasta por dos meses en agua destilada estéril, procedimiento comprobado y útil en el caso de bacterias fitopatógenas (French, 1980), en la práctica se observó que estas se mantienen viables e inmutables hasta por 3 meses, lo cual es conveniente para evitar la pérdida de la patogenicidad.

4. Pruebas primarias para la identificación de bacterias patógenas de plantas.

Del medio inicial de aislamiento (Agar Nutritivo), las cepas Gram Negativas incluida la cepa levaduriforme fueron cultivadas en cuatro medios de cultivo más.

El Cuadro N° 03 se muestra los resultados del crecimiento en estos medios diferenciales, considerando las propuestas de French, 1980; quien indica a estos medios (Kelman, Tetrazolio, YDCA, YPGA) como principales y generales para el estudio inicial de las bacterias en plantas. El objetivo de este estudio fue conocer el comportamiento de las cepas bacterianas en diferentes sustitutos, a fin de encontrar las variaciones de morfología en las colonias y su crecimiento antes y después de la prueba de patogenicidad en campo.

El Agar Nutritivo (AN), es útil para el aislamiento, purificación y multiplicación de bacterias en general, e este medio se puede observar las características culturales de las cepas.

El Medio Kelman (K), es útil para aislar bacterias fitopatógenas de las no patógenas, ambas cepas Gram-Negativas presentaron crecimiento y observadas al microscopio presentaron formas bacilares, la cepa de *Xanthomonas* más pequeña, en pares o solas y la cepa de *Pseudomonas* agrupadas y ligeramente mayores.

El Medio Tetrazolio (TZ), es útil para distinguir la virulencia o avirulencia y bacterias fitopatógenas en general especialmente del género *Pseudomonas*, *Xanthomonas* es inhibido por las sales de Tetrazolium al 0.02% - 0.1%, el crecimiento de las cepas virulentas es característico, forman colonias de color rosado, rojizo o rojo carmín intenso con halo blanco o transparente, la cepa de *Xanthomonas* no mostró crecimiento, mientras que la cepa de *Pseudomonas* si desarrolló, observada al microscopio presentó formas bacilares y agrupadas.

El Agar Levadura Dextrosa y Carbonato (YDCA) permitió mostrar la coloración característica de las colonias (Lelliott, 1987); la cepa de *Xanthomonas* produjo colonias amarillas, mucóide en domo con desplazamiento en el medio característico de este género, la cepa de *Pseudomonas*, produjo colonias blancas brillantes, semimucóide característico de este género.

El Agar Levadura Peptona y Glucosa (YPGA) permitió el crecimiento, coloración de las colonias y aislamiento del género *Xanthomonas* de otras contaminantes (Lelliott, 1987); la cepa de *Xanthomonas* produjo colonias amarillas, domo-convexa, mucóide y con desplazamiento en el medio característico de este género, la cepa de *Pseudomonas* produjo colonias blanca brillante, mucóide, plana-convexa.

El cultivo de de la cepas en Agar Papa Dextrosa (APD), se realizó especialmente para determinar el crecimiento de la cepa levaduriforme, en la que también crecieron las cepas de Xanthomonas y Pseudomonas, para la levaduriforme se utilizó Acido Láctico, 25 gotas para impedir el crecimiento bacteriano (French, 1980), se observó crecimiento de colonias consistentes, blanca, convexa y olor característico de levaduras.

El cultivo en Agar Tuna (AT) formulado para mostrar el crecimiento de estas cepas con los nutrientes presentes en la tuna, observándose el crecimiento de las tres cepas.

5. Prueba de patogenicidad y desarrollo de la enfermedad.

Se hizo una suspensión de las cepas cultivadas en Agar Nutritivo durante 48 horas, mediante la adición de 10 ml de agua destilada estéril a cada placa, la suspensión resultante de cada cepa fue uniformizada a densidad óptica (DO) 0.2 en un espectrofotómetro Baush & Lomb Spectronic 20 (600 nm), lo que equivale a aproximadamente 10^8 UFC/ml (Herrera, 1970, citado por Villantoy, 1990).

Para la aplicación del inóculo por la técnica de inyección que es un procedimiento sencillo de aplicar e hizo posible lograr que los microorganismos penetren al parénquima, resultando eficaz para la replicación de la sintomatología en la planta, se escogió lugares de inoculación sobre la superficie del cladodio tomando los siguientes criterios: observar la diferencia de reacción a la infección de la cara del cladodio en la que incide mayor horas de luz solar directa durante el día y la cara que menos la recibe (A/E) respectivamente y sub divididas cada una en tres tercios (Zabc: a = tercio superior; b = tercio medio; c = tercio inferior; Anexo 01, Cuadro Nº 14); la infiltración del inóculo se hizo sub epidérmicamente, observándose en el momento de inyectar la formación de un

zona humedecida en forma elíptica, que mostraba la cantidad del tejido parenquimático, alcanzado por el líquido infiltrado.

En el Cuadro N° 4, se muestra el desarrollo de la enfermedad luego de la inoculación de los Bacilos Gram Negativos y la cepa levaduriforme, estas muestran los primeros síntomas visibles entre los 3 a 10 días, expresándose totalmente hasta los 30 días, en general las lesiones producidas por la inyección se producen en forma de abultamiento, iniciándose con un color amarillo, poco después se vuelven de color marrón oscuro, con bordes definidos o algo difusos irregulares, siendo mayor el abultamiento después de un periodo de tiempo, esta se localiza y limita sólo al lugar de inoculación.

Con la cepa de Xanthomonas, se logró reproducir las ampollas características, que también se observan en condiciones naturales, las ampollas marrones no se expanden y quedan restringidas a su zona, pero con el tiempo esta necrosis llega a traspasar el cladodio, en especial cuando se desarrollan conjuntamente con la cepa levaduriforme, al nivel de campo es posible encontrar ampollas regulares con cierta clorosis en las cloquideas del cladodio con exudados abundantes, lo que se encuentra también en la infección experimental, observándose los primeros síntomas entre los 2 y 3 días, iniciándose con una ligera clorosis, abultamiento que se va incrementando, cambio de color a marrón oscuro por la pudrición de tejido, entre los 7 a 10 días se observa sequedad de la zona infectada, hundimiento y un posterior rompimiento de la epidermis que deja un leve hoyo en el tejido del cladodio.

Se observó el desarrollo de la infección con inóculos en conjunto de la cepa de Xanthomonas y levaduriforme (Cuadro N° 4), la sintomatología aparece entre los 3 a 5 días, produciendo abultamiento de coloración marrón intensa, entre los 8 y 11 días, producen rotura del tejido con eliminación de exudado que

al secarse es de coloración blanquecina, el tejido presenta hundimiento y sequedad.

Con la cepa de *Pseudomonas*, se logró reproducir las ampollas características, que también se observan en condiciones naturales, las ampollas marrones no se expanden y quedan restringidas a su zona, con el tiempo ésta necrosis llega a traspasar el cladodio; cuando esta en conjunto con la cepa levaduriforme, con la diferencia que en este caso a nivel de campo se encuentran ampollas irregulares, ya sea por desigual invasión de tejido o porque algunas rejunten o posiblemente por algún atributo del microorganismo, se observó los primeros síntomas a los 5 días, iniciándose con un ligero abultamiento con irregularidades que van incrementándose, cambio de color a marrón oscuro, la expresión total superficial se da entre los 15 a 30 días donde se observó sequedad de la zona infectada, hundimiento y un posterior rompimiento de la epidermis que deja un hueco en el tejido del cladodio.

El inóculo de la cepa de *Pseudomonas* y la cepa levaduriforme desarrollaron la enfermedad con mayor intensidad, produciendo los primeros síntomas a los 3 a 5 días, abultamiento irregular y coloración intensa, entre los 8 a 11 días produce rotura de la epidermis con eliminación de abundante exudado, sequedad, hundimiento y formación de hueco que traspasa todo el cladodio.

La cepa levaduriforme, desarrollo la enfermedad, mostrando los primeros síntomas a los 3 días, con formación de abultamiento, decoloración de la superficie inoculada y luego coloración marrón intensa, sequedad, hundimiento, rotura de tejido y liberación de exudado a partir de los 8 días. Al nivel de campo la sintomatología de esta cepa está relacionada a la pudrición total de cladodio en conjunto con bacterias bacilares Gram Positivas oportunistas, de manera similar los síntomas se restringen a pequeñas zonas de tejido.

La infección experimental con las cepas en los cladodios de diferentes edades (Cuadro N° 06), muestra diferencia estadísticamente significativa en el desarrollo de la enfermedad (Cuadro N° 18 y 19, Anexos 05 y 06), observándose que los cladodios de 0.5 años son menos susceptibles a la enfermedad, mientras los cladodios de 1 o 2 años la desarrollan con mayor frecuencia pero ofreciendo cierta resistencia al desarrollo completo de la enfermedad.

Esta misma reacción de los cladodios de uno y dos años de edad en condiciones de campo reporta Barrantes 1980, a veces es posible encontrar cladodios menores de un año de edad, con infecciones más amplias; en base a esto puede afirmarse que la susceptibilidad de la planta es mayor en la parte superior y escasa o nula en las partes inferiores

Juscamaita (1992), concluye que la inoculación en pencas jóvenes de uno y dos años de edad permite mayor intensidad de los signos de la enfermedad, que en pencas de tres años de edad, además que el tercio medio y superior del cladodio son más susceptibles a la infección y donde mejor se desarrollan los síntomas de la enfermedad.

El estudio de la interacción de las variables lugar de inoculación en el cladodio y las cepas (A = "haz" cara con mayor incidencia de luz solar directa; E = "envés" cara con menor incidencia de luz solar directa del sol), los datos de campo (Cuadro N° 7), muestran una diferencia en el desarrollo de la enfermedad entre el "haz" y el "envés".

Según estos resultados en todos los cladodios inoculados en el "haz" el desarrollo de los síntomas es más rápido y claro; mientras que en el "envés" los síntomas aparecen pero con lentitud. Es probable que estas bacterias necesiten temperaturas altas a nivel de campo para desarrollar signos claros e intensos.

También es posible que tenga influencia en el desarrollo de la enfermedad el hecho de que todas las plantas xerofíticas tienen la capacidad de retener calor en sus tejidos por acción de los rayos solares, que generalmente alcanzan temperaturas, con varios grados más respecto a la temperatura del aire, es decir, si en el ambiente la temperatura tiene 24°C, en las pencas llega de 28 a 32°C (Pimienta, 1990).

La aplicación de suspensiones de las cepas en cada tercio de los cladodios (Cuadro N° 8), mostraron en general que los tejidos más tiernos o ubicados más hacia el ápice de la penca, son más susceptibles para el desarrollo de los signos (tercio superior y medio), en el tercio inferior, el desarrollo de las ampollas se ve restringida, posiblemente porque en esta parte hay mayor lignificación de tejidos y menor cantidad de nutrientes, incluido el agua sin embargo se comprueba que toda la superficie de la penca es susceptible ya sea con volúmenes altos o bajos, estadísticamente existe diferencia significativa entre las zonas de inoculación (Cuadro N° 16 y 17, Anexos 03 y 04).

En los Cuadros N° 18 y 19 (Anexos 05 y 06), se muestra la diferencia existente entre el grado de daño al hospedador por las dos cepas bacterianas, la cepa levaduriforme y la mezcla entre la cepa de *Xanthomonas* + cepa levaduriforme y la cepa de *Pseudomonas* + cepa levaduriforme, las cepas de *Xanthomonas* y de *Pseudomonas* no muestran diferencia significativa en su efecto, siendo menor a las producidas por la cepa levaduriforme, la mezcla de cepa de *Xanthomonas* + cepa levaduriforme y la cepa de *Pseudomonas* + cepa levaduriforme.

En base a estos datos se comprobó la alta capacidad de infección que tienen independientemente las cepas bacterianas Gram Negativas de cepa de *Xanthomonas* y *Pseudomonas* en conjunto con la cepa levaduriforme, puesto que causan la aparición de signos con rapidez y causan mayores efectos en el hospedador, es importante indicar que mayor volumen o cantidad de patógenos causan signos más rápidamente y con más claridad.

7. Caracterización bioquímica (Test LOPAT).

Una vez producida la enfermedad experimentalmente en el campo, fue fácil la recuperación de las cepas bacterianas y levaduriforme, comprobándose a través del cultivo, la coloración Gram y sus características típicas; es decir, tales bacterias estaban asociadas con las lesiones características de la enfermedad.

Los resultados obtenidos (Cuadros N° 3 y 9), nos permite agrupar de manera primaria a las bacterias fitopatogenas, de acuerdo a los medios diferenciales y pruebas bioquímicas: la Cepa 1 pertenece al Género *Xanthomonas*, la Cepa 2 al Grupo de *Pseudomonas* Fluorescentes. Con respecto a la Cepa levaduriforme, se hicieron las pruebas de crecimiento y Agar Papa Dextrosa (APD), APD + Ácido Láctico, para observar sus características culturales y el cultivo en Agar Harina Maíz durante 30 días, no observándose esporulación ni formación de su fase miceliar, lo que impidió su identificación.

Las pruebas que permiten verificar al Género *Xanthomonas*, es la Oxidasa positiva, Catalasa positiva, movilidad, su crecimiento es inhibido por 0.1% de Triphenyl Tetrazolium Chloride (Medio Tretrazolio), el crecimiento mucoso abundante y fluido en el medio YDCA, y la coloración amarillenta brillante característica en el medio YPGA, con producción de pigmento amarillento no difusible (*Xanthomonas*, cuya identificación química permite determinar la especie conjuntamente con otras pruebas) (Klement, 1990).

De igual modo las pruebas que permiten verificar al Género *Pseudomonas* es la Oxidasa positiva que es una característica también de esta bacteria, al igual que la Catalasa positiva, producción de pigmento amarillo-verde difusible fluorescente a la luz UV. (Fluoresceína) en medio King B.

El Test LOPAT propuesto por Lelliott y col. (1966), permite agrupar las bacterias fitopatógenas del Grupo *Pseudomonas* Fluorescentes, en Grupos bacterianos, Género y Especie, mas no en *patovares*, sometiéndolas a 5 pruebas.

En los Cuadros N° 10, 11 y 12 se observan los resultados de las pruebas del Test LOPAT presuntivo.

Es importante la Hidrólisis de Arginina, la prueba de Actividad Pectolítica en la "papa" y la Hipersensibilidad del Tabaco caracterizan también a este género. Para la prueba de Hipersensibilidad no se consiguió plántulas de "tabaco", en su lugar se utilizaron plántulas de "tomate" entre 25 y 30 días de edad sin inconvenientes (Lelliott, 1987).

Estas pruebas nos permitieron clasificar a la cepa de *Pseudomonas* en: "LOPAT (+ + + + -) Grupo IVa, probable especie *Pseudomonas marginalis* u otros miembros pectolíticos de *Pseudomonas fluorescens*".

Este trabajo pretende dar las primeras informaciones y comprobar los aspectos básicos de su metabolismo y a través de diversas pruebas predeterminadas es posible llegar con bastante aproximación a establecer el Género y la especie probable; sin embargo llegar a especie requiere de pruebas mucho más específicas y comparaciones múltiples entre los diversos géneros y especies bacterianas que se tiene hoy en día, incluso para llegar al *patovar*, la caracterización bioquímica sólo se dedica a identificar el Género en el caso de

El método actual más efectivo para el control de esta enfermedad y otras asociadas, son las podas de saneamiento de partes infectadas en forma oportuna de la planta de "tuna", reduce la tasa de multiplicación y el uso de semilla-penca sana, con practicas culturales adecuadas (Villanoy, 2000).

9. Factores Ambientales y Ciclo Patológico propuesto.

Los datos de los factores ambientales tomados se muestran en el Cuadro N° 21 (Anexo 08) se observa el análisis físico químico del suelo de la localidad de Huanchac en donde se ubica el Banco de Germoplasma de "tuna" del INIA, así como los datos meteorológicos de la misma estación (Cuadro N° 22, Anexo 09), ya que es en este lugar donde se realizó las evaluaciones para relacionar las enfermedades bacterianas de "tuna" con las variables ambientales exógenas.

El pH del suelo en general en la región es neutro lo que en algunos casos favorece el establecimiento de patógenos a ese nivel, la disposición de nutrientes biodisponibles es media no habiendo deficiencias ni exceso para el cultivo de la "tuna" en este sector, pero que la carencia de algún nutriente importante en otras áreas podría provocar la vulnerabilidad a esta enfermedad u otras.

La disponibilidad de agua es un factor esencial en todo altivo, en el caso de la "tuna" especie xerofítica tiende a la resistencia en épocas de secano, el agua en este aspecto esta más relacionado a la propagación de la enfermedad, ya que las lluvias dispersan los exudados que contienen patógenos hacia las partes bajas o por salpicadura a otras áreas sanas , en las cuales pueden haber heridas o establecerse en aberturas naturales de la planta a la espera de condiciones favorables, o el arrastre del suelo hacia otras plantaciones, ya que algunos fitopatógenos permanecen latentes en el suelo en forma no patógena

hasta encontrar las condiciones favorables y reactivan su virulencia en la planta especialmente las *Pseudomonas* (French, 1980).

Los vientos e insectos juegan también un papel fundamental en el transporte de enfermedades en las plantas, el viento al dispersar gotitas suspendidas en el aire que contienen patógenos provenientes de exudados, los insectos que por su naturaleza o ciclo biológico tiene contacto con partes de la planta infectadas las dispersa a otras sanas (Barrantes, 1998).

Las actividades culturales que realiza el hombre en el campo, si no tienen el mayor cuidado en el manejo de podas y cosechas, es un factor también de transmisión de patógenos, para el cual se tiene que tener mucho cuidado en la limpieza de sus herramientas, en la disposición final de partes infectadas o plantas completas.

Villantoy (2000), dice que bajo condiciones de altas precipitaciones la enfermedad conocida como “yana pususo”, causado por una bacteria (*Pseudomonas sp*), esta enfermedad produce manchas irregulares de color marrón claro a oscuro, casi siempre acompañado de exudados de látex, cuando las condiciones son favorables a la enfermedad produce muerte total de los cladodios, afecta a las plantaciones con y sin espinas desde los 2,200 hasta los 3,100 m.s.n.m., siendo los mayores daños a altitudes de 2,300 m.s.n.m.

Los cultivos aledaños en plantaciones pueden ser portadores o reservorios de patógenos potenciales para las especies cultivadas como “tuna”. No solo debemos percatarnos de las especies silvestres y malezas presentes en el campo, sino también es necesario conocer los cultivos tradicionales asociados y de rotación, pueden ser o no hospedantes de estos patógenos. Se ha encontrado que la especie silvestre con mayor presencia en los campos naturales de “tuna” es la “malva” y el “huarango”. Se requieren hacer mayores

estudios para determinar si existe relación con otras especies de plantas silvestres y cultivares asociados con la producción de la enfermedad.

Villantoy (1990), menciona que en el Perú existen una gran variabilidad de especie nativas de malezas que crecen comúnmente junto con cultivos, de las cuales deben efectuarse estudios sobre manejo con el fin de involucrarlas en nuevos trabajos de rango de hospedantes de *Pseudomonas* patógenas.

Finalmente, la observación del desarrollo de la enfermedad al nivel de campo en praderas naturales y de cultivos de "tuna" y de la infección experimental, confrontada con los factores exógenos y endógenos nos llevó a proponer un *Ciclo Patológico* de la enfermedad, resumida en la Figura N° 8 (Anexo 16).

La disección de los tejidos afectados muestran que la infección se desarrolla de adentro hacia fuera, se forma una infección interna que crece a lo ancho y largo del parénquima que en algunos casos abarca una gran porción hasta que aparecen los primeros signos visibles, los signos superficiales aparecen como un pequeño punto marrón con un halo aceitoso, posteriormente forma un abultamiento de forma circular regular e irregular de coloración marrón claro a oscuro (mancha marrón), que con el tiempo producen rompimiento del tejido y en algunos casos eliminan exudado, posteriormente dejan cicatrices o huecos observándose casos en que las cicatrices alcanzan una gran área de cladodio dependiendo de los factores climáticos, que impiden la implantación de la "cochinilla".

Es posible, aunque no común, que en las plantas adultas una infección bacteriana que se produzca en cualquiera de los órganos de la planta avance internamente a través de la mayor parte de ella y la destruya totalmente. En

general, participan varias infecciones, incluso a ellas se debe la muerte de una parte o de toda la planta (Agrios, 1998).

En las manchas y tizones bacterianos, la diagnosis habitual de la enfermedad se basa en la morfología de los síntomas y en la ausencia de hongos patógenos y la presencia de bacterias en los tejidos recién infectados. La diferencia microscópica entre estos patógenos es imposible, como lo es para todas las bacterias fitopatógenas (Agrios, 1998).

La penetración de los patógenos se realiza generalmente por aberturas naturales, estomas, hidátides de la planta cuando se dan las condiciones ambientales particulares para una penetración efectiva que es mucho más difícil de obtener en condiciones experimentales, o por heridas causadas por diversos factores. En relación a esto podemos confirmar cuando realizamos la técnica de inyección de suspensiones causando una herida y resultando posteriormente en el desarrollo de la enfermedad a comparación de las aspersiones realizadas con las mismas suspensiones con las cuales no se consiguió el mismo resultado.

Las bacterias requieren de una herida para penetrar a los tejidos, tal como ocurren con los géneros *Erwinia*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* y *Agrobacterium* (MANNERS, 1986); de este modo las pruebas de patogenicidad resultan más viables y rápidas cuando se provocan heridas en el tejido durante la inoculación.

Las bacterias invernan sobre los órganos sanos o infectados de las plantas perennes, sobre las semillas, sobre los restos de plantas infectadas, sobre recipientes o herramientas contaminados y sobre el suelo. Su diseminación desde el lugar donde invernan hasta sus hospederos y de planta a planta se lleva a cabo por medio de la lluvia, la lluvia salpicada y llevada por el viento, por contacto directo con el hospedero, insectos tales como moscas, abejas y hormigas, por medio de la manipulación de plantas y herramientas, etc. La penetración de las bacterias se efectúa a través de aberturas naturales y

heridas y la invasión casi siempre es intercelular a través de tejidos parenquimatosos. El agua que humedece a los tejidos durante las lluvias fuertes favorece la penetración e invasión de las bacterias. Las células del hospedante son invadidas después de que se degrada parte de su pared celular, supuestamente debido a las pectinasas y celulasas (Agrios, 1998).

VI. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se ha llegado a las siguientes conclusiones:

1. Los agentes patógenos relacionados a la enfermedad conocida como “yana pususo” o “mancha marrón” en *Opuntia spp.* “tuna” son bacterias bacilares Gram Negativas de los Géneros *Xanthomonas* y *Pseudomonas* (LOPAT (+ + + + -), Grupo IVa, especie probable *Pseudomonas marginalis* o miembros pectolíticos de *P. fluorescens*. Se encontró también una levadura asociada a estas bacterias que no pudo ser identificada.
2. La infección experimental y observación en campo muestran que en el desarrollo de la enfermedad las bacterias ingresan por heridas o aberturas naturales en la planta, estableciéndose en los espacios intercelulares del parénquima, luego ingresan a las células en las cuáles se multiplican, causando necrosis; abarcando un desarrollo interno, que luego aflora hacia la superficie del cladodio en forma de un pequeño punto marrón claro a oscuro, de crecimiento constante de formas regulares (*Xanthomonas*) e irregulares (*Pseudomonas*) con un abultamiento constante, entre los 10 a 30 días al reventar liberan exudado, causando sequedad y hundimiento en el tejido dejando cicatrices y en casos más graves huecos en el cladodio (asociación de *Pseudomonas* y levadura). La mayor virulencia y liberación de exudado esta acentuada por la presencia de una levadura. La reinfección e

infección se producen por la dispersión de los factores exógenos como el agua, vientos, insectos, heridas al cosechar el fruto y a través de labores culturales. En condiciones de campo la enfermedad afecta de igual manera a los diferentes morfotipos de “tuna”, mostrando algunas accesiones cierta resistencia.

3. Las variables ambientales endógenas y exógenas tienen relación directa con el desarrollo de la enfermedad, los cladodios de 1 – 2 años son más susceptibles que las de 0.5 años de edad; la temperatura respecto a la incidencia de los rayos solares también es una variable que acelera la aparición de los síntomas, en el “haz” es mayor que en el “envés”; en general toda la superficie del cladodio es susceptible de ser infectada y desarrollar la enfermedad, pero son más susceptibles los tercios superior y medio; la cantidad de inóculo de patógenos es indiferente en la producción de síntomas de la enfermedad mostrando los mismos efectos a volúmenes de 0.1 y 0.5 ml (concentración de 10^8 UFC/ml).

VII. RECOMENDACIONES

1. Determinar los índices de afectación de esta enfermedad en los cultivos de "tuna" silvestres y manejados, y si tiene mayor significado económico.
2. Investigar en los sistemas de cultivo, la presencia de accesiones resistentes que puedan ser explotados económicamente.
3. Buscar alternativas de control de la enfermedad o mejorar las ya existentes a nivel de laboratorio y de directa aplicación en el campo.
4. Se sugiere continuar la determinación de las cepas bacterianas hasta patovar así como la cepa levaduriforme.
5. Determinar en mayor detalle los factores de transmisión y diseminación de los patógenos.
6. Determinar los hospederos alternantes como reservorio de estas bacterias.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Agrios, G.** 1998. Fitopatología. 2da. Ed. Editorial Uteha. México.
2. **Barrantes, F.** 1985. Enfermedades de la tuna en Ayacucho. Informe de Investigación. Revista del Instituto de Investigación. Fac. Cs. Agra. 1980-1989. UNSCH. Ayacucho-Perú.
3. **Barrantes, F.** 1998. Enfermedades de la tuna (*Opuntia ficus indica*) causas epifitológicas y control. Informe de Investigación. Fac. Cs. Agra. UNSCH. Ayacucho-Perú.
4. **De La Cruz, J.** 1991. Frutales Silvestres de la Provincia de Huamanga. Informe de investigación. Fac. Cs. Bs. UNSCH. Ayacucho-Perú.
5. **Estudios.** 1985. Revista Técnica de Actualidad y Análisis. N° 5. Centro de Estudios para el Desarrollo. Ayacucho – Perú.
6. **French, R. y Hebert, T.** 1982. Manual de Investigación Fitopatológica. IICA. San José-Costa Rica.
7. **Gola, G.** 1965. Tratado de Botánica. Editorial Labor S.A. Barcelona, España.
8. **Juscamaita, V.** 1991. Identificación de la Etiología Bacteriana del “yana pususo” e infección experimental en *Opuntia ficus indica*. Tesis – UNSCH. Fac. Cs. Bs. Ayacucho- Perú.
9. **Klement, Z.; Rudolph, K. and Sands, D.** 1990. Methods in Phytobacteriology. Edit. Akadémiai Kiadó. Budapest, Hungría.
10. **Lara, T.** 1993. Identificación de hongos patógenos en la tuna. Tesis – UNSCH. Fac. Cs. Bs. Ayacucho- Perú.
11. **Lelliot, R. and Stead, D.** 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. Volumen 2. Ministerio de Agricultura. Londres, Inglaterra.
12. **Manners, J.** 1980. Introducción a la Fitopatología. Edit. Limusa S.A. México D.F.

ANEXOS:

ANEXO N° 03

**Cuadro N° 16.-Análisis de variancia de la interacción de los factores:
Lugar de inoculación/ Cepas/Zona de inoculación, de resultados
cuantitativos de la disección de cladodios enfermos de “tuna” *Opuntia spp.*
infectados experimentalmente. Ayacucho 2001 – 2002.**

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	C.M.esperado	Fc	Fa	Significancia
A	1.0	3.0	3.0	CMA/CMAB	0.18	7.71	
B	4.0	256.4	64.1	CMB/CMD	2.55	2.43	S.
C	2.0	448.1	224.0	CMC/CMBC	5.88	4.46	S.
AxB	4.0	68.0	17.0	CMAB/CMD	0.68	2.43	
AxC	2.0	1.1	0.5	CMAC/CMABC	0.14	4.46	
BxC	8.0	305.1	38.1	CMBC/CMD	1.52	2.00	
AxBxC	8.0	30.6	3.8	CMABC/CMD	0.15	2.00	
Dentro Tx	150.0	3,770.6	25.1				

a = "haz"/"envez"

b = CEPAS

c = Zona de inoculación (a, b, c)

$\alpha = 0.05$

Fmaxc 4.0

Fmaxa 8.1

* Variancias homogeneas

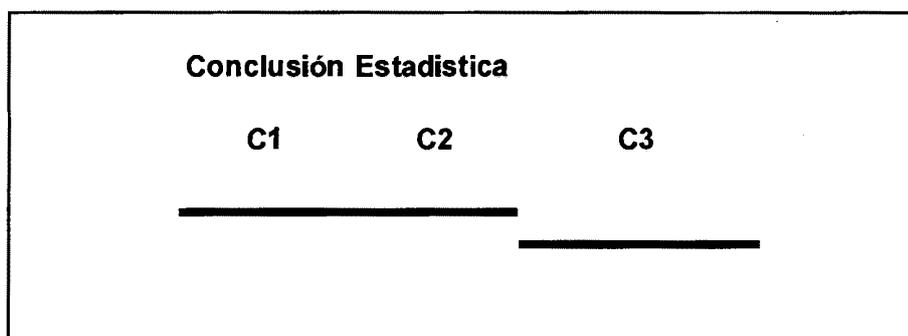
ANEXO N° 04

Cuadro N° 17.- Prueba de Fisher de las medias del factor: Zona de infección. Ayacucho 2001 – 2002.

$$|Y_1 - Y_2| \geq t_{\alpha/2, a(n-1)} \sqrt{2CMD/n}$$

Cepas	C1	C2	C3
Media	6.0	5.77	2.54

		C2	C1
		5.77	6.00
C3	2.54	3.23	3.46 **
C2	5.77		0.23
	T0.025	177.00	0.92
		1.960	0.92
			1.79



ANEXO N° 05

**Cuadro N° 18.- Análisis de variancia de la interacción de los factores:
Volumen de inóculo/ Cepas/Edad del cladodio, de resultados cuantitativos
de la disección de cladodios enfermos de “tuna” *Opuntia spp.* infectados
experimentalmente. Ayacucho 2001 – 2002.**

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	C.M. esp.	Fc	Fa	Significancia
A	1.0	169.4	169.4	CMA/CMAB	6.022	7.71	
B	4.0	256.4	64.1	CMB/CMD	2.493	2.43	S.
C	2.0	146.2	73.1	CMC/CMBC	2.440	4.46	
AxB	4.0	112.5	28.1	CMAB/CMD	1.094	2.43	
AxC	2.0	12.8	6.4	CMAC/CMABC	0.574	4.46	
BxC	8.0	239.7	30.0	CMBC/CMD	1.165	2.00	
AxBxC	8.0	89.0	11.1	CMABC/CMD	0.433	2.00	
Dentro Tx	150.0	3,856.7	25.7				

a = Volum. inóculo mi

b = CEPAS

c = Edad del cladodio

$\alpha = 0.05$

Fmaxc 3.5

Fmax α 8.1

* Variancias homogéneas

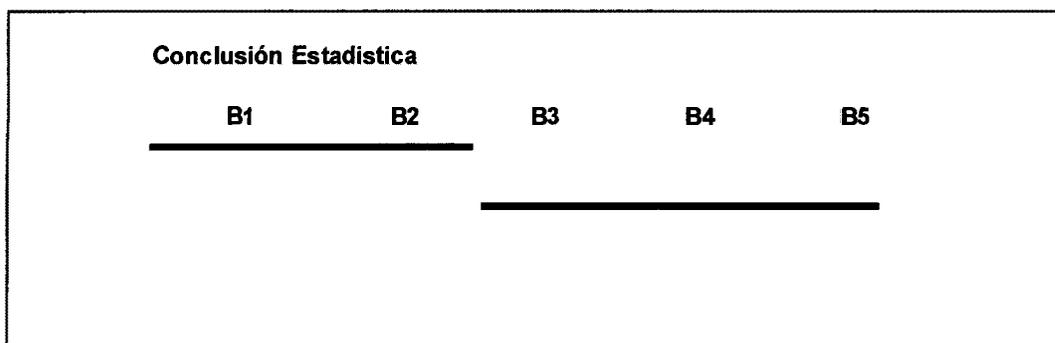
ANEXO N° 06

**Cuadro N° 19.- Prueba de Fisher de las medias del factor: Cepas.
Ayacucho 2001 – 2002.**

$$|Y_1 - Y_2| \geq t_{\alpha/2, a(n-1)} \sqrt{2CMD/n}$$

Cepas	Cepa 1	Cepa2	Cepa3	Cepa 1+3	Cepa 2+3
Media	3.70	3.74	4.26	6.87	5.29

		Cepa2	Cepa3	Cepa 2+3	Cepa 1+3
		3.74	4.26	5.29	6.87
Cepa 1	3.70	0.04	0.56	1.58	3.17 *
Cepa2	3.74		0.52	1.54	3.13 *
Cepa3	4.26			1.02	2.61 *
Cepa 2+3	5.29				1.58
		T0.025	175.00	1.20	
			1.960	1.20	
				2.34	



ANEXO N° 07

Cuadro N° 20.- Resultados de campo de la evaluación de reacción a bacteriosis de los diferentes morfotipos de "tuna" *Opuntia spp.* en el Banco de Germoplasma del INIA - Huanchacc 2,380 m.s.n.m. Ayacucho 2001-2002.

N° Acces.	N° Ptas	Caract	Color Fruta	REACCIONA LA ENFERMEDAD				
				14/08/02	01/08/02	15/08/02	29/08/02	09/10/02
1	4	CE	Anaranjada	++++	++	++	+++	+++
2	4	CE	Morada	++	++	+++	++	++
3	4	SE	Blanca	++	++	++	++	++
4	4	CE	Blanca	++++	+++	+++	++	+++
5	4	CE	Morada	++++	++++	++++	++++	+++
6	4	CE	Blanca	++++	++	+++	++	++
7	4	CE	Blanca - Rosada	+++	++	+++	+++	+++
8	4	CE	Blanca-Morada	++++	++++	+++	++	+++
9	4	CE	Sin fruto	+++	++	++++	+++	++++
10	4	CE	Anaranjada	++	++	++	++++	+++
11	4	SE	Anaranjada	+++	+++	+++	++++	+++
12	4	CE	Morada	+++	+++	++++	++++	++++
13	4	CE	Blanca	+	+++	++	++	++
14	4	SE	Blanca	++++	+++++	+++++	+++	+++
15	4	SE	Blanca	+++	++	+++	+++	+++
16	4	SE	Morada	+++	++	+++	+++	+++
17	4	CE	Anaranjada	+++	+++	++++	+++	++++
18	4	CE	Anaranjada	+++	+++	+++	+++++	++++
19	2	CE	Blanca	+++	++	+++	+++	++++
20	6	CE	Morada	+++	+++	+++	+++	+++
21	4	CE	Morada	+	++	+++	+++	+++
22	4	SE	Blanca	+++	++++	++++	+++++	+++++
23	4	SE-CE	Anaranjada	+++	+++	++++	++++	+++
24	4	CE	Anaranjada	++	+++	+++	++	+++
25	4	CE	Sin fruto	++	++	++	++	+
26	4	CE	Morada	+	+	++	++	+++
27	4	CE	Blanca	++	+	++	++	+
28	4	CE	Blanca	+++	+	+++	++	+++
29	4	CE	Morada	+	+/-	+	+	+
30	4	SE	Anaranjada	+++	++	+++	+++	++++
31	3	CE	Anaranjada	++	+	++++	+++	+++
32	4	CE	Anaranjada	+	++	+++	++	+++
33	3	CE	Blanca - Morada	+	+	+	++	++
34	4	CE	Morada - Rosada	++	++	++	+++	+++
35	4	SE	Blanca	+++	+++	++	+++	++++
36	2	CE	Blanca	+++	++	+++++	+++++	+++++
37	2	CE	Anaranjada	++++	++	+++	+++	+++
38	2	CE	Blanca - Rosada	+++	+++	++++	+++++	+++++
39	2	CE	Blanca	+	++	+/-	+++	+++
40	2	SE	Morada	+++	++	+++	+++	+++
41	2	CE	Blanca	++++	++++	+++++	+++++	++++
42	2	CE	Blanca	++	++	+++	+++	++
43	2	SE	Anaranjada	+++	++	+++	++++	+++
44	2	SE	Morada	++	++	++++	++++	+++++
45	2	SE	Blanca	++	++	+++	+++	++
46	2	CE	Anaranjada	+++	++	++++	++++	+++
47	2	SE	Morada	++	+++	+++	+++	+++
48	2	CE	Anaranjada	+++	++	+++	++++	+++
49	2	CE	Blanca	++	+	++	+++	++++
50	2	CE	Morada	+++++	+++++	+++++	++++	+++++
51	2	SE	Blanca	++	++	+	+++	+++
52	2	SE	Anaranjada	++	++	++	++	+++
53	2	CE	Blanca	+++	++++	+++	+++	++++
54	2	SE	Anaranjada	+++	+	++++	+++	++
55	2	CE	Anaranjada	+++	++++	+++	+++	+++
56	2	SE	Anaranjada	++++	+++++	+++++	+++	++++

...continuación del Cuadro N° 20.

57	2	SE	Anaranjada	+++	+++	+++	++++	++++
58	2	SE	Anaranjada	+++	+++	+++	+++	++++
59	2	SE	Anaranjada	+++	++	++	+++	++++
80	2	SE	Anaranjada	+++	++	+++	++++	++++
61	2	SE	Anaranjada	+++	+++	++	+++	++++
62	2	SE	Anaranjada	+++	++	+++	++++	+++
83	2	SE	Anaranjado	+++	++++	+++	+++++	+++++
64	2	SE	Anaranjada	+++	++	+++	++++	++++
85	2	SE	Anaranjada	++	++	+++	+++	+++
66	2	SE	Morada	++	++	++	++	+++
67	2	SE	Morada	++	+	++	++	++
68	2	SE	Anaranjada	+++	+++	+++	++++	+++
69	2	SE	Anaranjada	++	+	+	++	++
70	2	CE	Anaranjada	+++	++	++	+++	+++
71	2	SE	Morada	++	+++	++	++++	++++
72	2	SE	Morada	++	++	++	+++	+++
73	2	CE	Sin fruto	+	+/-	+/-	+	++
74	2	SE	Anaranjada	++	+++	++++	++++	++++
75	2	SE	Blanca	++++	++++ -	+++	+++	+++
76	2	SE	Blanca	+	+	++	++	+++
77	2	SE	Blanca	++++	++++	+++	+++++	++++
78	2	SE	Anaranjada	+++++	+++	++++	+++++	+++++
79	2	SE	Morada	++	++	+++	+++	+++
80	2	SE	Morada	++	++	++	++	+++
81	2	CE	Anaranjada	++	++	+	++	+++
82	2	SE	Morada	+++	++	++	++	++
83	2	SE	Anaranjada	++++	+++	+++	+++	+++
84	2	SE	Anaranjada	+++	++	+++	++	++
85	2	SE	Sin fruto	++	++	++	+++	++
86	2	CE	Sin fruto	++++	++++	+++	+++	+++++
87	2	CE	Blanca	++++	++++	+++	+++++	+++++
86	2	CE	Blanca	++++	++++	++++	+++++	++++
89	1	CE	Sin fruto	++	++	++	++++	+++
90	2	CE	Morada	+	+/-	+/-	++	++
91	2	CE	Blanca	++	+	+	+++	++
92	2	CE	Sin fruto	+++	+++	+++	++++	+++
93	2	CE	Morada	+	+	+	++	+
94	2	CE	Blanca	+++	+++	+	++++	++
95	2	SE	Anaranjada	++	++	+	++	++
96	2	SE	Anaranjada	++	++	++	+++	++
97	2	SE	Morada	+	+	++	++	++
98	2	CE	Morada-Anaranj	+++	+++	++	++++	+++
99	2	CE	Blanca	++	++	++	++	+++
100	2	CE	Sin fruto	++	++	+	++	+
101	2	CE	Anaranjada	++++	++++	+++++	+++++	+++++
102	2	CE	Sin fruto	+++	+++	+++	+++	+++
103	2	CE	Blanco-Morado	++	++	++	++	++
104	2	SE	Blanca	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++
105	2	SE	Morada	+	+	++++	++++	++++
106	2	CE	Sin fruto	+++	+++	+++	+++	+++
107	2	SE	Sin fruto					
108	2	SE	Sin fruto					
109	2	SE	Sin fruto	+++	+++	++++	++++	++
110	2	SE	Anaranjada	++	+++	++++	++++	+++++
111	2	SE	Anaranjada	+++	++++	++++	++++	++++
112	1	SE	Anaranjada	+	++	+++	+++	++++
113	2	CE	Blanca	+++	+++	++++	++++	+++++
114	2	CE	Morada	+++	++++	++++	+++++	+++
115	1	SE	Sin fruto					
116	1	CE	Sin fruto					

Leyenda:

Reacción de las accesiones a bacteriosis.

- (+) Resistente.
- (++) Moderadamente resistente
- (+++)
- (++++)
- (+++++)
- CE = Con Espinas.
- SE = Sin Espinas.

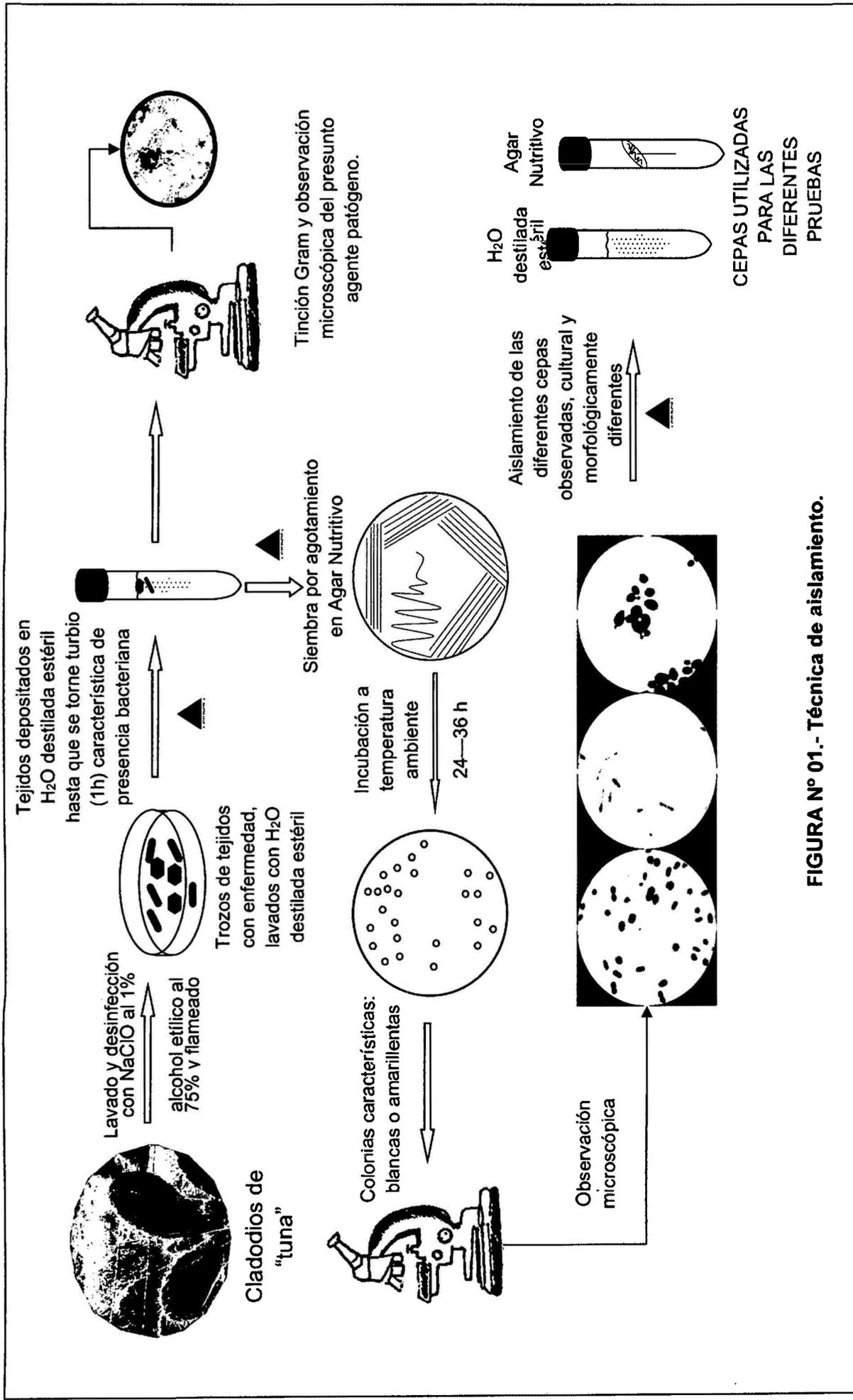


FIGURA Nº 01.- Técnica de aislamiento.

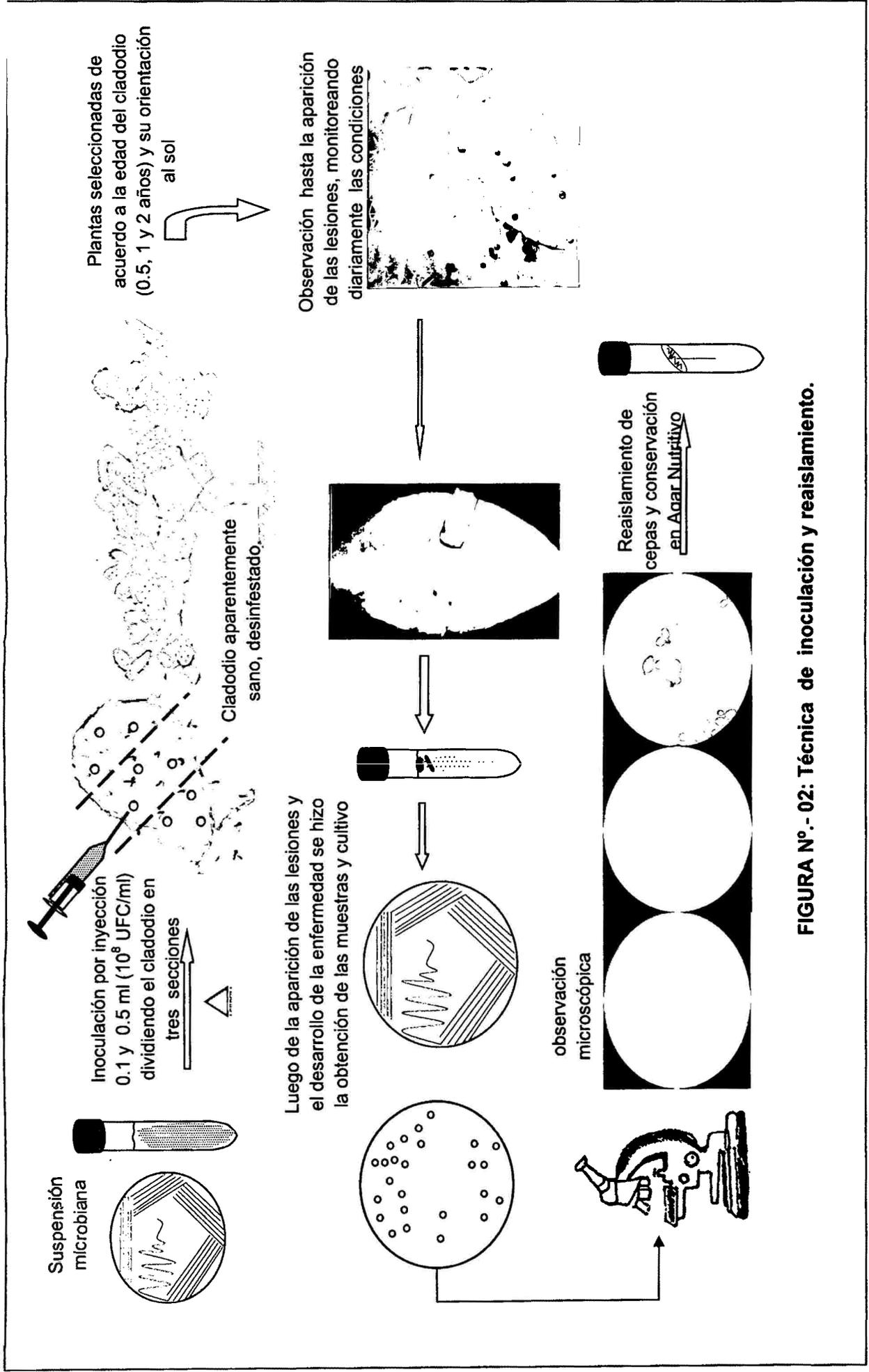


FIGURA Nº.- 02: Técnica de inoculación y reislamiento.

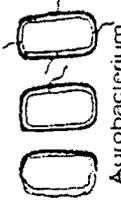
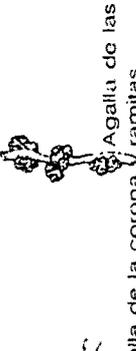
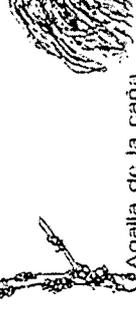
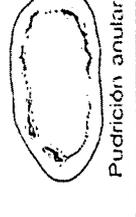
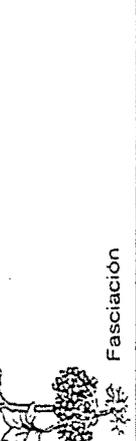
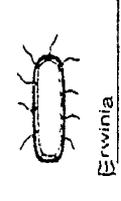
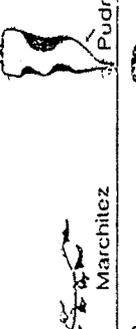
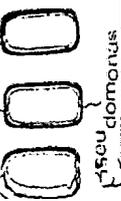
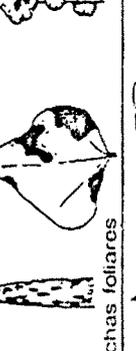
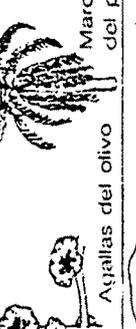
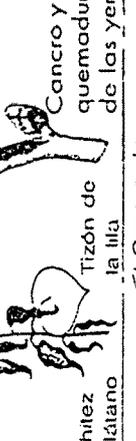
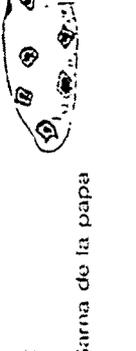
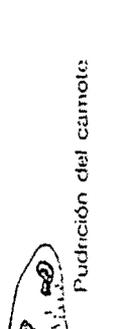
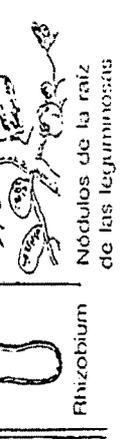
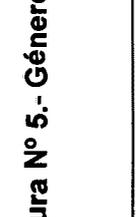
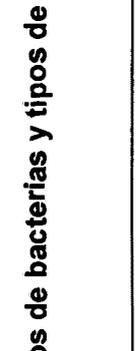
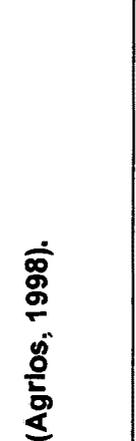
 <p>Agrobacterium</p>	 <p>Agalla de la corona</p>	 <p>Agalla de las ramitas</p>	 <p>Agalla de la caña</p>	 <p>Raiz pilosa</p>
 <p>Corynebacterium</p>	 <p>Pudrición anular de la papa</p>	 <p>Cancro y marchitez del tomate</p>	 <p>Mancha del fruto</p>	 <p>Fasciación</p>
 <p>Erwinia</p>	 <p>Tizón</p>	 <p>Marchitez</p>	 <p>Pudrición blanda</p>	 <p>Cancro y quemaduras de las yemas</p>
 <p>Pseudomonas</p>	 <p>Manchas foliares</p>	 <p>Manchas foliares</p>	 <p>Marchitez del plátano</p>	 <p>Tizón de la lila</p>
 <p>Xanthomonas</p>	 <p>Sarna de la papa</p>	 <p>Ennegrecimiento de nervaduras</p>	 <p>Pudrición del esqueje</p>	 <p>Cancro de los cítricos</p>
 <p>Streptomyces</p>	 <p>Pudrición del camote</p>	 <p>Pudrición del bulbo</p>	 <p>Rhizobium</p>	 <p>Nódulos de la raíz de las leguminosas</p>

Figura N° 5.- Géneros de bacterias y tipos de síntomas que producen (Agris, 1998).

Group	Presumptive LOPAT characters						Secondary LOPAT characters				Species
	Levan colonies on 5% sucrose nutrient agar	Kovacs' oxidase	Pectolytic activity on pectate gel or potato slice	Arginine dihydrolase	Tobacco hypersensitivity	2-keto gluconate production	Egg-yolk reaction	Nitrate reduction	Acid from sucrose		
Ia	+	-	-	-	++	-	-	+	+	<i>P. syringae</i> pathovars	
Ib	+	-	-	-	++	-	-	+	+	<i>P. syringae</i> pathovars e.g. <i>savastanoi</i> , <i>delphinii</i>	
II	-	+	+	+	++	-	+	-	-	<i>P. viridiflava</i>	
III	-	+	+	+	++	-	+	-	-	<i>P. cichorii</i>	
IVa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>P. agarici</i>	
IVb	-	+	+	+	-	+	+	+	+	<i>P. marginalis</i> i.e. pectolytic members of <i>P. fluorescens</i>	
Va	-	+	+	+	-	+	-	-	-	<i>P. fluorescens</i>	
Vb	+	+	-	+	-	+	+	-	-	<i>P. toluensis</i> <i>P. gingeri</i> <i>P. fluorescens</i> and some other saprophytic pseudomonads	

+ = 80% or more of strains positive; - = 30% or more of strains negative. Description and methods based on Lelliott *et al.* (1966)

Figura N° 6.- Identificación de Grupos, Géneros y especies de bacterias Pseudomonas verde fluorescentes por el Test LOPAT (Lelliott et. al 1966).

Medio Kelman con TTC:

Medio Kelman + 1 mL de 2, 3, 5, triphenil tetrazolium chloride y crecen bacterias que tienen capacidad de tomar al TZC, y dan un color rosado característico a la colonia: rosado, rojo, amarillo.

Medio Agar Tuna (formulación propia):

Extracto de cladodio de tuna	3.0 gr.
Agar agar	18 gr.
Dextrosa	10.0 g
Agua destilada	1000 ml

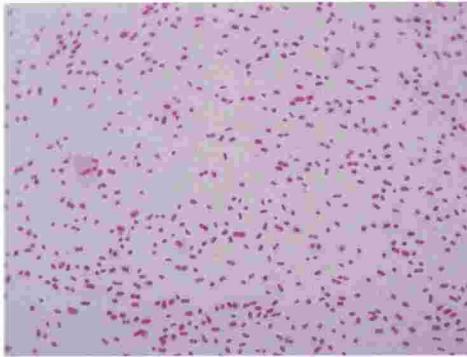
Medio King B:

Proteosa peptona	20.0 g
Glicerol	10.0 g
K ₂ HPO ₄	1.5 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.5 g
Agar agar	15.0 g
Agua destilada	1.0 l

Agar Harina de Maíz:

Harina de maíz	20.0 gr.
Dextrosa (opcional)	20.0 gr.
Peptona (opcional)	20.0 gr.
Agar agar	18.0 gr.
Agua destilada	1.0 l

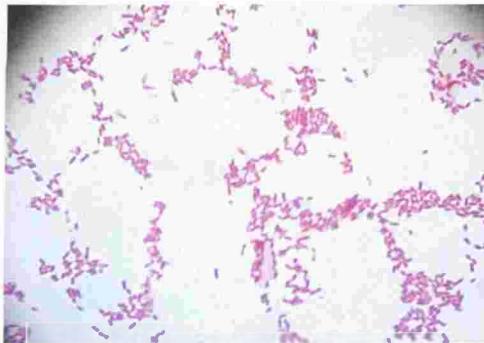
ANEXO N° 18



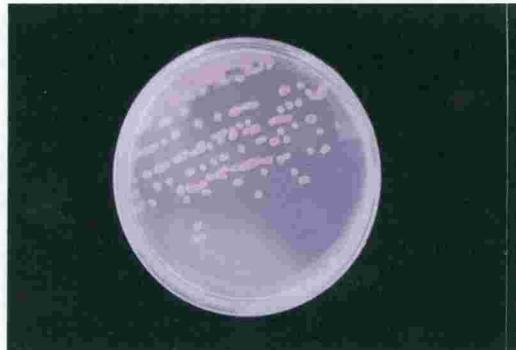
Fotografía N° 1: Cepa Bacteriana:
Xanthomonas spp (10x100X).



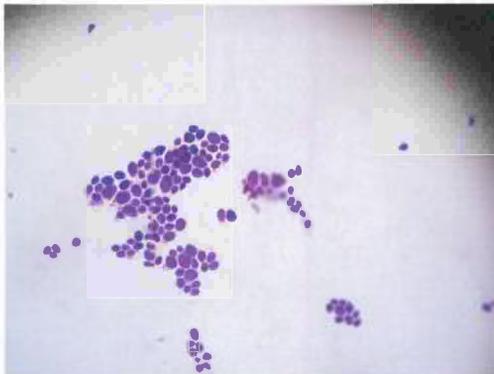
Fotografía N° 2: Colonias con
crecimiento fluido de la cepa bacteriana:
Xanthomonas spp.



Fotografía N° 3: Cepa Bacteriana:
Pseudomonas spp (10x100X).



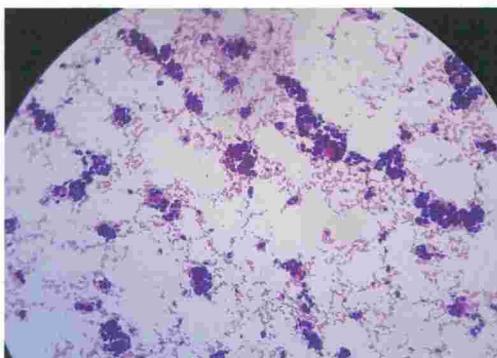
Fotografía N° 4: Colonias de la cepa
bacteriana: *Pseudomonas spp.*



Fotografía N° 5: Cepa levaduriforme
(10x100X).



Fotografía N° 6: Colonia de la cepa
levaduriforme.



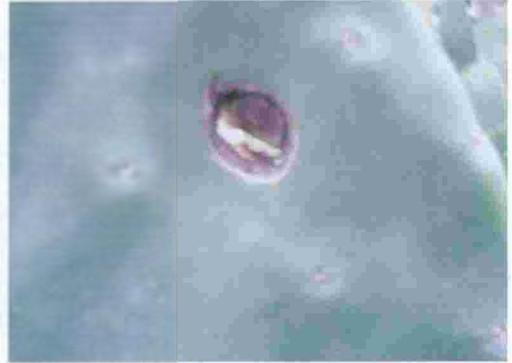
Fotografía N° 7: Crecimiento conjunto
entre: Cepa Bacteriana y levaduriforme
(10x100X).



Fotografía N° 8: Desarrollo intenso
de la enfermedad.



Fotografía N° 9: Desarrollo de lesiones regulares de la enfermedad.



Fotografía N° 12: Lesiones con hueco en el cladodio.



Fotografía N° 10: Desarrollo de lesiones irregulares de la enfermedad.



Fotografía N° 13: Síntomas de la enfermedad, por la utilización de semilla – penca enferma.



Fotografía N° 11: Cicatrices sobre el cladodio.



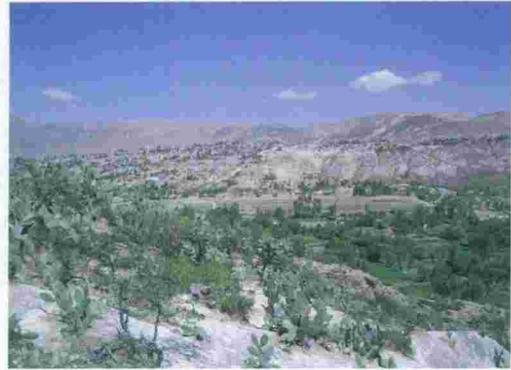
Fotografía N° 14: Lesiones con pérdida de parte del cladodio.



Fotografía N° 15: Eliminación de exudado de la lesión.



Fotografía N° 16: Cultivos de "tuna" – Ayacucho.



Fotografía N° 18: Praderas Naturales de "tuna" –Ayacucho.



Fotografía N° 17: Praderas Naturales de "tuna" – Ayacucho.



Fotografía N° 19: Planta de "tuna" en estado silvestre –Ayacucho.