

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA

PROGRAMA DE ESTUDIO DE INGENIERÍA AGRARIA



**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE
BACHILLER EN CIENCIAS AGRARIAS**

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS HONGOS
AISLADO DESDE LA “MANCHA MARRÓN” DE LA NARANJA
(*Citrus sinensis* L.) VARIEDAD WASHINGTON NAVEL, EN KITENI,
CUSCO”**

AUTORES:

ALEXIS HUAMÁN CRUZ

YULIÑO LALO MONTALVO VALENCIA

ASESOR:

ING. YURI HOLSIN CALLE CHEJE

HUAURA – PERÚ

2019

ÍNDICE DE GENERAL

ÍNDICE DE TABLA	iv
ÍNDICE DE FIGURA	v
I. TÍTULO	vi
II. RESUMEN	vii
III. INTRODUCCIÓN	viii
IV. OBJETIVOS	ix
Objetivo general	ix
Objetivos específicos.....	ix
V. MARCO TEÓRICO	10
5.1. Antecedentes	10
5.2. Marco conceptual.....	12
5.2.1. Del cultivar	12
a) Origen de la Naranja.....	12
b) Distribución	13
c) Naranja variedad Washington Navel.....	13
5.2.2. Sobre los patógenos	14
VI. METODOLOGÍA	22
6.1. Localización del estudio.	22
6.2. Etapas de la investigación.....	22
6.2.1. Etapa 1. Obtención de la muestra.....	22
6.2.2. Etapa 2. Preparación del medio de cultivo.....	23
6.2.3. Etapa 3. Aislamiento	25
6.3. Variables evaluadas	27
6.3.1. Etapa 4. Evaluación.....	27
VII. RESULTADOS	30
7.1. Obtención de los hongos aislados	30
7.2. Descripción macroscópica	30
7.2.1. Crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn y <i>Fusari</i> sp	30
7.2.2. Color de la colonia	33
7.2.3. Forma y aspecto de crecimiento.....	35

7.3. Descripción microscópica.....	36
7.3.1. Descripción de las estructuras del hongo	36
7.3.2. Determinación del diámetro de la hifa, y longitud de conidia	38
7.3.3. Determinación de la especie del hongo.....	39
VIII. DISCUSIÓN	41
8.1. Descripción macroscópica	41
8.1.1. Crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> Kuhn y <i>Fusarium</i> sp	41
8.1.2. Color de la colonia.....	41
8.1.3. Forma y aspecto de crecimiento	42
8.2. Descripción microscópica.....	42
8.2.1. Descripción de las estructuras del hongo	42
8.2.2. Determinación del diámetro de la hifa, y longitud de conidia.....	43
8.2.3. Determinación del género del hongo.....	43
IX. CONCLUSIONES	45
X. RECOMENDACIONES	46
XI. REFERENCIAS	47
XII. ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLA

Tabla 1. Composición nutricional por (100 g) en la variedad Washington Navel	14
Tabla 2. Composición vitamínica por (100 g) En La Variedad Washington Navel.....	14
Tabla 3. Análisis de varianza.....	28
Tabla 4. Evaluación de crecimiento en (cm.día) de <i>Rhizoctonia Solani</i> Kuhn	31
Tabla 5. Análisis de la varianza.....	31
Tabla 6. Prueba de Tukey	31
Tabla 7. Evaluación de crecimiento en (cm.día) de <i>Fusarium</i> sp	32
Tabla 8. Análisis de la Varianza.....	33
Tabla 9. Prueba de Tukey	33
Tabla 10. Descripción del color de la colonia en los medios de cultivo	34
Tabla 11. Descripción de la forma y aspecto del crecimiento.....	36

ÍNDICE DE FIGURA

figura 1. Ciclo de la enfermedad causada por <i>Rhizoctonia Solani</i> kuhn	17
Figura 2. Estructuras microscopias de <i>Fusarium</i> sp.....	19
Figura 3. Cultivo de <i>Fusarium Proliferatum</i> en distintos medios.....	19
Figura 4. Síntoma de “mancha marrón” en forma de anillos concéntricos.	23
Figura 5. Preparación del medio de cultivo PDA.....	24
Figura 6. Preparación del medio de cultivo agar sabouraud.....	24
Figura 7. Preparación del medio de cultivo agar v8.....	25
Figura 8. Aislamiento de hongos desde tejido vegetal enfermo.....	26
Figura 9. Preparación de las muestras para la evaluación macroscópica y microscópica...	27
Figura 10. Coloración de las colinas <i>Rhizoctonia Solani</i> kuhn y <i>Fusarium</i> sp.....	34
Figura 11. Forma y aspecto de crecimiento de las colonias <i>Rhizoctonia Solani</i> y <i>Fusarium</i> sp	35
Figura 12. Características morfológicas observadas bajo un microscopio compuesto de <i>Rhizoctonia Solani</i> kuhn.....	36
Figura 13. Características morfológicas observadas con un microscopio compuesto de <i>Fusarium</i> sp.....	37
Figura 14. Características morfológicas observadas con un microscopio compuesto de <i>Fusarium</i> sp.....	37
Figura 15. Medición del diámetro de la hifa de <i>Rhizoctonia Solani</i> Kuhn	38
Figura 16. Medición del diámetro de la hifa de <i>Fusarium</i> sp.....	39
Figura 17. Medición del hongo con una regla graduada	50

I. TÍTULO

“Caracterización morfológica de los hongos aislados desde la “mancha marrón” de la naranja (*Citrus sinensis* L.) Washington Navel, en la localidad de Kiteni, Cusco”.

II. RESUMEN

En el Perú y el mundo, la producción de naranjas está sujeta a grandes pérdidas debido a la afectación de algunos factores bióticos y abióticos; las enfermedades fúngicas se han convertido en una de las principales amenazas para la citricultura. Dentro de estas enfermedades, en la localidad de Kiteni, provincia de La Convención, región de Cusco, la “mancha marrón” viene afectando severamente a la naranja en la variedad Washington Navel, tanto en plantas en vivero y en terreno definitivo, causando la defoliación de la planta. El objetivo del presente trabajo de investigación es describir las características morfológicas de los hongos procedentes de la “mancha marrón” en la “naranja” *Citrus sinensis* L. variedad Washington Navel, que permitirá conocer al patógeno responsable de dicha enfermedad.

Se aisló dos hongos a partir de las hojas sintomáticas de cítricos y se realizó la caracterización morfológica en tres medio de cultivo (Agar de papa dextrosa [PDA], Agar Sabouraud y Jugo V8) efectuándose la descripción macroscópica (crecimiento micelial, color de la colonia, tipo de crecimiento, aspecto de crecimiento) y la descripción microscópica (mediante la descripción de las estructuras del hongo, determinación del diámetro de la hifa, longitud de la conidia y el género del hongo). En base a esas características macroscópicas y microscópicas se determinó la presencia de los géneros de hongos: *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp.

Palabras Clave: Naranja, Mancha marrón, características morfológicas, micelio, conidia.

III. INTRODUCCIÓN

El surgimiento del desarrollo de la agricultura en el mundo es fuente esencial primaria de los recursos alimenticios para el hombre; por tal motivo se requiere de una especial atención el estudio de las enfermedades que atacan los cultivos. La “naranja”, el “limón” y la “mandarina” están entre los frutales más importantes a nivel mundial, su cultivo y consumo se realizan en los cinco continentes (Instituto Colombiano Agropecuario [ICA], 2012). Sin embargo, la citricultura enfrenta grandes riesgos debido a los problemas de fitosanidad que puede afectar severamente la producción del cultivo, si no son atendidos con prioridad, entre ellos se encuentran enfermedades virales, bacterianas y fungosas.

Uno de los lugares de producción importantes en la zona sur de Perú es la región de Cusco, provincia de La Convención, donde en la actualidad se está aumentando áreas de cultivo de naranja variedad Washington Navel. Este crecimiento se pone en riesgo debido a los múltiples problemas fitosanitarios; sin embargo, una enfermedad en particular se encuentra afectando severamente plantas en vivero y en áreas de producción, causando una “mancha marrón”, la que se presenta en forma de anillos concéntricos causando la defoliación de la planta. Esta enfermedad aún no se encuentra reportado dentro de las enfermedades tropicales del Perú, por el cual se desconoce el agente causal de este síntoma que actualmente viene afectando hasta un 80 % a nivel de campo con altos y bajos niveles de severidad (observación personal A. Huamán 2019), afectando directamente en la productividad y la rentabilidad económica del cultivo.

El presente trabajo de investigación consistió en describir los hongos aislados desde las hojas sintomáticas, en el laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico Huando y en el Laboratorio de la Facultad de la Ingeniería Agraria de la UCSS sede Huaura. Aislados a través de dos métodos: medio de cultivo PDA y método de cámara húmeda. Las colonias obtenidas fueron transferidas a otras placas de Petri consiguiendo así cultivos puros, realizándose luego la descripción macroscópica en tres medios, PDA, Agar Sabouraud y jugo V8 (crecimiento micelial, color de la colonia, tipo de crecimiento y aspecto de crecimiento) y la descripción microscópica en el medio PDA (estructuras del hongo, determinación del diámetro de la hifa, longitud de la conidia y el género del hongo).

IV. OBJETIVOS

Objetivo general

“Caracterizar morfológicamente y determinar los géneros de hongos aislados desde la “mancha marrón” de la “naranja” *Citrus sinensis* L. variedad Washington Navel, de la localidad de Kiteni, Cusco”.

Objetivos específicos

- Aislar los hongos a partir de la “mancha marrón” de la naranja Washington Navel. en la localidad de Kiteni, Cusco.
- Describir las estructuras macroscópicas en tres medios de cultivo del hongo aislado a partir de la “mancha marrón” en naranja variedad Washington Navel.
- Describir las estructuras microscópicas de los hongos en el medio de cultivo PDA, del hongo aislado a partir de la “mancha marrón” en naranja variedad Washington Navel

V. MARCO TEÓRICO

5.1. Antecedentes

Arguedas (2004) describió el cuadro sintomatológico de *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk estado perfecto de *Rhizoctonia solani* Kuhn en el cultivos de “surá” (*Terminalia oblonga* (Frank) Donk, en Costa Rica. Para ello, evaluó hojas de las partes terminales de las ramas del cultivo. Entre sus resultados identificó síntomas cloróticos en la lámina de la hoja y las hojas necrosadas generalmente sin desprendimiento de la planta. Concluyendo que para el desarrollo de este patógeno se requiere altos niveles de humedad, precipitación y temperatura.

Quilambaqui (2005) aisló e identificó especies de *Fusarium* del cultivo de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco municipios de Guanajuato-México, de las cuales se obtuvieron 88 muestras a partir de tejidos vegetales tanto de rizoma, tallo y raíces, aislando a través del medio de cultivo PDA hasta la obtención de cepas puros. Asimismo, para la identificación utilizó estructuras reproductivas y de conservación (macroconidios, microconidios, fiálides, conidióforo y clamidosporas). Entre los resultados identificó la presencia de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*. Concluyendo que las especies de *fusarium* están asociados a cultivos con síntomas de amarillamiento de ramas, disminución de crecimiento y muerte de tejido aéreo.

Rivera y Gómez (2012) aislaron, identificaron y evaluaron la patogenicidad de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp. en los municipios de Curumani y Becerril, Colombia. Para ello, las cepas de los fitopatógenos se aislaron del cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) de la parte basal del tallo, raíces y panículas. Las muestras colectadas se colocaron en cámara húmeda, posteriormente fueron trasladado a los medios de cultivo Agar Jugo, Agar Extracto de Malta, Agar Avena y Agar Papa Dextrosa (PDA). Después de ser encubadas en las placas y repicadas en medio PDA se obtuvieron inóculos puros. Asimismo, para las identificaciones utilizaron las claves propuestas por Ellis (1993a y b) y Booth (1971). Entre sus resultados identificaron la presencia de colonias, hifas hialinas con constricción a la altura del tabique y ramificaciones en ángulo recto, esclerocios de forma globosa a subglobosa para *R. solani*

Kuhn. Mientras que para *Fusarium* sp. mostraron macroconidias multicelulares, grandes, puntiagudas, hifas hialinas y septadas. En cuanto a la prueba de patogenicidad de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp., luego de la inoculación al cultivo de arroz se manifestaron los síntomas característicos, por lo cual concluyeron que *R. solani* Khun y *Fusarium* sp. son los agentes causales de dichos síntomas en el cultivo de *O. sativa* L.

Duarte, Echevarría y Martínez (2016) identificaron y caracterizaron *Fusarium* spp, en semilla y tallo de garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), en el municipio San José de las Lajas, Mayabeque-Cuba. Para ello, evaluaron variables culturales (color de la colonia tanto anverso y reverso, textura superficial, forma de los bordes, presencia de anillos en el anverso y crecimiento lineal) y morfológicas (tamaño, forma y color de las estructuras vegetativas y reproductivas). Asimismo, para las identificaciones utilizaron las claves propuestas por Leslie y Summerell. Entre los resultados identificó la presencia de *F. proliferatum* (Matsushima) Nirenberg, *F. nygamai* Burgess y Trimboli, *F. dlamini* Marasas, Nelson y Toussoun, *F. phyllophilum* Nirenberg y O'Donnell, *F. solani* (Martius) Appel y Wollenweber Emend. Snyder y Hansen y *F. oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder y Hansen. Concluyendo que existió variabilidad entre los mismos aislamientos y observaron biotipos al interior de las especies.

Lezcano, Martínez y Alonso (2012) caracterizaron e identificaron *Fusarium* de las semillas de *Leucana leucocephala* cv. Perú en el Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), en Mayabeque, y en la Estación Experimental “Indio Hatuey”, en Matanzas-Cuba. Para ello, evaluaron variables culturales (color de la colonia en el anverso y el reverso, la textura y el crecimiento lineal y aéreo) y morfológicas (el tamaño, la forma y el color de las estructuras vegetativas y reproductivas). Asimismo, para las identificaciones utilizaron las claves propuestas por Booth (1969), Booth (1977), Singh et al. (1991) y López (2003). Entre los resultados identificó la presencia de *F. oxysporum* Schlecht, *F. sambucinum* Fuckel, *F. semitectum* Berk y Rav, *F. incarnatum* (Rob) Sacc, y *F. chlamydosporum* Wollenw y Reinking, concluyendo que las variables cultural y morfológica permitió la identificación de los patógenos.

Sánchez (2018) evaluó la resistencia al hongo *Thanatephorus cucumeris* estado perfecto de *Rhizoctonia solani* Kuhn en cultivares de “frijol” (*Phaseolus vulgaris* L), introducidos por el Centro Internacional de Agricultura Tropical de Colombia [CIAT], en la región de Ucayali – Perú. Para ello se realizó aislamientos de este patógeno desde el cultivar, luego efectuó la prueba de patogenicidad en hojas raíces e hipocótilos, del cual resultó ser más patógeno el aislamiento 3 a nivel de raíz e hipocótilo. Entre los resultados se identificó que el cultivar MUS-3 no mostró síntomas de la enfermedad, seguidamente de los cultivares MUS-18, BAT-1297, BAT-1155 y DOR-364, presentaron síntomas ligeros. Asimismo confirmo sus cualidades de resistencia a nivel de campo de los cultivares seleccionados en el invernadero. Concluyendo que este patógeno es considerada como la enfermedad más destructiva del cultivo de frijol *P. vulgaris* L.

5.2. Marco conceptual

5.2.1. Del cultivar

a) Origen de la Naranja.

Según Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda [EARTH] (2004) el origen del género *Citrus* se sitúa en el sureste de Asia y el centro de China, Filipinas y el archipiélago Indomalayo hasta Nueva Guinea. Las primeras variedades e híbridas de cítricos fueron el resultado de un largo proceso de identificación, colecta y reproducción de plantas silvestres. Por su parte el Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino de España [MARM] (2011), sostiene que los lugares de procedencia de las especies están dirigidas al sureste asiático, así que los cidros pertenecerían al sur de la China y nordeste de la India, los “pomelos” aparecerían en la península de Malasia y en la China meridional y los mandarinos se originarían en el sureste de la China y en Indochina (Laos, Camboya y Vietnam).

Taxonomía de la naranja

EARTH (2004), describe la clasificación taxonómica de las naranjas variedad Washington Navel de la siguiente manera: Clase Angiospermae, Sub clase Dicotiledónea, Orden Sapindales, Familia Rutaceae, Género *Citrus*, Especie *C. cinensis* L.

b) Distribución

La naranja, el limón y la mandarina están entre los frutales más importantes a nivel mundial. Su cultivo y consumo se realiza por igual en los cinco continentes, siendo explotados en forma comercial en todos los países donde las condiciones del clima son óptimas para su desarrollo (ICA, 2012). Según Padrón y Rocha (2007) datan que los cítricos se cultivan por sus frutos de agradable sabor y con pocas o ninguna semilla, que se consumen preferentemente en fresco, aunque también se comercializan en forma de jugo concentrado, fresco, pasteurizado entre otros, mermeladas o jaleas. La corteza tiene aplicaciones industriales y puede destinarse a la fabricación de alimento para ganado.

c) Naranja variedad Washington Navel

Probablemente se originó por mutación espontánea en Bahía (Brasil) a finales del siglo XVIII, el fruto es grande y de excelente calidad, sin semillas. La recolección se efectúa a partir de noviembre, pudiendo permanecer el fruto en el árbol durante bastante tiempo en buenas condiciones comerciales. Es productiva y puede cultivarse en la práctica totalidad de nuestras áreas productoras, aunque está más indicada en las de media y tardía recolección (EARTH, 2004).

La variedad Washington Navel, se caracteriza por ser un árbol vigoroso y productivo, con hojas grandes y acusadas, el fruto por lo general tiene de bajo pH y alto contenido de jugo, es de tamaño medio a grande (75 a 80 mm de diámetro y de 200 a 250 g de peso), de forma redonda a ligeramente ovalado; corteza de color anaranjado intenso (cuando se presentan las condiciones climáticas adecuadas) ligeramente rugosa y gruesa, relativamente fácil de pelar, son partenocárpicas (sin semillas) por lo que son más sensibles a los cambios extremos de condiciones climáticas que las naranjas comunes (con semillas), por lo que la producción es variable en algunas regiones. Los gajos se separan fácilmente y contiene una pulpa firme con mucho jugo, de sabor agradable (Agustí, 1999; Galván, et al., 2009).

Tabla 1

Composición nutricional por (100 g) en la variedad Washington Navel

Descripción	cantidad
Energía	42 (Kcal)
Carbohidratos	8,6 (g)
Proteínas	0,8 (g)
Potasio	200 (mg)
Calcio	36 (mg)

Fuente: Moreiras et al. (2010); Citado por Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León [CDANL] (2015)

Tabla 2

Composición vitamínica por (100 g) en la variedad Washington Navel

Descripción	cantidad
Vitamina C	50 (mg)
Vitamina A	40 (mg)
Vitamina B6	0,06 (mg)

Fuente: Moreiras et al. (2010); Citado por Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León [CDANL] (2015)

Pardo (2004) resalta la importancia de la vitamina C que es esencial para la formación y conservación del colágeno, la proteína que sostiene muchas estructuras corporales y en la formación de huesos y dientes. Interviene en el metabolismo de las proteínas, actúa como antioxidante y cicatrizante; también favorece la absorción de hierro procedente de los alimentos de origen vegetal. Así mismo, puede prevenir la formación de nitrosaminas, compuestos que producen tumores en animales de laboratorio y probablemente también en los seres humanos.

5.2.2. Sobre los patógenos

1) Definición de la enfermedad

Es un proceso biológico que varía en magnitud e intensidad con el tiempo. La magnitud depende de múltiples factores relacionados por parte del hospedero y del patógeno, así como

el efecto de las condiciones ambientales (Latorre, 2004). La enfermedad se manifiesta mediante síntomas, las cuales se dividen en tres categorías: morfológicas o externos, histológicas o internos y fisiológicos; en tanto, el triángulo de la enfermedad, constituido por el hospedero (un cultivo), el patógeno (un agente causal) y el ambiente, deben estar perfectamente ajustados para que se produzca una enfermedad infecciosa (Rivera, 1999).

2) Principales enfermedades de los cítricos

a) *Alternaria (Alternaria citri)*

Es una enfermedad que se manifiesta mediante manchas circulares necróticas, más o menos grandes, sobre el limbo foliar extendiéndose a lo largo del nervio y el haz, haciendo que se deformen, le rodea una zona amarillenta provocando una fuerte defoliación durante la primavera; en el fruto aparecen pequeñas áreas circulares que crecen con el tiempo, de textura corchosa (Palacios, 2005).

b) *Antracnosis (Colletotrichum gloeosporoides Penz.)*

Es una enfermedad de poca importancia en la zona por ser un patógeno débil, sin embargo, está presente en todos lados y es uno de los primeros en colonizar tejidos senescentes, incluso puede estar presente en tejidos sanos sin causar síntomas, esto puede afectar las ramillas, hojas o frutos dañados por otros agentes primarios como el frío, herbicidas, u otros factores, por lo que normalmente no se realiza un control específico (Garrán, 2012)

c) *Botritis (Botrytis cinerea Pers.: Fr.)*

Uno de los síntomas más impactantes es la necrosis de los pétalos, que bajo condiciones húmedas se cubren con micelio y esporas grisáceas, provocando el desprendimiento de la fruta y si no se produce la caída tendrá líneas y rugosidad en su pericarpio afectando la calidad externa de la fruta, ataca generalmente en los limones y limas. El hongo se reproduce sobre los tejidos muertos de los órganos ya afectados, liberando grandes cantidades de esporas al aire; también puede encontrarse en el suelo. Las conidias son diseminadas por el viento o insectos. El ataque ocurre bajo condiciones muy húmedas y frías de 18 °C y se

asocia muchas veces con las neblinas (Castro, Timmer, Leguizamón, Müller y Corrales, 2000).

d) Gomosis infecciosa (*Phytophthora citrophthora* y *Phytophthora parasítica*)

Esta enfermedad provoca una podredumbre de la corteza, afectado del tronco y suele ser acompañada por una secreción gomosa; de ahí procede el nombre de “gomosis”. La parte aérea se ve alterada en su crecimiento, observándose un menor brotamiento, un menor desarrollo junto con la clorosis y el secado de las ramas, en consecuencia, la muerte de la planta (Vázquez, 2012).

3) Enfermedades por *Rhizoctonia*

Enfermedad que se encuentra en todo el mundo, los síntomas pueden variar en los diferentes cultivos e incluso en una misma planta hospedante. Estos síntomas son más comunes en la especie *R. solani*, produciendo el ahogamiento de las plántulas y la pudrición de la raíz, así como la pudrición del tallo de las plantas adultas, además de la pudrición en frutos o vainas que yacen en el suelo, es un patógeno muy destructivo y causante de elevadas pérdidas económicas en la agricultura (Garrido, 2016).

a) Clasificación taxonómica

Según Barnet y Hunter (1972) la clasificación taxonómica de *Rhizoctonia solani* Kuhn es la siguiente. Reino Fungi, Subdivisión Deuteromycota, Clase Agonomycetes (Mycelia Sterilia), Orden Agonomycetales, Familia Agonomicetaceae, Género *Rhizoctonia*, Especie *R. solani* Kuhn

b) Ciclo de la enfermedad

Rhizoctonia solani Kuhn su crecimiento y proliferación se da en diferentes temperaturas, tanto en zonas cálidas y frías, siendo la óptima para su desarrollo 18 °C, además de una alta humedad del suelo y ambiente. Presenta dos fases evidentes en su ciclo biológico; La primera se da con el crecimiento, propagándose en los tallos y brotes, lo que genera el estrangulamiento. La siguiente corresponde a la formación estructura de supervivencia

(esclerotes), pero esto dependerá de las condiciones ambientales, generalmente los esclerotes se encuentran en restos de plantas o en tejido descompuesto (Acuña y Araya, 2017)

c) Estructuras del patógeno

Rhizoctonia solani Kuhn se caracteriza por formar un micelio que consta de células alargadas y se bifurca en ángulo recto con relación a la hifa principal. Las hifas son septadas y multinucleada; midiendo habitualmente de 8 a 12 micras de diámetro. El micelio en formación no presenta color y conforme madura se torna de color amarillo a café. Produce tres tipos de micelio: inicialmente muestra hifas pigmentadas que se diseminan velozmente por medio del tejido vegetal, posteriormente se producen hifas de apresorios y por ultimo a través de la agrupación de células que forma los esclerotes, que son irregulares y hemisféricos, de color blanco y cuando alcanzan su desarrollo se tornan de color café; miden de 1 a 6 milímetros de diámetro (Chávez, 2014; Garrido, 2016). La fase telomorfica o sexual se denomina *Thanatephorus cucumeris*, perteneciente al género *Thanatephorus*, se presentan hifas mayor a 7 micras de diámetro con constricciones cerca del punto de ramificación y basidias hialinas. Este hongo forma basiosporas en condiciones ambientales especiales, siendo raro encontrarlas en la naturaleza (Barahona, 2012; Garrido, 2016).

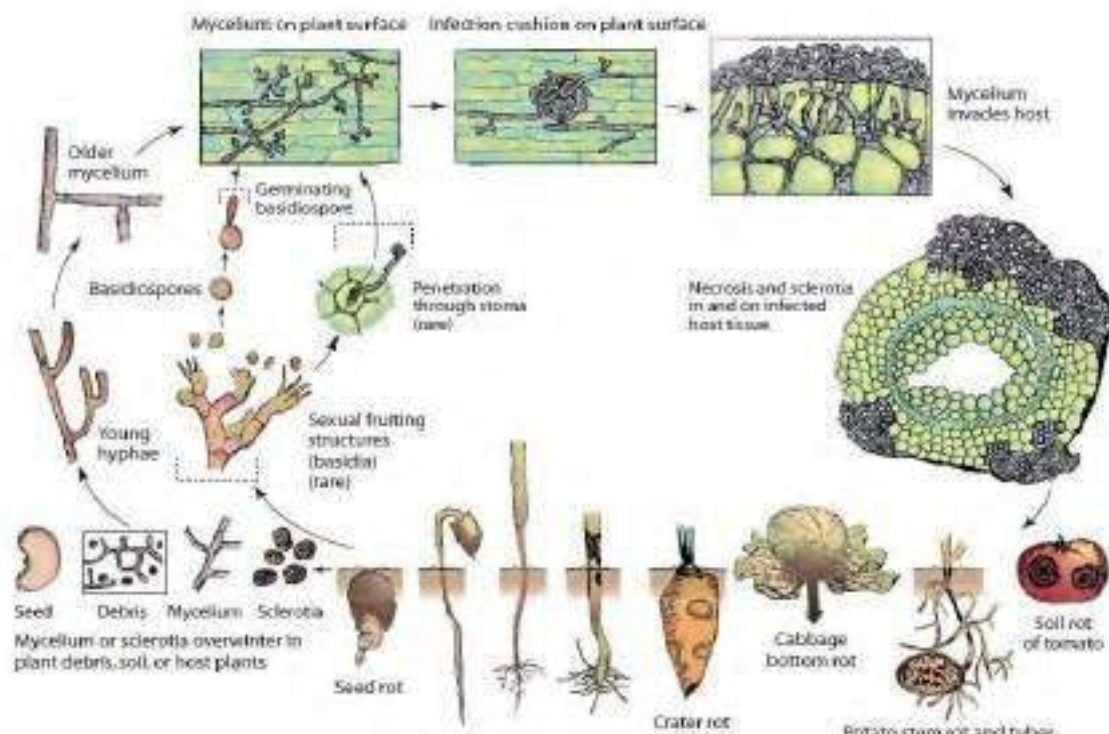


Figura 1. Ciclo de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani kuhn* (*Thanatephorus cucumeri*). Fuente: Agrios (2005)

d) Factores ambientales favorables para su desarrollo

La severidad de la enfermedad depende de la temperatura, de la humedad del suelo y los exudados de la planta y raíces, los cuales estimulan el crecimiento del micelio. La infección de las plantas es más severa cuando el crecimiento es lento, en tanto el desarrollo del hongo se produce entre los 9 y 27 °C, siendo el rango óptimo de 15 – 20 °C (Cruz, 2004; Garrido, 2016).

e) Los síntomas de las enfermedades producidas por *Rhizoctonia*

Generalmente presentan focos de plantas muertas en el germinador, estos pueden atacar directamente a la semilla en el suelo, caso contrario, afectan el cuello de las plántulas recién germinadas, causando una necrosis al nivel del suelo y la caída o volcamiento de las plántulas. Hay tres formas de penetración del patógeno: mediante la formación de cojines de infección, la formación de apresorios lobulados y la penetración estomatal. Las plantas llegan a ser resistentes cuando la primera hoja ha madurado; sin embargo, estos hongos también pueden atacar las raicillas, causando pudrición y retraso en el crecimiento general de las plántulas (Castro, Timmer, Leguizamón, Müller y Corrales, 2000).

4) *Fusarium* sp

El *Fusarium* es un patógeno facultativo con alta capacidad de sobrevivir en la materia orgánica y que a la vez tiene la capacidad de atacar la planta cuando esta sufre algún tipo de desbalance (Michielse, 2009, Retana, Ramírez, Castro y Blanco, 2017). Los principales mecanismos de dispersión del patógeno son los movimientos de suelo infectado, el agua de escorrentía y el uso de almácigo infectado, tiene la capacidad de sobrevivir por largos periodos en el suelo, debido a las clamidosporas, haciendo que la rotación de cultivos a corto plazo no tenga efecto (Lacy et al., 1996, Daugovish et al., 2008, Retana et al., 2017)

a) Clasificación taxonómica

Según Barnett y Hunter (1972) la clasificación taxonómica de *Fusarium* sp es la siguiente: Reino Fungi, Subdivisión Deuteromycota, Clase hyphomycetes, Orden Hyphales (Moniliales), Familia Tubercularia, Género *Fusarium*.

b) Características morfológicas de *Fusarium* sp.

Posee estructuras como: las fiálides, las macroconidias, las microconidias y las clamidosporas, estas resultan esenciales en la identificación a nivel de especie, aunque no todas las especies de *Fusarium* las forman. Además, existen diferencias mínimas entre especies, lo que hace más laboriosa la identificación (Carrillo, 1999; Heitefuss y Williams 1976, Alvarado, 2005).

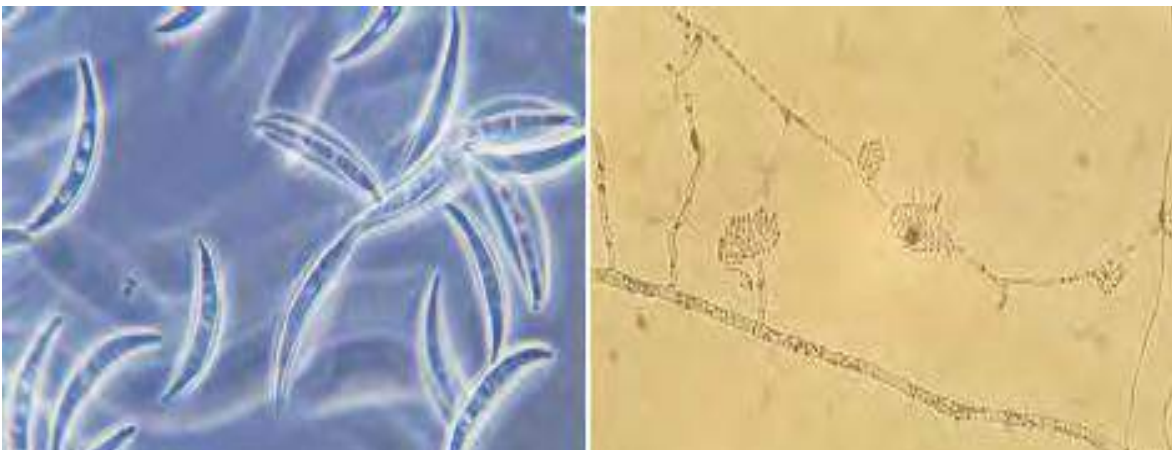


Figura 3. Estructuras microscopias de *Fusarium* sp. (A), macroconidia, (B), microconidia Fuente: Agrios (2005)

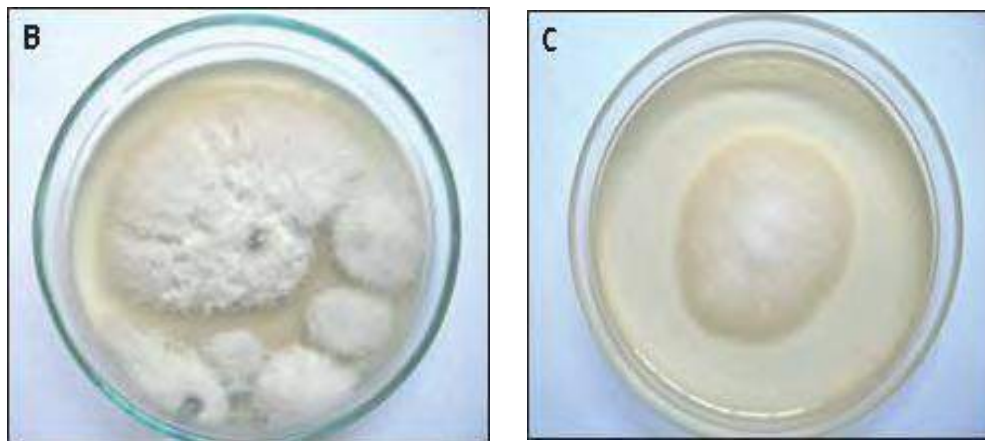


Figura 3. Cultivo de *Fusarium proliferatum* en distintos medios, (B), agar PDA, (C), agar *Sabouraud*. Fuente: Tapia y Amaro (2014)

c) Ciclo de la enfermedad

Fusarium spp. forma parte del complejo de hongos del suelo y puede encontrarse habitando como saprofito o como estructura de resistencia llamado clamidospora en las partículas del suelo. Si las condiciones medioambientales son favorables para el hongo, pueden provocar

una serie de problemas en las plantas en desarrollo, iniciando con el ingreso del hongo a la raíz, produciendo micelio y microconidias y extendiéndose en forma ascendente a través de los vasos xilemáticos de la planta, donde la planta emite la respuesta liberando polisacáridos (gomas-tilosas) que taponan los haces vasculares para impedir el avance del hongo (Agrios, 1996, Alvarado 2005). Las condiciones climáticas son las altas temperaturas entre 20 a 25 °C, la alta intensidad lumínica, la elevada humedad relativa del ambiente de 75-95 % y la alta densidad de plantas. (Paulitz y Belanger, 2001, Alvarado 2005).

d) Los síntomas de las enfermedades producidas por *Fusarium* sp

Fusarium puede afectar en distintas etapas y zonas de la planta. En estado de plántula, los patógenos pueden interferir taponando el cuello de la planta, produciendo la falla de la emergencia. En estado de planta ya desarrollada, los problemas más comunes son la marchitez vascular y la pudrición seca de túberos (Agrios, 1996, Alvarado, 2005).

Fusarium spp. en su avance, libera toxinas y los síntomas característicos que presenta la planta son la marchitez vascular, clorosis de hojas, enanismo y pudrición. Al morir la planta, el hongo queda en los restos de los tejidos vegetales invernando como espora, micelio o clamidospora; éstas se dispersan a otras áreas y repiten el ciclo de la enfermedad (Armentrout, 1988, Alvarado 2005).

e) Síntomas de las formas especiales del genero *Fusarium*

Fusarium oxysporum f. sp. *asparagii*

En esparrago (*Asparagus officinalis* L.) causa daño a las raíces, provoca el hinchamiento de la parte afectada y presencia de nódulos característicos con dimensiones de 1 y 10 mm, logrando alcanzar hasta los 2.5 mm (University of California, 1985, Abawi y Mai, 1987, citado por Talledo 2016, p.22)

Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici

En tomate (*Solanum lycopersicum* L.) causa el marchitamiento integral de toda la planta, algunas veces con coloración amarillenta de las hojas, retraso del crecimiento, pudrición del sistema radicular y bascular de color marrón con apariencia húmeda (Rodríguez, 2009)

Fusarium oxysporum f. sp. apii

En apio (*Apium graveolens* L.) provoca marchitez del follaje, amarillamiento, disminuye el crecimiento de la planta, daños al sistema radicular, la parte interna de las raíces afectadas muestra coloración de naranja-marrón (Retana, Ramírez, Castro y Blanco, 2018).

Fusarium oxysporum f. sp. cubense

En plátano (*Musa paradisiaca* L.) se manifiesta en las hojas adultas mostrando amarillamiento generalizado y de forma pronunciado en el margen del follaje, esto se amplía hacia la nervadura central de las hojas provocando el doblamiento, colapso de los peciolo y tornándose a colores cafés, en algunos casos presenta el acortamiento de las hojas, agrietamiento de la base del pseudotallo. Cuando se realiza corte horizontales al pseudotallo se observa los haces vasculares de color café rojizo (Hernández, 2016)

VI. METODOLOGÍA

6.1. Localización del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico Huando que se ubica en la provincia de Huaral, departamento de Lima, la ubicación geográfica de 11°29'05.0" Latitud Sur, 77°11'00.7" Longitud Oeste, con una altitud de 150 m.s.n.m. y en el Laboratorio de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, Facultad de Ingeniería Agraria sede en Huaura, con ubicación en el distrito de Végueta, provincia de Huaura, departamento de Lima, con una ubicación geográfica de 11°00'56.4" Latitud Sur, Longitud Oeste 77°36'20.8", altitud 95 m.s.n.m.

6.2. Etapas de la investigación

El trabajo de investigación en sus cuatro etapas (obtención de la muestra, preparación del medio de cultivo, aislamiento y evaluación) se realizó siguiendo el método descrito por French y Herbert (1980)

6.2.1. Etapa 1. Obtención de la muestra

Las muestras de hojas y ramillas con síntomas de “mancha marrón” del cultivo de naranja de la variedad Washington Navel fueron colectadas de la localidad de Kiteni, del distrito de Echarati, provincia La Convención, región Cusco – Perú, con ubicación geográfica Latitud Sur 12°42'49.8", Longitud Oeste 73°09'42.5", se colecto de una plantación de ocho años de edad, con un área de 1,5 ha, que corresponde a un bosque tropical húmedo a una altitud de 937 m.s.n.m., temperatura media anual de 24 °C y una precipitación promedio anual 1928 mm (Estación Meteorológica del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología [SENAMHI], Quillabamba, 2015).

En total se colectaron 15 muestras con síntomas de daño de la enfermedad, las que fueron cuidadosamente preservados en bolsas con cierre *zip* envueltos en papel kraf húmedo, lo cual traslado inmediatamente al laboratorio de Fitopatología del Instituto Tecnológico Huando (Huaral) para el aislamiento de los hongos.

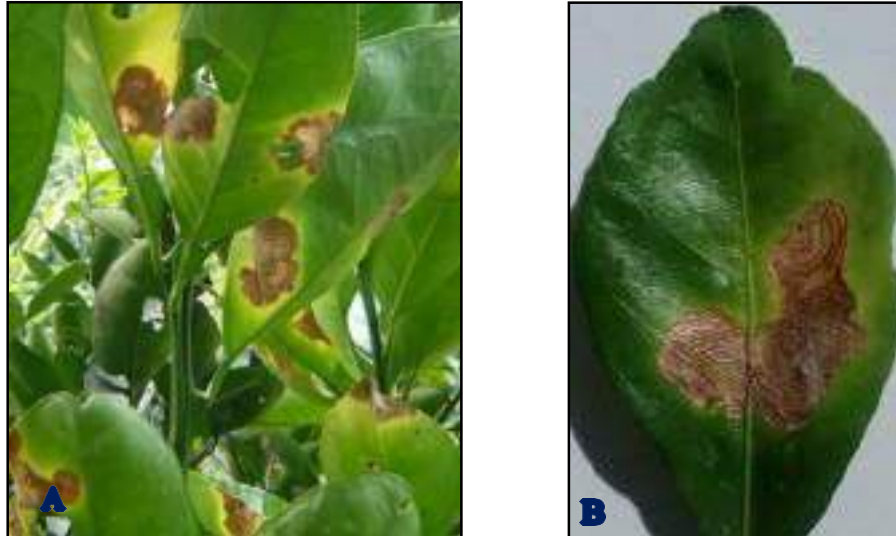


Figura 4. Síntoma de “mancha marrón” en forma de anillos concéntricos, síntomas en una ramilla de cítricos (A), Síntoma en una hoja (B). Fotografía: A. Huamán. (2019).

6.2.2. Etapa 2. Preparación del medio de cultivo

Los medios de cultivos utilizados para el aislamiento y la purificación de los hongos fueron el Agar de dextrosa de patata (PDA), Agar Sabouraud y el Agar en jugo V8.

Materiales

- Materiales: Vaso de vidrio graduado 1 L, botellas de Pyrex 1 L, matraz Erlenmeyer, placas de Petri, bolsas de cierre *zip*, rotulador permanente, regla de graduada, papel kraf y papel de aluminio.
- Insumos: PDA comercial, Agar Sabouraud, Agar jugo V8, carbonato de calcio (CaCO₃), agua destilada o desionizada y antibiótico Cloranfenicol.

Equipos:

- Autoclave, estereoscopio, microscopio, cabina de flujo laminar, balanza, incubadora, refrigeradora y horno microonda.

Preparación de medio solido PDA

Se pesó 39 g de PDA comercial (Potato Dextrose Agar [M096-5008], HIMEDIA LABORARTORIO Put. Ltd), (2019), se mezcló con 1 L de agua destilada en una botella de

vidrio de Pyrex, agitando vigorosamente hasta obtener una solución homogénea (Figura 5A), se rotuló con nombre y fecha, calentándose hasta una temperatura de 100 °C durante dos minutos y se trasvasó a otro matraz (Figura 5B), para finalmente esterilizar en autoclave a 121 °C, a 15 lbs de presión durante 30 minutos. Posteriormente se dejó enfriar hasta que la aguja del manómetro marque cero; se retiró las botellas con el medio de cultivo esterilizada, dejándose enfriar hasta punto de plaqueo (50°C), finalmente se distribuyó 500 ml medio de cultivo en las placas de Petri previa adición de 50 mg del antibiótico cloranfenicol.



Figura 5. Preparación del medio de cultivo PDA. (A), insumos para la preparación, (B), medio de cultivo preparado para el ingreso a la autoclave. Fotografía: Y. Calle (2019).

Preparación de medio Agar Sabouraud

Se pesó 65 g de preparado de Agar Sabouraud (Sabouraud Dextrose Agar [M063-5003], HIMEDIA LABORARTORIO Put. Ltd) (Figura 6A), se mezcló con un litro de agua destilada en una botella de vidrio de Pyrex (Figura 6B), se realizó el mismo procedimiento como en la preparación de PDA.



Figura 6. Preparación del medio de cultivo Agar sabouraud. (A), insumos para la preparación, (B), medio de cultivo preparado. Fotografía: Y. Calle (2019).

Preparación de medio Agar con jugo V8

Se pesó dos gramos carbonato de calcio (Carbonato de calcio 50 g, Farmacia Universal), 20 g Agar, se mezcló ambos insumos con 200 mL de Jugo V8 (V8 Original, Kraft Foods Group, Inc) y 800 mL de agua destilada agitando vigorosamente hasta obtener una solución homogénea (Figura 7A). Se transfiere al matraz (Figura 7B), rotulándose el nombre y fecha para finalmente esterilizar en autoclave a 121°C, 15 lbs de presión durante 30 minutos. Se dejó enfriar hasta (50°C) punto de plaqueo y se distribuyó en las placas de Petri previa adición de 50 mg del antibiótico cloranfenicol por 500 ml de medio.



Figura 7. Preparación del medio de cultivo Agar V8. (A), insumos para la preparación, (B), medio de cultivo preparado antes del ingreso a la autoclave. Fotografía: Y. Calle. (2019).

6.2.3. Etapa 3. Aislamiento

El proceso de aislamiento se hizo a través de dos métodos.

a) Aislamiento a través de un medio de cultivo

Las hojas de naranja de la variedad Washington Navel con síntomas de la “mancha marrón” en forma de anillos, se seleccionaron y lavaron con agua potable de laboratorio, oreadas durante cinco minutos, se cortaron en secciones de 20 a 25 mm y luego fueron sometidas a una solución 300 ppm de hipoclorito de sodio para desinfectar durante 2 minutos y finalmente enjuagar con agua destilada estéril (ADE), luego se orearon los trozos del tejido y se colocaron en las placas de Petri conteniendo el medio de cultivo (PDA). Todo este proceso se realizó dentro de la cabina de flujo laminar, finalmente incubadas a 25 °C hasta el crecimiento del patógeno para luego observar sus estructuras mediante un microscopio óptico.

b) Aislamiento mediante el método de cámara húmeda

Las hojas de naranja con síntomas de “mancha marrón” en forma de anillos, se seleccionó y lavó con agua potable de laboratorio, se oreó durante 5 minutos, se cortó en secciones de 50 a 60 mm luego se sometieron a una hipoclorito de sodio a una concentración 300 ppm para desinfectar durante un minuto, se lavaron en ADE, finalmente se colocó al centro de la placas de Petri acondicionado con papel humedecido, luego se incubaron a una temperatura de 24 °C hasta el crecimiento del patógeno para observar sus estructuras mediante un microscopio óptico.

c) Obtención del cultivo puro

Una vez desarrollado los hongos en la placa Petri de la cámara húmeda y medio de cultivo (Figura 8A – C), parte de las colonias y con la ayuda de un microscopio estereoscopio y bisturí estéril se cortaron las puntas de la hifa de la colonia y luego fueron transferidas hacia otras placas de Petri conteniendo PDA, para su desarrollo y obtención de cultivos puros de hongos (Figura 8D).

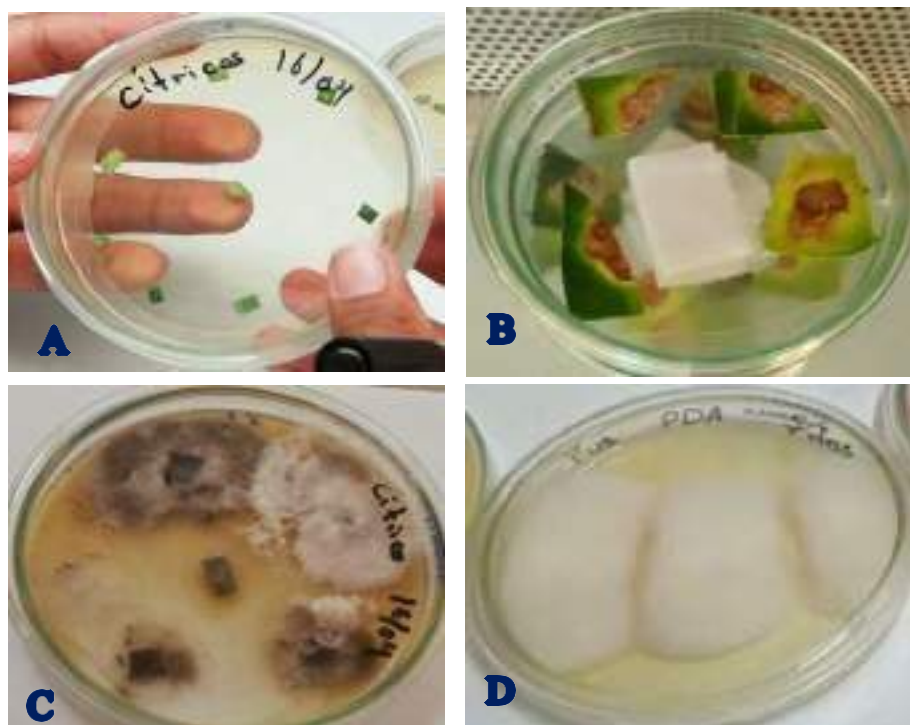


Figura 8. Aislamiento de hongos desde tejido vegetal enfermo: (A), Aislamiento a través de un medio de cultivo; (B), Aislamiento mediante el método de cámara húmeda; (C), crecimiento de los hongos en PDA; (D), Obtención del cultivo puro. Fotografía: A. Huamán. (2019).

6.3. Variables evaluadas

6.3.1. Etapa 4. Evaluación

Después de haber obtenido los cultivos puros, se procedió a describir y caracterizar la morfología de los aislamientos. Las observaciones macroscópicas se han realizado en los tres medios de cultivo (PDA, Agar Sabouraud y el Agar en jugo V8), mientras que las observaciones microscópicas se realizaron únicamente en un medio de cultivo de referencia PDA.

a) Descripción macroscópica

1) Crecimiento micelial

Después de agregar el medio de cultivo PDA y solidificado se trazaron dos ejes (A y B) al reverso de la placa de Petri (Figura 9C), lográndose un punto de inserción en el cruce de ambos ejes. La siembra se realizó colocándose trozos de hifa del hongo en el centro del medio de cultivo (equivalente al punto de inserción del anverso) (Figura 9A). Las placas sembradas se incubaron a una temperatura de 26 °C, durante el tiempo que duró la evaluación (Figura 9D). Se midió el diámetro de crecimiento de la colonia cada 24 horas, con la ayuda de una regla graduada de 20 cm basándose en los ejes A y B. La longitud total del micelio se dividió entre el número de días totales para obtener el crecimiento longitudinal por día en centímetros. Esta forma de medición se repitió en los 3 medios de cultivo.



Figura 9. Preparación de las muestras para la evaluación macroscópica y microscópica, (A), siembra de cepa puro en estudio, (B), encintado, (C), trazado de los ejes en el anverso, (D), incubación a 26 °C. Fotografado por: A. Huamán. (2019).

Para el análisis del crecimiento micelial se utilizó el modelo estadístico completamente al azar, considerando tres tratamientos con cuatro repeticiones. Las medias de los resultados obtenidos en las evaluaciones del crecimiento micelial (cm/día) fueron sometidos a la prueba de Tukey con un valor crítico de $p = 0.05$ para las comparaciones múltiples, el modelo aditivo lineal es el siguiente:

$Y_{ij} = u + t_i + e_{ij}$	$i =$ medio de cultivo (3) $j =$ repeticiones (5)
-----------------------------	--

Donde:

Y_{ij} = crecimiento micelial en cm/día, con el i – ésimo medio de cultivo, en la j – ésima repetición.

U = efecto de la media general del crecimiento micelial.

T_i = efecto del i – ésimo medio de cultivo.

E_{ij} = efecto del error experimental.

Tabla 3

Análisis de varianza.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P - Valor
Tratamiento	T-1	2			
Error experimental		9			
Total	T*R-1	11			

Fuente: Elaboración propia

2) Color de la colonia

Después de los 7 días de incubación en los tres medios de cultivo, se determinó el color de la colonia mediante observación directa, registrando el color del centro, borde e interior de la colonia.

3) Forma y aspecto de crecimiento

Se realizó mediante observación directa la característica externa de crecimiento de la colonia

respecto al medio de cultivo, debido a que los hongos presentan diferente aspecto de hifa

según el tipo de nutrición. La evaluación se realizó a los siete días en los tres medios de cultivo.

b) Descripción microscópica

Desde los aislamientos obtenidos en medios de cultivo PDA, con la ayuda de un estilete, se recogió una pequeña porción de la muestra conteniendo micelio del patógeno puro, el cual se depositó sobre la lámina portaobjeto conteniendo una gota de azul de metileno, después se tapó con la laminilla cubre objetos para luego se observó al microscopio óptico. Se evaluó las características que se detallan a continuación:

1) Descripción de las estructuras del hongo

Se evaluó la presencia de estructuras de reproducción asexual: características de hifa, conidióforo y conidia. Estructuras de conservación: formación de esclerote y/o clamidosporas. Para la visualizar estas estructuras fúngicas se utilizó un microscopio compuesto mediante el objetivo de 40X y ocular de 10X.

2) Determinación del diámetro de la hifa y longitud de conidia.

Para la medición del diámetro de hifa y longitud de conidia, se realizó con la ayuda de un microscopio compuesto. Previamente se ha calibrado con una lámina de vidrio calibrada a escala micrométrica para cada objetivo del microscopio. La medición se realizó en estructuras del hongo de 7 días de edad cultivadas en medio PDA.

3) Determinación del género del hongo

Para identificar el hongo aislado a partir de la “mancha marrón”, se observó las estructuras vegetativas (hifa y esclerotes) al microscopio. Para determinar el género se utilizó las claves taxonómicas propuestas por Barnett y Hunter (1972).

VII. RESULTADOS

7.1. Obtención de los hongos aislados

De las 15 muestras con síntoma de “mancha marron” se logró aislar dos cepas de hongos, empleando dos métodos descritos anteriormente: (medio de cultivo y cámara humedad), las características macro y microscópicas indican que las cepas pertenecen a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp.

7.2. Descripción macroscópica

7.2.1. Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp

- a) Crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn observados sobre PDA, Agar Sabouraud y Agar con jugo V8.

Los resultados del crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn, en los tres medios de cultivo se muestran en la (Tabla 4) donde se observa que en el medio Agar con jugo V8 hubo mayor desarrollo, alcanzando en el quinto día un diámetro de 9.2 cm, mientras que en los medios PDA y Agar Sabouraud presentaron un diámetro de 7.7 y 7.2 cm, respectivamente. De la misma forma, el crecimiento en centímetros por día del medio de cultivo Agar con jugo V8 es 0.92 el cual existe una diferencia de 0.21 y 0.15 cm respecto a los medios PDA y Agar Sabouraud, respectivamente.

El Análisis de varianza con un Alfa = 0.05 y un coeficiente de variación de 16.98 (Tabla 5) demuestra que el p-Valor es 0.1402, el cual indica que no existe diferencia significativa en el crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn en los tres medios de cultivo en (PDA, Agar Sabouraud y Agar con jugo V8). Para confirmar estos resultados se hizo la prueba de comparación de promedios de Tukey (Tabla 6), donde la Diferencia Mínima Significativa (DMS) fue 1.34. Estos dos análisis también nos confirman que estadísticamente no existe variabilidad en el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn en cualquiera de

los tres medios de cultivo. Para la encontrar una diferencia significativa se debe aumentar el número de repeticiones de manera que el coeficiente de variación sea menor.

Tabla 4

Crecimiento micelial de Rhizoctonia solani Kuhn (cm.día) en tres medios de cultivo evaluado al quinto día de edad.

Repeticiones	Tratamientos		
	PDA (cm.día)	Agar Sabouraud (cm.día)	Agar con jugo V8 (cm.día)
Placa 1	7.6	8.8	9.2
Placa 2	9.3	4.2	9.5
Placa 3	6.6	7.9	9.1
Placa 4	7.4	7.9	9.2
Promedio	7.7	7.2	9.2
Crecimiento por día	0.77	0.72	0.92

Fuente: Elaboración propia

Tabla 5

Análisis de la varianza del crecimiento micelial (cm.día) del hongo Rhizoctonia solani Kuhn en tres medios de cultivo evaluado al quinto día de edad.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P – Valor	
Tratamiento	T-1	2	2.29	1.14	2.46	0.1402
Error experimental		9	4.18	0.46		
Total	T*R-1	11	6.47			

Fuente: Elaboración propia (elaborado en InfoStat)

Tabla 6

Prueba de Tukey del crecimiento micelial (cm.día) de Rhizoctonia solani Kuhn en tres medios de cultivo evaluado al quinto día de edad.

Orden de merito	Medios de cultivo	Promedio	n	E.E.	
1°	Agar con jugo V8	4.61	4	0.34	A
2°	PDA	3.85	4	0.34	A
3°	Agar Sabouraud	3.58	4	0.34	A

Fuente: Elaboración propia (elaborado en InfoStat). n= 12 Error: 0.4647 gl: 9

- b) Crecimiento micelial del hongo *Fusarium* sp. observados en PDA, Agar Sabouraud y jugo V8.

Los resultados del crecimiento del hongo *Fusarium* sp., en los tres medios se muestran en la (Tabla 7) donde indica que el crecimiento en los tres medios son similares; pero en el medio Agar Sabouraud hay un mayor ligero desarrollo alcanzando en el décimo día un diámetro de 7.8 cm, mientras que en los medios Agar con jugo V8 y PDA al décimo día de evaluación presentan un diámetro de 7.7 y 7.5 cm respectivamente. Igualmente, el crecimiento en centímetros por día del medio de cultivo Agar Sabouraud es 0.39 existe una diferencia de 0.01 cm. respecto a los medios Agar con jugo V8 PDA.

El Análisis de varianza con un Alfa = 0.05 y un coeficiente de variación de 9.75 (datos homogéneos) (Tabla 8) muestra que el p-Valor es 0.86, el cual indica que no existe diferencia significativa en el crecimiento micelial del hongo *Fusarium* sp. en los tres medios de cultivo (PDA, Agar Sabouraud y Agar con jugo V8). Para confirmar estos resultados se hizo la prueba de comparación de promedios de Tukey (Tabla 9), donde la diferencia mínima significativa (DMS) fue 0.73822 Asimismo, esto confirma que no existe variabilidad en el crecimiento del hongo *Fusarium* sp. en cualquiera de los tres medios de cultivo.

Tabla 7

Crecimiento micelial (cm.día) del hongo Fusarium sp en tres medios de cultivo evaluado al décimo día.

Repeticiones	Tratamientos		
	PDA (cm.día)	Agar Sabouraud (cm.día)	Agar con jugo V8 (cm.día)
Placa 1	8	7.9	8.2
Placa 2	8.4	4.1	7.7
Placa 3	6.2	7.5	8.4
Placa 4	7.45	7.8	6.5
Promedio	7.5	7.8	7.7
Crecimiento (cm.día)	0.38	0.39	0.38

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8

Análisis de la Varianza del crecimiento micelial (cm.día) del hongo Fusarium sp. en tres medios de cultivo evaluado al décimo día.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F	P – Valor	
Tratamiento	T-1	02	0.04	0.02	0.15	0.8616
Error experimental		9	1.26	0.14		
Total	T*R-1	11	1.30			

Fuente: Elaboración propia (elaborado en InfoStat) n= 12 Error: 0.5688 gl: 9

Tabla 9

Prueba de Tukey del crecimiento micelial (cm.día) de hongo Fusarium sp. en tres medios de cultivo evaluado al décimo día.

Orden de merito	Medios de cultivo	Promedio ó media	n	E.E.	
1°	Agar Sabouraud	3.90	4	0.19	A
2°	Agar jugo V83	3.85	4	0.19	A
3°	PDA	3.76	4	0.19	A

Fuente: Elaboración propia (elaborado en InfoStat)

7.2.2. Color de la colonia

El hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn presenta el mismo color de la de colonia observados en los tres medio de cultivo (Figura 10 A-C). Sin embargo, el color de colonia de *Fusarium* sp. cambia de acuerdo al medio de cultivo (Figura 10 D-F).

Después de los 7 días de incubación, se determinó el color de la colonia tanto para *Rhizoctonia solani* Kuhn como para *Fusarium* sp. (Figura 10), (Tabla 10) en los tres medios de cultivo (PDA, Agar Sabouraud y Agar jugo V8). Los resultados muestran que el color de la colonia para *Rhizoctonia solani* Kuhn en los tres medios de cultivo es blanco (Figura 10A - C) tanto en el borde interior de la placa y con un ligero oscurecimiento en centro de la placa.

En el caso de *Fusarium* sp el color de la colonia cambia de acuerdo al medio de cultivo, comportándose con una pigmentación más intensa en PDA; roja púrpura en el centro, ligeramente purpura en el interior y cremoso en el borde de la placa (Figura 10D), de la misma forma en el medio Agar Sabouraud, toma un color cremoso y ligeramente purpura en el interior y centro de la placa respectivamente (Figura 10E), y en el medio Agar con jugo V8 la colonia de *Fusarium* sp toma un color blanco tanto en el borde interior y centro de la placa (Figura 10 F).

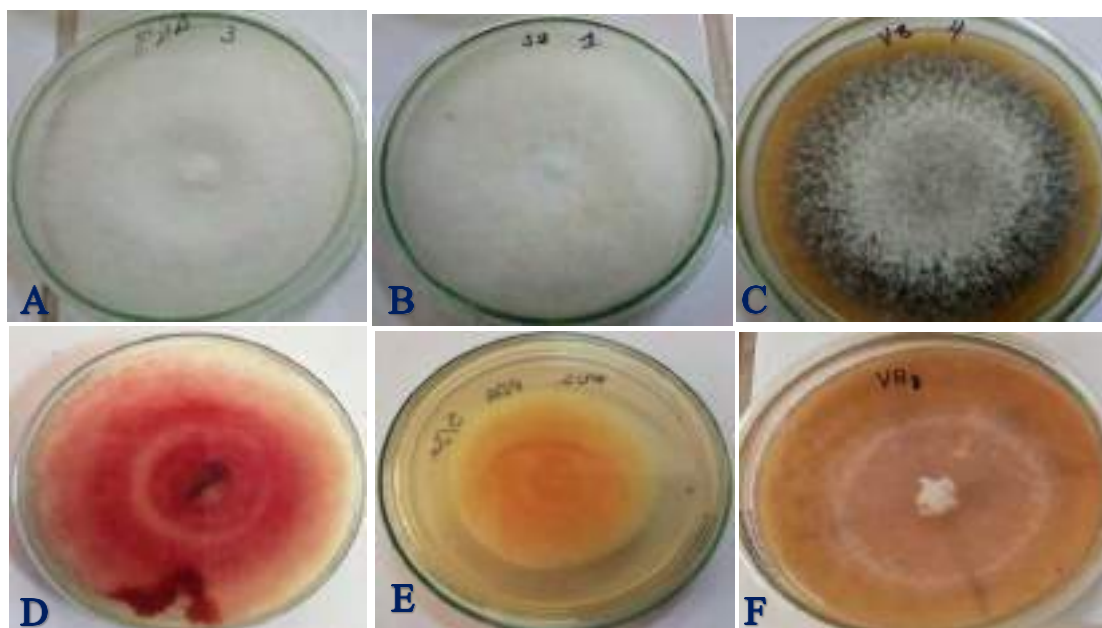


Figura 10. Coloración de las colonias *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. : (A), *Rhizoctonia solani* en PDA, (B), *Rhizoctonia solani* en Agar Sabouraud (C), *Rhizoctonia solani* en Agar más jugo V8, (D), *Fusarium* sp en PDA, (E), *Fusarium* sp en Agar Sabouraud, (F), *Fusarium* sp en Agar más jugo V8. Fotografiado por: A. Huamán. (2019).

Tabla 10

Descripción del color de colonia observados en PDA, Agar Sabouraud y Agar jugo V8. Evaluados en el centro, borde e interior de la placa.

Hongos		PDA	Agar Sabouraud	Agar jugo V8.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Borde	Blanco	Blanco	Blanco
	Interior	Blanco	Blanco	Blanco
	Centro	Blanco	Blanco	Blanco
<i>Fusarium</i> sp	Borde	Blanco	Blanco	Blanco
	Interior	Ligero fucsia	Ligero cremoso	Blanco
	Centro	Fucsia intenso	Ligero fucsia	Blanco

Fuente: Elaboración propia

7.2.3. Forma y aspecto de crecimiento

Para describir la forma de crecimiento se realizó la observación directa de las colonias, y se determinó que tanto *Rhizoctonia solani* como *Fusarium* sp., tienen un crecimiento radial en los tres medios de cultivo (Tabla 11). Por otro lado, el aspecto de crecimiento varía de acuerdo al medio de cultivo (Figura 11A-C), donde *Rhizoctonia solani* Kuhn, tienen un aspecto más algodonoso, en el medio PDA, seguido de Agar Sabouraud y ligeramente algodonoso en el medio Agar con jugo V8.

Las colonias de *Fusarium* sp. tiene un aspecto algodonoso en el medio de cultivo PDA (Figura 11 D); Para el medio medio Agar Sabouraud presentó un aspecto de crecimiento compacto (Figura 11E), finalmente en el jugo V8 se observó un aspecto de crecimiento sumergido medio de cultivo Agar con jugo V8 (Figura 11E).

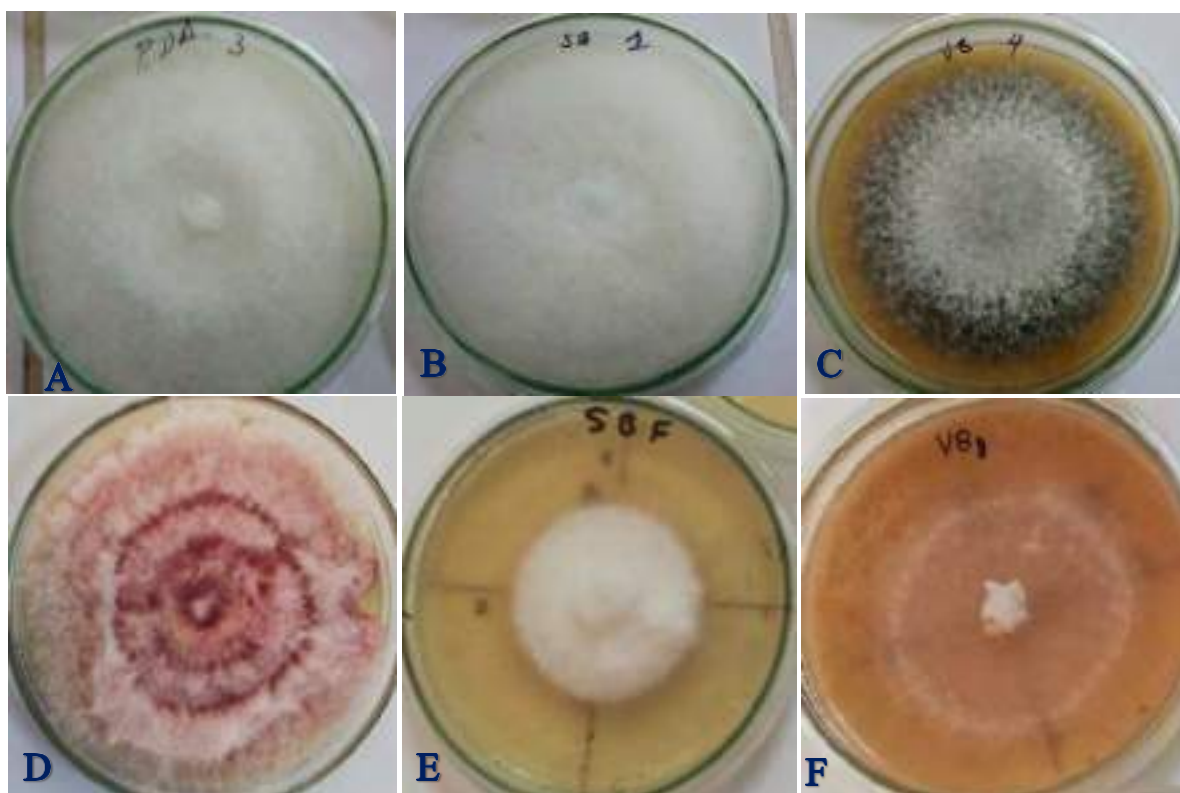


Figura 11. Forma y aspecto de crecimiento de las colonias *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp. *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* sp muestran un tipo de crecimiento radial; (A), *Rhizoctonia solani* en PDA, (B), *Rhizoctonia solani* en Agar Sabouraud (C), *Rhizoctonia solani* en Agar más jugo V8, (D), *Fusarium* sp en PDA, (E), *Fusarium* sp en Agar Sabouraud, (F), *Fusarium* sp en Agar más jugo V8. Fotografiado por: A. Huamán. (2019).

Tabla 11

Descripción la forma y aspecto de crecimiento

Hongos	Forma de crecimiento.	Aspecto de crecimiento		
		PDA	Agar Sabouraud	Agar jugo V8.
<i>Rhizoctonia solani</i>	Crecimiento radial	Fuertemente algodonoso	Algodonoso	Ligeramente algodonoso
<i>Fusarium Sp</i>	Crecimiento radial	Algodonoso	Algodonoso compacto	Sumergido en medio de cultivo

Fuente: Elaboración propia

7.3. Descripción microscópica

Con la ayuda de un microscopio compuesto, se describió las siguientes características.

7.3.1. Descripción de las estructuras del hongo

- a) Estructuras del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn observados bajo un microscopio compuesto.

En la (Figura 12A) se observó en micelio de *Rhizoctonia solani* Kuhn; en cual presento hifas septadas con una ramificación en forma de T formando casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal, y se estrechan ligeramente formando constricciones el cual es una característica típica de *Rhizoctonia solani* Kuhn. La coloración observada fue claro o hialino, carece de cuerpos de fructificación. Se observó esclerotes (Figura 12B), de color oscuro de forma variada, los esclerotes son una agrupación de hifas con la finalidad de conservarse en el tiempo, no obstante dada las condiciones se desarrollara una nueva colonia.



Figura 12. Características morfológicas observadas bajo un microscopio compuesto, (A), hifa de *Rhizoctonia solani*, (B), Esclerotes. Fotografado por: Y. Calle (2019)

b) Estructuras del hongo *Fusarium* sp. observados bajo un microscopio compuesto mediante.

Se observó el micelio de *Fusarium* sp, (Figura 13A) en el que se distinguió las hifas septadas hialino que sostiene a las fiálides, (Figura 13B), se muestra un micelio que sostiene a un a las fialides con esporadoquio en formación, (Figura 13C), fialides con esporadoquio simple y ramificadas con presencia de macro y micro conidias en formación.

En el presente estudio también se pudo observar las estructuras de reproducción y conservación, (Figura 14A), micro conidias unicelulares, hialino, no formando cadenas. Macro conidios forma típica de canoa con 3 a 7 septos transversales de color hialino. Finalmente se observó clamidosporas (Figura 14B), que fueron globosas, intercalares y producidas en cadenas.

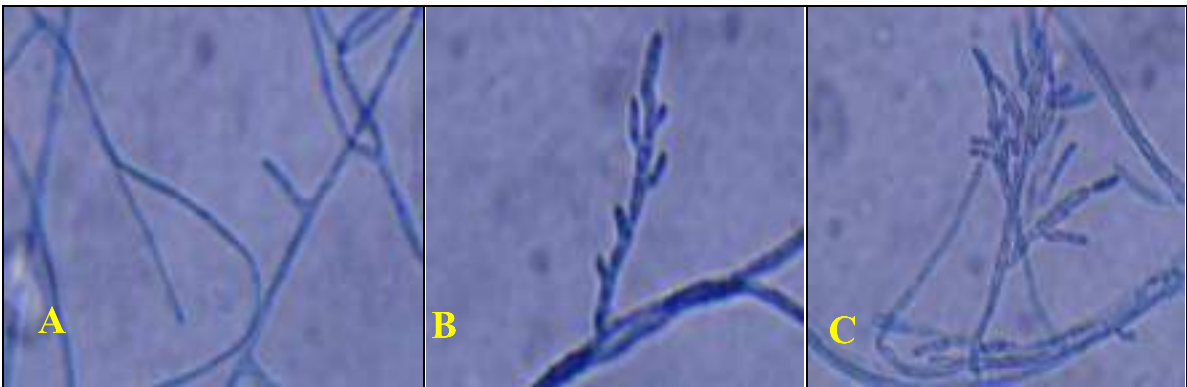


Figura 13. Características morfológicas observadas con un microscopio compuesto, (A), micelio del *Fusarium* sp, (B), conidióforo en formación, (C), conidióforo con estructuras completas. Fotografiado por: Y. Calle (2019)

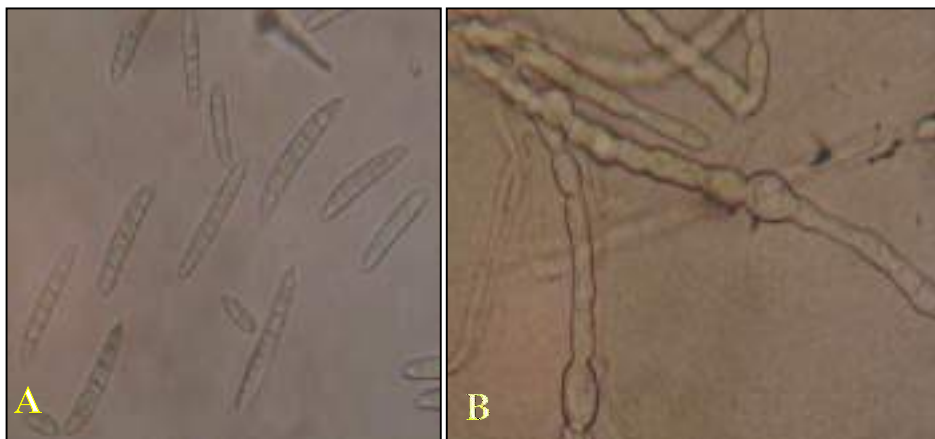


Figura 14. Características morfológicas observadas con un microscopio compuesto, (A), Macro y micro conidio, (B), Clamidospora. Fotografiado por: Y. Calle (2019)

7.3.2. Determinación del diámetro de la hifa, y longitud de conidia.

Mediante un microscopio compuesto y con la ayuda de la escala micrométrica se observaron y se determinó el diámetro de hifa y la longitud de conidia del hongo, mediante el objetivo de 40X y ocular de 10X, en el que se determinó lo siguiente:

- a) Características microscópicas, medición del diámetro de la hifa de *Rhizoctonia solani* Kuhn.

Se realizó 20 mediciones del cual se obtuvo un promedio de 3.5 unidades según la escala micrométrica esto se multiplicó por un factor de 2.08 micras que equivale cada línea del micrómetro según la calibración realizada, lo que equivale a 6.28 micras, característico en esta especie (Figura 15).



Figura 15. Medición del diámetro de la hifa de *Rhizoctonia solani* con una escala micrométrica calibrada. Fotografado por: Y. Calle (2019)

- b) Características microscópicas, medición del diámetro de la hifa de *Fusarium* sp.

De la misma forma se realizó 20 mediciones del cual se obtuvo un promedio de 1.1 según la escala micrométrica esto se multiplicó por un factor de 2.08 que equivale cada línea del micrómetro donde se obtiene un promedio de 2.28 micras, ver (Figura 16A). Finalmente para conocer la longitud de la conidia del mismo modo se hizo 20 mediciones ver (Figura 16B) obteniendo un promedio de 13 según la escala micrométrica esto se multiplicó por un factor de 2.08 que equivale cada línea del micrómetro según la calibración realizada se tuvo en promedio 27.04 micras para las macro conidias, con una variación de \pm tres micras.

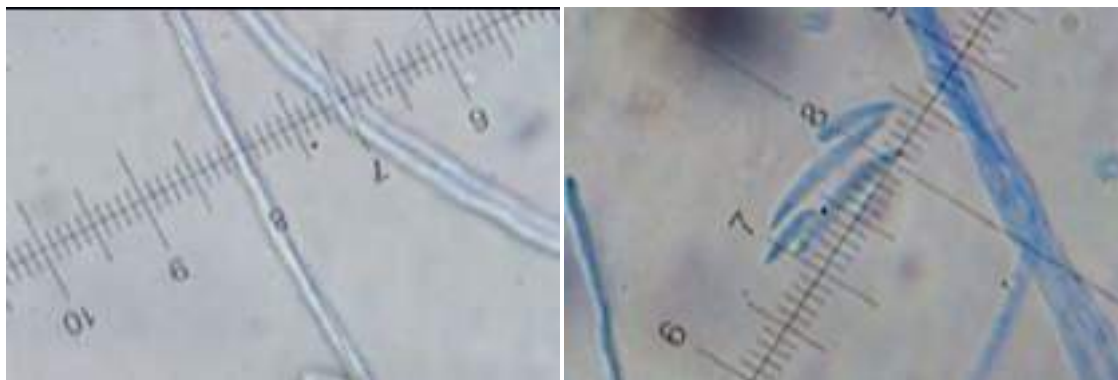


Figura 16. Medición del diámetro. (A), Medición de la hifa de *Fusarium* sp, (B), medición de la macro conidia de *Fusarium* sp. Fotografado por: Y. Calle (2019)

7.3.3. Determinación de la especie del hongo

Para la caracterización del género primero se describió las características a nivel de la taxa familia, determinándose el grupo de Agonomycetacea y Tuberculareaceae; luego se corrió la clave taxonómica para género. Con esta descripción secuencial de la clave se llegó a concluir identificando los géneros de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp.

a) Identificación de *Rhizoctonia solani* Kuhn

1) Familia Agonomycetaceae o mycelia sterilia

No produce conidia, usualmente forma estructura de sobrevivencia como esclerotes. Esclerotes variable desde pálido hasta marrón oscuro o negro, formado en grupos.

2) Identificación del género y especie *Rhizoctonia solani* Kuhn

- Micelio hialino
- Células de micelio usualmente largas
- Tabiques de ramas usualmente salidos de las hifas principales
- Conidios ausentes
- Células similares a clamididosporas en cadenas.
- Esclerocios de color marrón o negro y mal formados
- Produce ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal y se estrechan ligeramente al nivel de la bifurcación

b) Identificación de *Fusarium* sp.

1) Familia Tubercularaceae

Conidia típicamente compacto, dentro de un paquete llamado esporodoquio, normalmente no se desarrolla en cultivos artificiales.

2) Identificación del género *Fusarium* sp.

- Conidoforo formado dentro de un esporodoquio, el esporodoquio se formó pobremente en el medio de cultivo PDA.
- Macro conidia con más de dos células.
- Conidia hialina,
- Conidia delgada, hialina y formada en masa.
- Macro conidia forma típica de canoa, y micro conidia de una sola célula.

Para la identificación de especie de *Fusarium* se requiere realizar otras pruebas como la caracterización de la conidias ya que diversos estudios muestran la caracterización morfológica hasta especie solo por la forma tamaño y número de septos de la conidia.

VIII. DISCUSIÓN

8.1. Descripción macroscópica

8.1.1. Crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp

- a) Crecimiento micelial del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn observados sobre PDA, Agar Sabouraud y Agar con jugo V8.

Garrido (2016) sostiene que la *Rhizoctonia solani* Kuhn es un patógeno que se diseminan rápidamente y tiene una alta velocidad de crecimiento estos resultados respaldan a los resultados encontrados en la investigación.

- b) Crecimiento micelial del hongo *Fusarium* sp. observados en PDA, Agar Sabouraud y jugo V8.

Estos resultados no coinciden con lo informado por Duarte, Echevarría y Martínez (2016) donde obtuvo el menor crecimiento de 0,26 cm/día de *Fusarium* en el medio PDA probablemente se deba a la diferencia de género.

8.1.2. Color de la colonia

Los resultados del color de colonia para *Rhizoctonia solani* Kuhn son similares con los informados por Garrido (2016), sobre el color de la colonia donde indica que *Rhizoctonia solani* Kuhn en los primeros estadios es incoloro y en seguida se torna de color amarillo a café conforme alcanza su madurez. Sin embargo para *Fusarium* sp estos resultados son similares con los informados por Duarte, Echevarría y Martínez, (2016), sobre el color de la colonia para el caso del medio PDA, donde presenta coloraciones desde violáceo blanquecino rojo ladrillo, lila, rojo salmón y rojo vino, el color de la colonia depende de la edad, tipo de medio de cultivo.

8.1.3. Forma y aspecto de crecimiento

Estos resultados son similares con los informados por Duarte, Echevarría y Martínez, (2016), donde mostró textura afelpada lobulada para medio de cultivo PDA. Asimismo, Tapia y Amaro (2014), muestran que el aspecto de crecimiento del micelio para *Fusarium* sp. en el medio PDA y sabouraud es algodonosa y compacta respectivamente.

8.2. Descripción microscópica

Con la ayuda de un microscopio compuesto, se describió las siguientes características.

8.2.1. Descripción de las estructuras del hongo

- a) Estructuras del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn observados bajo un microscopio compuesto.

Estos resultados son similares con los informados por Garrido (2016), donde indica que el micelio de *Rhizoctonia solani* Kuhn consta de células alargadas y se bifurca en ángulo recto con respecto a la hifa principal y presentan hifas septadas. Asimismo, se asemejan a las reportadas por Rivera y Gómez (2012), donde mencionan que la hifa es hialina y septada con presencia de constricción a la altura del tabique y ramificadas en ángulo recto con respecto a la hifa principal y esclerocios de forma globosa. En el estudio no se observó la presencia de conidias o esporas por lo que es considerado como un hongo estéril; Sin embargo, diversos estudios reportan a *Rhizoctonia solani* Kuhn en su estado perfecto o fase sexual como (*Thanatephorus cucumeri*). Agrios (2005), este hongo es capaz de formar estructuras reproductivas como basiosporas en condiciones ambientales especiales (alta humedad y temperatura), (Barahona, 2012; Garrido, 2016). condiciones que presenta la localidad de Kiteni.

- b) Estructuras del hongo *Fusarium* sp. observados bajo un microscopio compuesto mediante

Duarte, Echevarría y Martínez (2016). Realizo una identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp en el menciona que el macro conidio presenta septos siendo de 3 a 6 dependiendo de la especie. Lo cual coincide con los datos de la investigación, este

hongo al tener varias estructuras de propagación (hifa, clamidospora, macro y microconidias) su propagación es más rápida si se da las condiciones con la alta humedad.

8.2.2. Determinación del diámetro de la hifa, y longitud de conidia.

- a) Características microscópicas, medición del diámetro de la hifa de *Rhizoctonia solani* Kuhn

Estos resultados son similares con los informados por Garrido (2016), donde indica que el micelio de *Rhizoctonia solani* Kuhn por lo general miden de 8 a 12 μm de diámetro.

- b) Características microscópicas, medición del diámetro de la hifa y longitud de conidia de *Fusarium* sp

Las características microscópicas observadas en el estudio (hifa y macroconidias), son semejantes a las reportadas por Rivera y Gómez (2012), donde mencionan que la hifa es hialina y septada con macroconidia hialina y septada.

8.2.3. Determinación del género del hongo

- a) Identificación de *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp.

Barnett y Hunter (1972), proponen claves taxonómicas para la identificación de *R. solani* y *Fusarium* sp., en el que las características observadas coinciden con lo mencionado en cuanto a la morfología y el diámetro de la hifa de *Rhizoctonia solani*. También, para *Fusarium* sp., se observaron las macro conidias en forma típica de canoa, y micro conidia de una sola célula, finalmente con la medición de la macro conidia se confirmó la presencia de este género de hongo.

A los hongos de la Clase Agonomycetes se conoce como “hongos estériles”, ya que muchos autores aseguraban que es incapaz de producir algún tipo de esporas, ya sea de forma sexual y asexual. Sin embargo, en la actualidad se conoce que *Rhizoctonia solani*, puede producir esporas sexuales en su estado perfecto (*T. cucumeris*) esta fase solo ocurre cuando se dan condiciones ambientales, como humedad y temperatura muy elevadas, bajo esta forma perfecta puede causar daños en la parte foliar de la planta (Agrios, 1996). Durante la

investigación se observó *Rhizoctonia solani* Kuhn en la fase imperfecta, sin presencia de esporas, pero por las condiciones ambientales favorables y por los síntomas presentados en hoja no se descarta la posibilidad de que este hongo se encuentre en su fase perfecta causando severos daños en la planta de naranja variedad Washington Navel.

De acuerdo al trabajo de investigación desarrollado y comparado con la literatura el hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn, se desarrolla mejor en condiciones de alta humedad y temperatura, lo que la zona de Kiteni presenta al ser ceja de selva, por esta razón es posible sugerir que se realice la prueba de patogenicidad para poder determinar si *Rhizoctonia solani* Kuhn en la fase perfecta está causando este síntoma. Ya que existe una presencia de más de 80% de este daño en las plantaciones de naranja Washington Navel, esto con altos y bajos niveles de severidad de acuerdo a la estación en la que se encuentre, estos daños se observan forma de anillos concéntricos que producen la necrosis de tejidos jóvenes de la hoja que se emiten en la etapa de brotamiento, finalmente causan la defoliación de la planta.

IX. CONCLUSIONES

Se logró aislar dos cepas de hongos a partir de la “mancha marrón” de la naranja Washington Navel que mediante la caracterización macro y microscópica se identificó como los hongos *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp.

Mediante la descripción morfológica y macroscópica se logró determinar que *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium* sp., tienen la misma velocidad de crecimiento en los tres medios de cultivos utilizados. En cuanto a color, *Fusarium* sp. presenta una coloración violácea en PDA, y tiene crecimiento escaso en V8. *R. solani* Kuhn tiene micelio color blanco cremoso en medio Sabouraud y PDA, mientras en V8 color blanco grisáceo.

El hongo *R. solani* Kuhn no formó esporas de tipo asexual, desarrollando únicamente hifas de 6.8 μm de diámetro, con característica constricción de hifa en el punto de ramificación. El hongo *Furarium* sp logró formar macroconidias en forma de canoa, microconidias unicelulares, y clamidosporas; el diámetro de hifa de este hongo fue de 2.28 μm .

X. RECOMENDACIONES

Se recomienda investigar sobre estos dos patógenos y realizar la prueba de patogenicidad y encontrar el agente causante específico de la “mancha marrón” de la naranja Washington Navel.

Finalmente se recomienda investigar temas referentes a control realizando la prueba de sensibilidad, para encontrar un fungicida eficaz para controlar este hongo.

XI. REFERENCIAS

- Acuña, I. y Araya, M. (2017). Fitopatología – Enfermedades de la papa: Rizoctoniasis de la papa Rizoctoniasis de la papa. Recuperado de <http://www.inia.cl/wp-content/uploads/FichasTecnicasSanidadVegetal/Ficha%2052%20Rizoctoniasis%20de%20la%20papa.pdf>
- Acuña, I. Manuel, A. (2017). Fitopatología enfermedades de la papa Rizoctoniasis de la papa, Instituto De Investigaciones Agropecuarias. Santiago de Chile: INIA sanidad vegetal.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology*. España: Limusa.
- Agustí, M. (2000). *Citricultura*. Barcelona: Aedos
- Alvarado, A., y Andrea, P. (2005). *Identificación de cepas patógenas de Fusarium causantes de nueva patología en el cultivo de calas de colores bajo condiciones productivas de invernadero en Chile*. (Tesis de grado), Universidad Austral De Chile. Valdivia – Chile.
- Arguedas M., (2004) “Mal de hilachas” (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) en *Terminalia oblonga* (Ruiz & Pav.) Steud en Costa Rica, *Revista Forestal* 1(3), 1 - 4.
- Barnett, H.L. Y Hunter, B .B. (1972) *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. . 4th Edition
- Corporación para el Desarrollo Agropecuario de Nuevo León. (2015). *Situación de la Citricultura en Nuevo León*. México: CDANL.
- Duarte, Y., Echevarría, A. Y Martínez, B. (2016). Identificación y caracterización de aislamientos de *Fusarium spp*. Presentes en garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en Cuba. *Protección Veg*, 31 (3), 173-183
- EARTH. (2004). *Perfil de Producto Naranja*. Corta Rica: Universidad Earth

- French, E. R. y Herbert, T. T. (1980), métodos de la investigación fitopatológica, I.I.C.A. San José, Costa Rica.
- Garrido, C. R. (2016) *Evaluación de la actividad micoparasítica de 15 cepas de Trichoderma spp. frente a Rhizoctonia solani, utilizando frejol caupí (Vigna unguiculata) en laboratorio.* (Tesis de grado), Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú.
- Hernández, R. (2016). Guía de síntomas y daños del mal de panamá, *Fusarium oxysporum* f. sp *Cubense* raza 4 tropical. Recuperado de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/172435/Guia_de_sntomas_y_daos_de_Mal_de_Panam_.pdf.
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2012). *Manejo fitosanitario del cultivo de cítricos.* Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Latorre, B. (2004). *Enfermedades de las plantas cultivadas.* Ediciones UC
- Lezcano, J. C., Martínez, B. y Alonso, O. (2012). Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas. *Pastos y Forrajes*, 35(2), 187-196.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2011). *Las variedades de cítricos.* España: MAPAMA.
- Padrón C., J. E. y Rocha P., M. A. (2007). *Variedades Comerciales de Cítricos para Nuevo León y Tamaulipas.* México: INIFAP.
- Pardo A., V. P. (2004). La importancia de las vitaminas en la nutrición de personas que realizan actividad físicodeportiva. *Revista física.deporte*, 4 (16), 233 – 242.
- Quilambaqui, M. A. (2005). Aislamiento e Identificación de Especies de *Fusarium* spp Asociadas al Declinamiento del Espárrago (*Asparagus officinalis* L.) en cinco Municipios de Guanajuato, México. *Revista Tecnológica-ESPOL*, 18(1), 135-140.

- Retana, K., Ramírez, J. A., Castro, O. y Blanco, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. sp. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115-126.
- Rivera, M. V., y Gómez, L. C. (2012). Identificación y patogenicidad de *Fusarium* spp y *Rhizoctonia solani* en cultivos de arroz del Cesar. *Colombiana de Microbiología Tropical*, 2(1), 63- 68.
- Rodríguez, D. (2009) *Curso de Cultivos Protegidos*. España: Instituto San Pablo.
- Ruano, J. R. (2008). *Viveros Forestales*. México: Aedos.
- Sánchez, E. (2018). *Mustia hilachosa del frijol Thanatephorus cucumeris (Frank) Donk en la Provincia de Coronel Portillo, departamento de Ucayali*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima – Perú.
- Talledo, A. M. (2016). *Comportamiento de 10 cultivares de espárrago a Fusarium Oxysporum schlecht f. sp. asparagi Cohen y Meloidogyne incognita (Kofoid & White, 1919) Chitwood 1949*. (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria La Molina, La Molina, Perú.
- Tapia, C., y Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Chilena de infectología*, 31(1), 85-86.

XII. ANEXOS

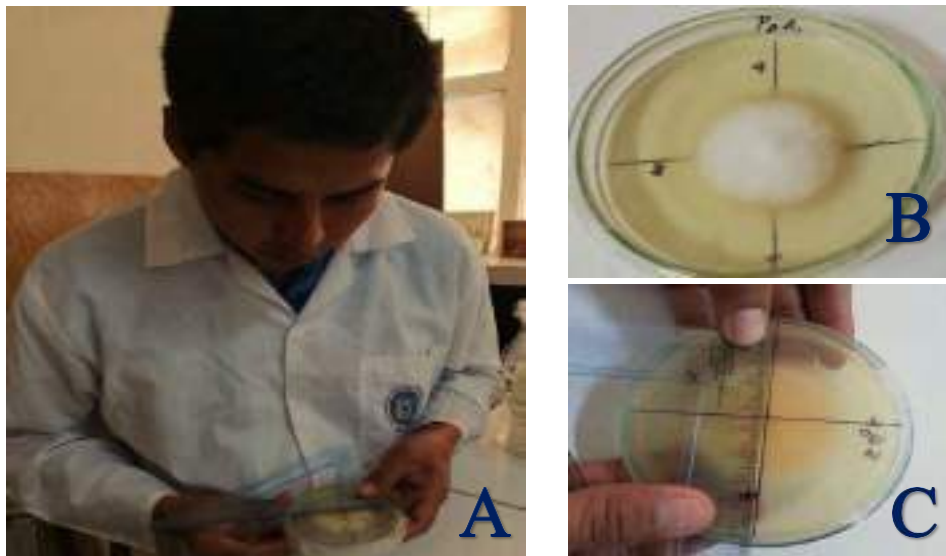


Figura 17. Medición del hongo. (A), medición con una regla graduada, (B), Crecimiento de los hongos en los ejes A y B, (C), regla graduada en el eje B. Fotografiado por: A. Huamán. (2019).