

**Evaluación de tratamientos para el control de hongos asociados a la yautía  
(*Xanthosoma* spp. Schott) selección Nazareno y el mal seco bajo condiciones de  
invernadero y laboratorio**

Por

Roberto C. Soto Esguerra

Tesis sometida en cumplimiento parcial  
de los requisitos para el grado de

Maestro en ciencias  
En  
Protección de Cultivos

UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO  
RECINTO UNIVERSITARIO DE MAYAGÜEZ  
2017

Aprobado por

---

Ángel Bosques Vega, M.S.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Agenol González Vélez, M.S.  
Miembro, Comité Graduado

---

Fecha

---

Mildred Zapata Serrano, Ph. D.  
Presidente, Comité Graduado

---

Fecha

---

Elvin Román Paoli, Ph. D.  
Director del Departamento

---

Fecha

---

Silvestre Colón Ramírez, M.S.  
Representante de Estudios Graduados

---

Fecha

## ABSTRACT

The tanier (*Xanthosoma* spp.) is an edible aroid of nutritional value and of economic importance for many tropical countries. During the past thirty years, the production of tanier in Puerto Rico has decreased by more than 90%. The main factor has been the disease locally known as "mal seco", which causes root rot, reduced yield and death of plants. The purpose of this research was to evaluate different treatments for the control of the fungi associated with the root rot disease on tanier under greenhouse and in vitro conditions. In Phase 1, biological products and a fungicide-bactericide were tested in 'Nazareno' in soil managed in two different ways under greenhouse conditions: (1) fallow soil (**FAS**), without sowing tanier for three years, and (2) soil of continuous use (**SC**), previously planted with tanier. Eight treatments (**Ts**) were tested in a randomized complete block design for each soil. No statistical differences between Ts were found. FAS had higher corms and root weights and a lower root damage percentage compared to SC. In Phase 2, fungi were isolated from soil and roots samples obtained from the two soil types. Thirty different fungi strains were identified. *Fusarium solani* was the only pathogen associated with the root rot disease found in the greenhouse samples and the most frequent in the population. The 30 strains of fungi were evaluated in pathogenicity tests (**PT**) at greenhouse and in vitro conditions. *F. solani*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* were included in the trials. In the greenhouse's PT the only fungi causing significant damage to the buds and inhibiting root development was *S. rolfsii*. Corm discs were used to determine the virulence of the fungi under in vitro conditions. The most virulent fungi were: *Aspergillus niger*, *F. solani* strain 1, *F. solani* strain 2 and *S. rolfsii*. In Phase 3, Ts for the control of the pathogenic fungi found in the in vitro PT were evaluated. *Trichoderma harzianum* and *Scolecobasidium* spp. were selected as potential biocontrol fungi of the pathogens associated with the root rot disease. Two in vitro control experiments were performed: on potato dextrose agar (PDA) and on corm discs. Fungi used were *R. solani* (**Rs**), *Pythium* spp. (**Py**), *F. solani* 1 (**Fs** 1), *F. solani* 2 (**Fs** 2) and *A. niger* (**An**). Commercial Ts used were CuOH (Kocide 3000®), Serenade® and Bioplex® and the non-commercial ones were the

fungi *T. harzianum* (***Thar***) and *Scolecobasidium* spp. (***Scol***). In the PDA tests, the pathogen growth and the area of inhibition caused by the Ts were measured for seven days in two factorial design assays: one with commercial Ts (6 x 4) and one with non-commercial Ts (6 x 3). CuOH didn't inhibit the growth of pathogenic fungi with results equal to the Control. Serenade® was better than Bioplex® inhibiting *Fs* 1, *Py* and *Sr*, whereas Bioplex® was better inhibiting *Fs* 2 and *Rs*, although not significantly. *Thar* was able to inhibit the growth of *Sr* and the other pathogens much more than *Scol*. In the second experiment, corm discs were inoculated in two different modes and times: pre-treatment (inoculation with the pathogen after the tissue was submerged in the T), and post-treatment (inoculation with the pathogen before the tissue was sprayed with the T). In the pre-treatment trial, CuOH was better in the control of *Rs*, *Scol* and *Thar* were better in the control of *An*, and *Thar* in the control of *Sr*. In the post-treatment trial, Serenade® and *Scol* were the best Ts. In the simple effects, *Scol* was better at the control of *Sr*, Serenade® was better at the control of *Fs* 1, *Fs* 2 and *Rs*, and CuOH at the control of *An*. The evaluated Ts have potential to give protection to the tanager seed at field level.

## RESUMEN

La yautía (*Xanthosomas* spp.) es un aroide comestible de valor nutricional y de importancia económica para muchos países tropicales. Durante treinta años, la producción de yautía en Puerto Rico ha mermado más de un 90%. El principal factor ha sido la enfermedad conocida como “mal seco”, que provoca la pudrición de raíces, reducción del rendimiento y muerte de las plantas. El propósito de esta investigación es evaluar diferentes tratamientos para control de los hongos asociados al mal seco de la yautía a nivel de invernadero y laboratorio. En la Fase 1, se probaron productos biológicos y un fungicida-bactericida en yautías de selección Nazareno sembrado en suelo de dos manejos distintos bajo condiciones de invernadero: suelo en descanso (**SD**), sin sembrar yautía por tres años, y suelo de uso continuo (**SC**), suelo donde se ha sembrado yautía anteriormente. Se probaron 8 Tratamientos (**Ts**) en un diseño de bloques completos aleatorizados para cada manejo de suelos. No hubo diferencias estadísticas entre los Ts. SD tuvo mayor peso de cormos y raíces y un % de daño en raíces menor que el SC. En la Fase 2 se aislaron hongos de muestras de suelo y raíces de las plantas de los dos manejos de suelo. Se identificaron 30 cepas de hongos. *Fusarium solani* fue el único patógeno asociado al mal seco encontrado en las muestras de invernadero y el más frecuente en la población. Se evaluaron los hongos en pruebas de patogenicidad (**PP**) a nivel de invernadero e *in vitro*. Se utilizaron los hongos asociados al mal seco *F. solani*, *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*. En las PP en invernadero, *S. rolfsii* fue el único que causó daño significativo a las yemas e inhibió el desarrollo de las raíces. Los hongos más virulentos en las PP *in vitro* en discos de cormos fueron: *Aspergillus niger*, *F. solani* cepa 1, *F. solani* cepa 2 y *S. rolfsii*. En la Fase 3, se probaron tratamientos bajo condiciones *in vitro* para el control de los hongos más virulentos de las PP *in vitro* en discos de cormos. Se seleccionaron a *Trichoderma harzianum* y *Scolecobasidium* spp. como potenciales hongos biocontroladores de los patógenos asociados al mal seco. Se realizaron dos experimentos de control de patógenos *in vitro*: una en medio de cultivo de papa y dextrosa (PDA) y otra sobre los discos de cormos. Los hongos patógenos fueron: *A. niger* (**An**), *F. solani* 1 (**Fs 1**), *F. solani* 2 (**Fs 2**), *Pythium* spp. (**Py**), *R. solani* (**Rs**) y *S. rolfsii* (**Sr**). Los Ts comerciales utilizados fueron CuOH (Kocide 3000®), Serenade® y

Bioplex® y los no comerciales fueron *T. harzianum* (*Thar*) y *Scolecobasidium* spp. (*Scol*). En el experimento de control de patógenos en PDA, se midió el crecimiento de los patógenos y el área de inhibición causada por los Ts durante siete días en dos ensayos de diseño factorial: uno con los Ts comerciales (6 x 4) y otro con los Ts no comerciales (6 x 3). En el ensayo con los Ts comerciales, el CuOH no inhibió el crecimiento de los hongos patógenos teniendo resultados igual al Control. Serenade® fue mejor que Bioplex® inhibiendo a *Fs* 1, *Py* y *Sr*, mientras que Bioplex® fue mejor inhibiendo a *Fs* 2 y *Rs*, aunque no significativamente. En el ensayo con los Ts no comerciales, *Thar* inhibió el crecimiento de *Sr* y los otros patógenos más que *Scol* en comparación con el Control. En el experimento de control en discos de cormos, se utilizó el mismo método de las PP in vivo y se inocularon los tejidos en dos modos y tiempos diferentes: pre-tratamiento, se inoculó después de sumergir el tejido en el T, pos tratamiento, se inoculó antes de asperjar el tejido con el T. En el ensayo pre tratamiento, el CuOH fue mejor controlando a *Rs*. *Scol* y *Thar* controlaron mejor a *An*, y *Thar* fue mejor controlando a *Sr*. En el ensayo pos tratamiento, los Ts con mejor control fueron Serenade® y *Scol*. En los efectos simples, *Scol* fue mejor controlando a *Sr*, Serenade® fue mejor controlando a *Fs* 1, *Fs* 2 y *Rs* y CuOH a *An*. Los Ts evaluados tienen potencial a nivel de campo para dar protección a la semilla de yautía.

## **DEDICATORIA**

Este trabajo que hice con mucho esfuerzo lo entrego como ofrenda a Dios, que me dio la fortaleza, paciencia y sabiduría para terminarla. Sin Él, nada de esto sería posible. Gracias, Dios mío.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo el Amor que me tiene y porque me permite entregar un trabajo de esta magnitud, solo porque Él lo quiere y permite.

A mi mentora, la Dra. Mildred Zapata, por aceptarme como su estudiante, guiarme con paciencia, compartir su experiencia científica y su intercesión para alcanzar las metas establecidas en esta investigación.

A mis padres por su apoyo, oración y siempre darme aliento y consejo cuando lo necesitaba.

Al Prof. Ángel Bosques por sus consejos y siempre proveer el material que necesitaba en mis experimentos.

A Ramón Fermín por ayudarme en los experimentos cuando necesitaba una mano amiga.

Al Prof. Agenol González por su disponibilidad y por aportar información importante para la investigación.

A la Dra. Sandra Maldonado por su ayuda en la identificación de algunos hongos.

A la Sra. Carolin Rivera por su cordialidad y por prestarme los equipos del laboratorio de micología médica en el edificio de Biología.

Al Dr. Raúl Macchiavelli y a la Dra. Linda Wessel-Beaver por su apoyo en los modelos y análisis estadísticos.

A todos mis compañeros de laboratorio por aportar y ayudarme a realizar este trabajo.

Al Proyecto FITDA 23 “Evaluación de alternativas para el control de la mancha bacteriana y el mal seco en la yautía selección Nazareno” por el financiamiento de esta investigación.

## Tabla de contenido

|       |   |       |
|-------|---|-------|
| 1     | Lista de tablas.....                          | xi    |
| 2     | Lista de figuras.....                         | xiii  |
| 3     | INTRODUCCIÓN.....                             | xv    |
| 4     | OBJETIVOS.....                                | xvi   |
| 5     | REVISIÓN DE LITERATURA.....                   | xvi   |
| 5.1   | Estudio general de la yautía.....             | xvi   |
| 5.1.1 | Origen de la yautía.....                      | xvi   |
| 5.1.2 | Morfología y fisiología.....                  | xvii  |
| 5.1.3 | Manejo del cultivo.....                       | xviii |
| 5.1.4 | Propagación.....                              | xviii |
| 5.2   | Características de la selección Nazareno..... | xviii |
| 5.3   | Origen de la yautía Nazareno.....             | xix   |
| 5.4   | Mal seco.....                                 | xix   |
| 5.5   | Control del mal seco.....                     | xx    |
| 5.5.1 | Químico.....                                  | xx    |
| 5.5.2 | Cultural.....                                 | xxi   |
| 5.5.3 | Biológico.....                                | xxii  |



|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1     | Fase 1: Evaluación de tratamientos biológicos, químicos e inductores de resistencia al mal seco en yautía sembrada en suelo con dos manejos distintos bajo condiciones de invernadero..... | 2  |
| 1.1   | INTRODUCCIÓN .....   | 2  |
| 1.2   | MATERIALES Y MÉTODOS .....   | 3  |
| 1.2.1 | Lugar de los experimentos.....   | 3  |
| 1.2.2 | Recolección de suelo .....   | 3  |
| 1.2.3 | Preparación para la siembra.....   | 3  |
| 1.2.4 | Diseño del experimento .....   | 5  |
| 1.2.5 | Procedimiento de aplicaciones .....  | 6  |
| 1.2.6 | Toma de datos en la siembra de suelo en descanso .....   | 7  |
| 1.2.7 | Procedimiento de cosecha: SC y SD .....  | 9  |
| 1.3   | RESULTADOS.....  | 11 |
| 1.3.1 | Datos de siembra de suelo en descanso .....  | 11 |
| 1.3.2 | Variables de cosecha .....   | 17 |
| 1.3.3 | Variables de cosecha con $\alpha=15\%$ .....   | 20 |
| 1.4   | DISCUSIÓN .....  | 25 |
| 1.5   | BIBLIOGRAFÍA .....   | 28 |
| 2     | Fase 2: Identificación, frecuencia y pruebas de patogenicidad de hongos asociados a la yautía selección Nazareno bajo condiciones de invernadero y laboratorio .....                       | 33 |
| 2.1   | INTRODUCCIÓN .....   | 33 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.2   | MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 33 |
| 2.2.1 | Lugar de los experimentos.....  | 33 |
| 2.2.2 | Aislamiento de hongos .....   | 33 |
| 2.2.3 | Medios y métodos específicos para crecimiento de hongos .....   | 35 |
| 2.2.4 | Prueba de patogenicidad in vivo con <i>mini-sets</i> .....  | 35 |
| 2.2.5 | Pruebas de patogenicidad en discos de cormos .....  | 33 |
| 2.3   | RESULTADOS.....   | 33 |
| 2.3.1 | Descripción morfológica de hongos .....   | 33 |
| 2.3.2 | Frecuencias de la población de hongos .....   | 64 |
| 2.3.3 | Prueba de patogenicidad in vivo con <i>mini-sets</i> .....  | 73 |
| 2.3.4 | Pruebas de patogenicidad en discos de cormos .....  | 75 |
| 2.4   | DISCUSIÓN .....   | 77 |
| 2.4.1 | Importancia agrícola y/o médica de hongos en la población.....  | 77 |
| 2.4.2 | Frecuencia de hongos .....  | 80 |
| 2.4.3 | Pruebas de patogenicidad en <i>mini-sets</i> bajo condiciones de invernadero .....  | 82 |
| 2.4.4 | Pruebas de patogenicidad en discos de cormos in vitro .....   | 82 |
| 2.5   | CONCLUSIÓN .....  | 83 |
| 2.6   | BIBLIOGRAFÍA .....  | 83 |
| 3     | Fase 3: Pruebas de antagonismo y utilización de controles biológicos y químicos para el manejo de hongos patógenos de la yautía selección Nazareno bajo condiciones in vitro..... | 86 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 3.1   | INTRODUCCIÓN .....  | 86  |
| 3.2   | MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 88  |
| 3.2.1 | Lugar de los experimentos.....  | 88  |
| 3.2.2 | Pruebas de antagonismo .....  | 88  |
| 3.2.3 | Pruebas de control en medio PDA.....  | 89  |
| 3.2.4 | Pruebas de control en discos de cormos en condiciones in vitro.....                         | 91  |
| 3.3   | RESULTADOS.....   | 93  |
| 3.3.1 | Pruebas de antagonismo .....  | 93  |
| 3.3.2 | Pruebas de control en medio PDA.....  | 100 |
| 3.3.3 | Pruebas de control en discos de cormos en condiciones in vitro.....                         | 105 |
| 3.4   | DISCUSIÓN .....   | 109 |
| 3.4.1 | Pruebas de antagonismo .....  | 109 |
| 3.4.2 | Pruebas de control en medio PDA con productos comerciales y biológicos no comerciales ..... | 110 |
| 3.4.3 | Pruebas de control en discos de cormos en condiciones in vitro.....                         | 112 |
| 3.5   | CONCLUSIÓN .....  | 114 |
| 3.6   | BIBLIOGRAFÍA .....  | 114 |
| 4     | CONCLUSIONES GENERALES .....  | 116 |

## 1 Lista de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1.1.</b> Calendario de aplicaciones de los tratamientos en yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos distintos.....  | 6  |
| <b>Tabla 1.2.</b> Malezas encontradas en la población de yautías sembradas en suelo en descanso durante cuatro meses.....  | 14 |
| <b>Tabla 1.3.</b> Análisis de varianza para medidas de hojas en plantas de yautía Nazareno sembradas en suelo en descanso en cuatro fechas diferentes.....   | 15 |
| <b>Tabla 1.4.</b> Tamaño de hojas según tratamientos en plantas de yautía Nazareno sembradas en suelo en descanso.....   | 16 |
| <b>Tabla 1.5.</b> Tamaño de hojas de plantas de yautía Nazareno en suelo en descanso medidas en distintas fechas (meses).....  | 16 |
| <b>Tabla 1.6.</b> Tamaño de hojas de plantas de yautía Nazareno en suelo en descanso promediado en bloques.....  | 16 |
| <b>Tabla 1.7.</b> Análisis de varianza de variables de cosecha para plantas de yautía Nazareno sembradas en el suelo de uso continuo.....  | 17 |
| <b>Tabla 1.8.</b> Análisis de varianza de variables de cosecha para plantas sembradas en suelo en descanso. ..   | 19 |
| <b>Tabla 1.9.</b> Peso de cormos, foliar, de raíces y % de daño en raíces según tratamientos aplicados a la yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos distintos.....                            | 22 |
| <b>Tabla 1.10.</b> Peso de cormo, foliar, de raíces y % de daño en raíces promediado en bloques para yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos diferentes .....                                 | 23 |
| <b>Tabla 1.11.</b> Peso de cormos, de raíces y % de daño en raíces según tratamientos aplicados a la yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos distintos con nivel de significancia de 15%..... | 24 |
| <b>Tabla 2.1.</b> Cepas de hongos aislados de las muestras de raíces y suelo de la Fase 1 y encontrados por otros medios .....   | 36 |
| <b>Tabla 2.2.</b> Frecuencia general de la población de hongos.....  | 64 |
| <b>Tabla 2.3.</b> Frecuencia de hongos en el suelo de uso continuo en todos los tratamientos.....  | 65 |
| <b>Tabla 2.4.</b> Frecuencia de hongos en el suelo en descanso en todos los tratamientos.....  | 65 |
| <b>Tabla 2.5.</b> Frecuencias de hongos por tratamientos en suelo en descanso y de uso continuo.....   | 66 |
| <b>Tabla 2.6.</b> Frecuencias de hongos por tratamiento en el suelo de uso continuo. ....  | 68 |
| <b>Tabla 2.7.</b> Frecuencias de hongos por tratamiento en el suelo en descanso.....   | 70 |
| <b>Tabla 2.8.</b> Frecuencia de hongos en muestras de suelo y raíces en suelo de uso continuo .....  | 72 |
| <b>Tabla 2.9.</b> Frecuencia de hongos en muestras de suelo y raíces en suelo en descanso .....  | 73 |
| <b>Tabla 2.10.</b> Análisis de varianza para variables medidas en la prueba de patogenicidad in vivo con <i>mini-sets</i> de yautía Nazareno.....  | 73 |
| <b>Tabla 2.11.</b> Peso y cantidad de raíces en las pruebas de patogenicidad con <i>mini-sets</i> de yautía Nazareno sembradas bajo condiciones de invernadero .....                                   | 74 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 2.12</b> Análisis de varianza para la variable lesión de las pruebas de patogenicidad in vitro con discos de corno de yautía Nazareno..... | 75  |
| <b>Tabla 2.13.</b> Tamaño de lesión provocada por los hongos en discos de corno. ....   | 76  |
| <b>Tabla 3.1.</b> Hongos asociados a la yautía Nazareno utilizados en las pruebas de antagonismo.....   | 89  |
| <b>Tabla 3.2.</b> Análisis de varianza para pruebas de antagonismo en ambas clases. ....  | 93  |
| <b>Tabla 3.3.</b> Crecimiento radial de <i>Fusarium solani</i> 1 en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo .....  | 95  |
| <b>Tabla 3.4.</b> Crecimiento radial de <i>Pythium</i> spp. en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo .....       | 95  |
| <b>Tabla 3.5.</b> Crecimiento radial de <i>Rhizoctonia solani</i> en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo ..... | 96  |
| <b>Tabla 3.6.</b> Crecimiento radial de <i>Sclerotium rolfsii</i> en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo ..... | 96  |
| <b>Tabla 3.7.</b> Crecimiento radial de los patógenos confrontando los hongos de la Clase 2 en pruebas de antagonismo .....                         | 97  |
| <b>Tabla 3.8.</b> Análisis de varianza para pruebas de control en PDA con tratamientos comerciales.....   | 101 |
| <b>Tabla 3.9.</b> Análisis de varianza para pruebas de control con tratamientos biológicos no comerciales....                                       | 103 |
| <b>Tabla 3.10.</b> Análisis de varianza para pruebas de control en discos de cormos de yautía Nazareno en ensayo pre-tratamiento .....              | 105 |
| <b>Tabla 3.11.</b> Análisis de varianza para pruebas de control en discos de cormos de selección Nazareno en ensayo pos-tratamiento. ....           | 107 |

## 2 Lista de figuras

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1.1.</b> Procedimiento para siembra de yautía selección Nazareno en suelo en descanso (SD) y suelo de uso continuo (SC).....                        | 4  |
| <b>Figura 1.2.</b> Procedimiento de cosecha de yautía Nazareno sembrada en invernadero en suelos de dos manejos distintos.....                                | 10 |
| <b>Figura 1.3.</b> Porcentaje de brotación en la población de yautía Nazareno sembrado en tiestos con suelo en descanso bajo condiciones de invernadero. .... | 11 |
| <b>Figura 1.4.</b> Síntomas observados durante 60 días después de la siembra en yautía Nazareno en suelo en descanso .....                                    | 13 |
| <b>Figura 2.1.</b> <i>A. alternata</i> .....  | 34 |
| <b>Figura 2.2.</b> <i>A. flavus</i> .....   | 35 |
| <b>Figura 2.3.</b> <i>A. niger</i> .....  | 36 |
| <b>Figura 2.4.</b> <i>Aspergillus</i> spp. 1 .....  | 37 |
| <b>Figura 2.5.</b> <i>A. terreus</i> .....  | 38 |
| <b>Figura 2.6.</b> <i>Cladobotryum</i> spp. ....  | 39 |
| <b>Figura 2.7.</b> <i>C. brachyspora</i> . ....   | 40 |
| <b>Figura 2.8.</b> <i>C. lunata</i> . ....  | 41 |
| <b>Figura 2.9.</b> Desconocido .....  | 42 |
| <b>Figura 2.10.</b> <i>Diplodia</i> spp. ....   | 43 |
| <b>Figura 2.11.</b> <i>F. oxysporum</i> .....   | 44 |
| <b>Figura 2.12.</b> <i>F. solani</i> cepa 1 .....   | 45 |
| <b>Figura 2.13.</b> <i>F. solani</i> cepa 2 .....   | 46 |
| <b>Figura 2.14.</b> <i>Fusarium</i> spp. ....   | 47 |
| <b>Figura 2.15.</b> <i>Geotrichum</i> spp. ....   | 48 |
| <b>Figura 2.16.</b> <i>Penicillium</i> spp. 1 .....   | 49 |
| <b>Figura 2.17.</b> <i>Penicillium</i> spp. 2. ....   | 50 |
| <b>Figura 2.18.</b> <i>Penicillium</i> spp. 3 .....   | 51 |
| <b>Figura 2.19.</b> <i>Penicillium</i> spp. 4 .....   | 52 |
| <b>Figura 2.20.</b> <i>Penicillium</i> spp. 5 .....   | 53 |
| <b>Figura 2.21.</b> <i>Pythium</i> spp. ....  | 54 |
| <b>Figura 2.22.</b> <i>R. solani</i> .....  | 55 |
| <b>Figura 2.23.</b> <i>S. rolfsii</i> .....   | 56 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 2.24.</b> <i>Scolecobasidium</i> spp. ....   | 57  |
| <b>Figura 2.25.</b> <i>T. harzianum</i> .....  | 58  |
| <b>Figura 2.26.</b> <i>Trichoderma</i> spp.....  | 59  |
| <b>Figura 2.27.</b> <i>Verticillium</i> spp. ....  | 60  |
| <b>Figura 2.28.</b> Morfotipo 1.....   | 61  |
| <b>Figura 2.29.</b> Morfotipo 2.....   | 62  |
| <b>Figura 2.30.</b> Morfotipo 3.....   | 63  |
| <b>Figura 2.31.</b> Hongos más frecuentes de los dos manejos de suelo (SC y SD) y tratamientos en siembra de yautía Nazareno. ....                                       | 71  |
| <b>Figura 3.1.</b> Representación de pruebas de control con tratamientos comerciales bajo condiciones in vitro en PDA.....   | 90  |
| <b>Figura 3.2.</b> Procedimiento utilizado en el ensayo pre-tratamiento para pruebas de control en discos de cormos de yautía Nazareno.....                              | 92  |
| <b>Figura 3.3.</b> Procedimiento utilizado en el ensayo pos-tratamiento para pruebas de control en discos de cormos de yautía Nazareno.....                              | 92  |
| <b>Figura 3.4.</b> Características favorables de antagonistas y patógenos en pruebas de antagonismo realizadas con hongos asociados a la yautía selección Nazareno. .... | 99  |
| <b>Figura 3.5.</b> Crecimiento radial de patógenos en presencia o ausencia de los hongos de mayor potencial antagonístico pertenecientes de la Clase 1.....              | 100 |
| <b>Figura 3.6.</b> Radio de inhibición de los patógenos de yautía Nazareno en presencia de Bioplex® o Serenade®.....   | 102 |
| <b>Figura 3.7.</b> Crecimiento radial de patógenos de la yautía Nazareno en PDA bajo los efectos de hongos bio-controladores.....  | 104 |
| <b>Figura 3.8.</b> Tamaño de lesión (log) en discos de cormos de yautía Nazareno pre-tratados antes de ser inoculados con los hongos patógenos. ....                     | 106 |
| <b>Figura 3.9.</b> Tamaño de lesión (log) en discos de cormos según efectos de tratamientos para el ensayo pos-tratamiento en pruebas de control in vitro. ....          | 108 |
| <b>Figura 3.10.</b> Tamaño de lesión (log) (mm) en discos de cormo de yautía Nazareno inoculados con hongos patógenos antes de ser tratados (pos tratamiento).....       | 109 |

### 3 INTRODUCCIÓN

La yautía (*Xanthosoma* spp. Schott) es un farináceo de gran importancia económica en países tropicales y subtropicales debido a su alto contenido de carbohidratos (Plaza Delestre, 1994). El Ingreso Bruto Agrícola de Puerto Rico demuestra que en el año fiscal 2013-2014 se produjeron localmente 10,356 qq con un valor de \$945,000. Según datos del Departamento de Agricultura de Puerto Rico, la producción de yautía en el año 1984 fue de 185,000 qq. El contraste entre el 1984 y el año 2014 refleja una reducción de 94.40% en la producción local. La investigación de la yautía ha resultado de poca importancia a nivel internacional. Es por eso, que en 1975 la Academia Nacional de Ciencias clasificó el cultivo como un producto alimenticio inatendido con gran potencial económico, y todavía es considerado como un cultivo poco explotado y poco estudiado (Reyes Castro et al., 2005). La yautía es afectada por diferentes enfermedades en las cuales se encuentra el virus de la malanga o “Dasheen Mosaic Virus”, el tizón común, provocado principalmente por *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* (Pohronezny y Dankers, 1985; Brown y Asemota, 2009) y la pudrición radicular conocida como el “mal seco”. De esta última enfermedad se han aislado e identificado en el Caribe a los hongos *Phytium splendens* Brawn, *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium solani* (Mart) y *Sclerotium rolfsii* Socc como organismos que lo ocasionan (Beale, 1992; Bejarano-Mendoza et al, 1998). Los síntomas que ocasionan son pudrición y la reducción de las raíces lo que da origen a una clorosis y luego muerte de la planta (Tambong y Höfte, 2001).

Esta investigación se realizó en varias fases a nivel de invernadero y laboratorio. En la Fase 1, se evaluaron diferentes tratamientos para el control de los organismos asociados a la enfermedad del mal seco. Se probaron productos biológicos, bacterias y un fungicida-bactericida en yautías de selección Nazareno sembrado en suelo con dos manejos distintos bajo condiciones de invernadero. Los tipos de manejo de suelo fueron: suelo en descanso, sin sembrar yautía por un periodo de tres años, y suelo de uso continuo, suelo donde se ha sembrado yautía anteriormente. Se recopiló información de la siembra durante 10 meses, se compararon los pesos de cormos, raíces y follaje de las yautías sembradas en los dos tipos de suelo y se compararon los tratamientos para determinar la efectividad controlando los daños asociados a hongos del



mal seco. Se aislaron y se identificaron los hongos encontrados en muestras de suelo y raíces de las plantas cosechadas. En la Fase 2, se evaluaron los hongos aislados de las muestras de la Fase 1 en pruebas de patogenicidad a nivel de invernadero e *in vitro*. En la Fase 3, se probaron a nivel *in vitro* los tratamientos de mayor potencial de control contra los hongos aislados para comprobar su efectividad.

## 4 OBJETIVOS

- 1) Evaluar diferentes tratamientos con potencial para controlar la enfermedad del mal seco en plantas sembradas en suelo de dos manejos distintos bajo condiciones de invernadero
- 2) Aislar, identificar y probar la patogenicidad de los hongos asociados a la rizósfera de la yautía selección Nazareno en suelo de dos manejos distintos
- 3) Confirmar el efecto controlador de algunos tratamientos contra hongos patógenos asociados al mal seco en pruebas *in vitro*

## 5 REVISIÓN DE LITERATURA

### 5.1 Estudio general de la yautía

#### 5.1.1 Origen de la yautía

La yautía, *Xanthosoma* spp. Schott, es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia de las aráceas. Es nativa de la zona tropical de América Central y del Sur y el Caribe. Las especies comestibles de *Xanthosoma* se han clasificado en *X. atrovirens*, *X. caracu*, *X. jacquini*, *X. maffafa*, *X. sagittifolium* y otras. Las especies más populares encontradas en Puerto Rico son: *X. atrovirens* (yautía amarilla), *X. sagittifolium* (yautía blanca) y *X. violaceum* (yautía morada o lila) (Alain Liogi y Martorell, 1982). Se cree que *X. sagittifolium* es la más antigua y que su lugar de origen se encuentra al norte de América del Sur. Su extensión es de Perú hasta México. Para poder domesticar el cultivo, se tuvo que eliminar los cristales de

oxalato de calcio y el látex, que son sustancias irritantes halladas en toda la planta. Estas sustancias desaparecen al cocinar los cormos y así se pueden consumir sin problemas (León, 1987).

### **5.1.2 Morfología y fisiología**

La yautía está formada por un tallo subterráneo o cormo que actúa como reserva de nutrientes y agua. El cormo produce hasta 10 ó más cormelos debajo de la tierra de 15-25 cm de largo con forma de botella (Purseglove, 1986). Los cormelos son la parte comestible de mejor calidad. La planta desarrolla el follaje en los primeros seis meses y posteriormente, de 2 a 4 meses, los cormelos aumentan de peso y el follaje permanece igual. Los cormelos están listos para cosechar cuando el follaje empieza a secarse. Esto ocurre, casi siempre, antes de que surja la inflorescencia. Los brotes secundarios emergen después que el brote central se seca. Los mismos provienen de yemas apicales de los cormelos o yemas laterales del cormo central (León, 1987).

Del peciolo del cotiledón (la primera hoja) surgen las hojas y se forma un pseudotallo cilíndrico. Las hojas del exterior, que son las más viejas, se van secando y desintegrando a medida que la planta crece y surgen hojas nuevas del interior del pseudotallo. La lámina de la hoja está dividida en tres lóbulos: dos lóbulos superiores, que son redondeados y un lóbulo inferior de forma triangular y puntiagudo. Tiene tres venas principales que atraviesan los lóbulos por la mitad y se juntan formando una “Y” en la parte superior de la lámina. De las venas principales salen venas secundarias rectas que están paralelas unas con otras hasta tocar una vena que rodea los bordes de la lámina. Las venas principales están fusionadas con el peciolo en el centro de la “Y” en el envés de la hoja. La superficie de la hoja es lisa y brillante y el color va de verde claro a morado dependiendo de la variedad. La hoja tiene hidátodos en el haz de donde las plantas secretan líquidos compuestos principalmente por agua (León, 1987).

Las inflorescencias emergen de las axilas de las hojas. Contienen un espádice que es un cilindro donde crecen las flores y está rodeado por una espata. La espata es una lámina foliar que en su maduración forma dos cavidades cóncavas (inferior y superior) y deja expuesta la parte superior del espádice. En la base del

espádice, la parte más dura y ancha, hay flores pistiladas fértiles que tienen forma de placas poligonales con el estigma en el centro. En el interior hay una cavidad con tres o cuatro placentas dobles y muchos óvulos. La parte superior del espádice está cubierta de flores estériles que tienen forma de placas poligonales, de cuatro a seis lados y de color morado claro (León, 1987).

### **5.1.3 Manejo del cultivo**

La yautía requiere temperaturas altas de 20 a 30 C, una precipitación de 1,400-2000 mm y una alta humedad en el suelo para poder desarrollarse de forma óptima y tener buen rendimiento. Requiere suelos con buen drenaje y sueltos y puede tolerar suelos pesados con pH variando de 5.5 a 6.5 (Adiobo et al, 2007; EEA, 1997).

### **5.1.4 Propagación**

El cultivo se propaga por pedazos del cormo que contienen yemas laterales o por cormelos que contienen yemas apicales. Los pedazos de palmillo o corona tienen un crecimiento más vigoroso que las yemas de los cormos. (EEA, 1997).

## **5.2 Características de la selección Nazareno**

La yautía Nazareno tiene la pulpa de color amarillo y puede producir 50% más que la variedad Kelly. Los rendimientos no son significativamente diferentes cuando se compara con Super Kelly plantado en época de siembra tradicional (abril y mayo), pero cuando se planta fuera de época (octubre y noviembre) el rendimiento del Nazareno es significativamente diferente de la Super Kelly. Para sembrar en cualquier época del año el riego es vital. La selección Nazareno es tan vigorosa como Super Kelly, y puede alcanzar 1.5 metros de altura en 6 meses. El peciolo es de color púrpura intenso, con poca cantidad de cera; las venas de las hojas poseen una gran tonalidad púrpura que sirve para identificarla y la distancia del seno de la lámina foliar van desde 0.5 a 1.0 cm. El crecimiento inicial de las plantas es erecto, lo que significa que los

pecíolos crecen hacia arriba con un ángulo de 30 grados con respecto al vástago lo que la hace fácil para la cosecha con tractores. La pulpa es más blanda que la variedad Kelly y, sin embargo, idéntica a la Super Kelly. No posee puntos de color violeta y la pulpa es completamente amarilla. Una planta puede producir entre 2 a 5 cormelos mercadeables con un peso promedio de 200 gramos y un rendimiento de 80 a 100 qq / ha. Los cormelos son más pequeños que los de Súper Kelly y la yema apical es de color rosa pálido en la punta. Se puede sembrar en cualquier mes y se puede cosechar después del noveno mes o hasta los 16 meses, antes de que los cormelos broten. Algunas plantas florecen de forma natural (Bosques, 2014).

### 5.3 Origen de la yautía Nazareno

La yautia selección Nazareno se desarrolló con el cruce del cultivar Estela y la línea Súper Kelly. Estela se originó con el cruce de Alela x Kelly, y Súper Kelly surgió del cruce [ (Kelly x Vinola) x Alela⊗] x (Kelly x Vinola) (Bosques, 2017).

### 5.4 Mal seco

El mal seco fue reportado por primera vez en Puerto Rico por Cook en 1939 (FAO y SEA, 1985) y es provocado por un complejo de hongos donde se encuentran *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* Sacc y pseudohongos como *Phytophthora* spp. y *Pythium* spp., y bacterias fitopatógenas tales como *Erwinia* spp. y *Pseudomonas* spp. (Bejarano Mendoza, 1996). Grullón Medina (FAO y SEA, 1985) cita a Wehburg y colaboradores (1975) en las enfermedades de yautía y malanga (*Colocasia esculenta*) donde dice que *Erwinia* spp. es causante de la pudrición blanda en el pseudotallo y el peciolo.

El crecimiento retrasado, el amarillamiento de hojas y la reducción severa del sistema radicular son los síntomas principales de esta enfermedad. Los síntomas se pueden observar en plantas de 2 a 5 meses de edad en época de lluvia (Tambong y Höfte, 2001; Bejarano Mendoza, 1996; Adiobo et al, 2007; FAO y SEA, 1985). La enfermedad comienza con fuertes lluvias que le siguen periodos secos donde hay suelo con drenaje pobre y clima cálido. Los síntomas se comienzan a ver en los meses de junio o agosto, cuando caen los mayores aguaceros y las temperaturas son más altas (Beale, 1992). Generalmente, a los primeros cinco

meses, después de los primeros síntomas, más del 90% de las raíces se enferman (FAO y SEA, 1985). Cuando se extraen las plantas para observar el sistema radicular se observan podredumbres color marrón que se tornan negro. Las raíces pierden la corteza y solo queda el tejido vascular en forma de hilo (Beale, 1992). Si la enfermedad se manifiesta en la etapa temprana, la planta no produce cormelos (FAO y SEA, 1985).

En Camerún, el organismo principal que causa la pudrición de la raíz en yautía es *Pythium myriotylum* y se ha estimado una reducción de hasta el 90 % en el rendimiento de plantaciones infectadas (Boudjeko, 2006). Los patógenos pueden ser transmitidos por semilla, herramientas y equipos contaminados (Reyes Castro et al., 2005). Existe otra enfermedad llamada localmente “la currucata” la cual provoca la pudrición del corno donde se ha encontrado a *P. ultimum* como su agente causal (Plaza Delestre, 1994; EEA, 1997).

## **5.5 Control del mal seco**

### **5.5.1 Químico**

Se ha usado metalaxil, un fungicida sistémico para el control de oomicetos como *Pythium* y *Phytophthora* (Lugo et al, 1992; Flores Moreno, 2010). Carcache Torres y Díaz Mayorga (2010) evaluaron diferentes enmiendas orgánicas, *Trichoderma* spp. y metalaxil para controlar el mal seco en yautía provocado por *Pythium myriotylum*. Encontraron que metalaxil ayuda a mantener las plantas vigorosas los primeros meses de siembra, pero en evaluaciones finales no hubo diferencias significativas entre tratamientos en variables como el crecimiento, producción y raíces de las plantas. Oumar y colaboradores (2015) utilizaron Metalm 72 WP®, un fungicida sistémico a base de metalaxyl y óxido de cobre a razón de 1:5. Sumergieron los cormos para prevenir la pudrición por *P. myriotylum* y, después de cosechar, encontraron que redujo la incidencia de la enfermedad hasta un 37%, y obtuvo un peso de raíces y yemas mayor que el benzotiazol (BTH) y el control. Bejarano Mendoza (1996) comprobó que el benomil (Benlate®) y metilo-etridiazol-tiofanato (Ban Rot®) inhibieron el crecimiento de *Fusarium solani*,

*Rhizoctonia solani* y *Pythium* sp., pero solo el Ban Rot controló a *Sclerotium rolfsii* y a las bacterias.

## 5.5.2 Cultural

Un estudio comprobó que las enmiendas orgánicas pueden ejercer efecto supresor sobre patógenos de plantas, ya que estos aumentan la diversidad microbiana en los suelos (Artavia et al, 2010). Se utilizó vermicomposta a base de estiércol maduro bovino o caprino y se obtuvo menor incidencia de pudrición de raíces en yautía por *P. myriotylum*. Además, la severidad de la enfermedad fue más baja cuando el suelo se enmendó con la composta y la vermicomposta madura a base de estiércol. Estos abonos orgánicos a base de estiércol fueron más supresivos presentando una mayor actividad microbiana que los producidos a base de pulpa de café. El grado de madurez en la enmienda orgánica también afecta el grado de supresión. Los resultados de otro estudio comprobaron que el tipo de suelo puede ser supresor en el crecimiento de patógenos como *Pythium myriotylum* (Adiobo et al, 2007). En el experimento se sembraron varias parcelas de yautía en andosoles y ferrosoles donde se observó mejores rendimientos en andosoles que en los ferrosoles. Se realizaron análisis químicos donde se encontró mayor contenido de materia orgánica y una concentración más alta de nutrimentos como el Ca, K, Mg y N en andosoles que en ferrosoles, los cuales tienen más concentración de elementos fitotóxicos como Al y Mn. Se concluyó que la materia orgánica encontrada en los andosoles suprime el desarrollo de *P. myrotium* y, además, mejora la estructura del suelo, aumentando así la cantidad de nutrientes disponibles, la biomasa y estabilidad de la actividad microbiana.

Snyder y colaboradores (2010) realizaron un estudio donde demostraron que se pueden obtener buenos rendimientos en suelos con drenaje pobre, pero con buena estructura. El experimento se llevo a cabo en una parcela levemente inclinada y de mal drenaje (ultisol) de la EEA de Corozal. Se sembró yautía cultivar Estela en tres manejos de suelo: en superficie plana, en bancos altos y en banco altos con tubería en la base de los bancos para permitir mejor aereación. Encontraron que la producción de cormelos en la siembra con bancos (19.94 t/ha) sobrepasó la del suelo plano casi cuatro veces (5.38 t/ha). No hubo diferencias significativas entre la producción de la siembra en bancos y bancos con tubería (17.61 t/ha).

Además, las raíces de las plantas sembradas en suelo plano tuvieron más lesiones y enfermedad que las sembradas en bancos. Se demostró que se puede tener buena producción en un ultisol de suelos arcillosos, de poco drenaje (pero de buena estructura) y usando riego suplementario. Sin embargo, es necesario tener un sistema de riego por goteo y medir el nivel freático ya que influye grandemente en la incidencia del mal seco. El conjunto tecnológico enseña varias alternativas para manejar el mal seco (EEA, 1997). Algunas son: sembrar en suelos profundos con buen drenaje, evitar sembrar en suelos muy arcillosos, rotar cultivos, no sembrar por tres años en suelos donde haya ocurrido el mal seco, utilizar material de propagación sin síntomas de enfermedad, eliminar la parte distal del cormo y usar riego por goteo en época seca.

### **5.5.3 Biológico**

#### **5.5.3.1 Microorganismos biocontroladores**

Aunque no se haya publicado mucho en relación al control biológico en yautía, existen numerosos estudios de agentes biocontroladores en otros tipos de farináceos y solanáceas. En ñame se aplicó la bacteria *Bacillus subtilis* en tubérculos almacenados por 6 meses inducidos con humedad y se observó que impedía el establecimiento de hongos parásitos facultativos que pueden degradar los tubérculos pos-cosecha (Okigbo, 2003). Las micorrizas arbusculares (MA) pueden suprimir hongos como *Pythium aphanidermatum* en raíces de tomate. En pruebas ELISA se observó que el nivel de infección en las raíces de tomate por *P. aphanidermatum* fue afectada por MA. En raíces colonizadas por *Glomus intraradices* se observaron valores de ELISA de *Pythium* 57% menores que aquellas que no fueron colonizadas por MA (Larsen et al, 2012). Existe suficiente información de que varias cepas de *Trichoderma harzianum* son antagonistas de *Rhizoctonia solani* y *Pythium* spp. con un comportamiento que puede ser de competencia o micoparasitismo (Huang et al, 2011; Perdomo et al, 2007). Debido a este creciente movimiento de identificar productos con agentes biocontroladores, el presente trabajo se enfocó en el biocontrol de los patógenos asociados al mal seco de la yautía encontrados bajo nuestras condiciones.

### 5.5.3.2 Agentes inductores del mecanismo de defensa de la planta

Las plantas tienen mecanismos de defensa que son activados por la presencia de patógenos fuera o dentro de los órganos. La activación de estos mecanismos por rutas metabólicas se lleva mediante moléculas que liberan los patógenos al invadir el tejido vegetal llamadas elicitores. Cuando un patógeno, hongo o bacteria, invaden un tejido de la planta se activa la ruta metabólica de ácido salicílico (SA) y sus derivados. El SA produce una señal que se cree que se mueve a través del floema hacia las células no infectadas induciendo su resistencia. Las células pueden reaccionar provocando la muerte de una o más células alrededor de la célula infectada (reacción hipersensitiva) o pueden liberar proteínas relacionadas a la patogenicidad (**PRP**). Este fenómeno se llama resistencia sistémica adquirida (**SAR**) (Pal y McSpadden, 2006; Williams, 2011). En los últimos años se han estudiado sustancias que imitan los elicitores, la relación patógeno-huésped y algunos microorganismos no patógenos que pueden inducir el SAR en la planta. Un ejemplo de la inducción del SAR por relación patógeno- huésped en yautía es con *Pythium myriotilum*. Nyochembeng y Beyl (2015) estudiaron la acumulación de quitinasa y  $\beta$ -1,3-glucanasa con extractos de raíces de cuatro variedades distintas de plantas inducidas por *P. myriotilum*. Resultó que se produjo mucha quitinasa en la variedad tolerante (RO1054) y susceptible (RO2063) ocho días después de la inoculación. Se observó también una producción significativa de  $\beta$ -1,3-glucanasa en la variedad tolerante el 8vo día.

Por otro lado, se ha encontrado que el uso de Benztodiazol (**BTH**), un análogo del SA, ha tenido éxito en la inducción de SAR en yautía (Oumar et al, 2015; Mbouobda et al, 2010). Cuando el BTH se aplica a la planta induce a que se produzcan glucanasas, quitinasas y peroxidasas que ayudan a disminuir la incidencia de la enfermedad del mal seco. Sin embargo, se debe conocer una concentración óptima para mejor inducción de las PRPs. Oumar y colaboradores (2015) utilizaron dos concentraciones de BTH: 15 y 50 mg/L. Observaron que en las plantas tratadas con 50 mg/L de BTH se redujo a 57% la pudrición de raíces, mientras que las plantas tratadas con 15 mg/L de BTH tuvieron una reducción de 37%, casi igual que el fungicida Metalm 72 WP® (36%). Sin embargo, el BTH redujo el crecimiento de las raíces y yemas



en comparación con el fungicida y el control en algunos casos. Esto se debe a que la activación de las defensas de la planta afecta las rutas metabólicas de las hormonas de crecimiento (Williams, 2011). Mbouobda y colaboradores (2010) demostraron que la aplicación de 200mg/L de BTH puede reducir la incidencia de enfermedades en yautía al activar PRP claves para el control de la enfermedad del mal seco, especialmente óxidos polifenólicos (**PPO**) que pueden oxidar compuestos fenólicos en quinonas, compuestos más tóxicos para los patógenos que los fenoles mismos. Ellos observaron que las plantas de yautía del cultivar susceptible (blanca) inducidas y luego inoculadas con *P. myriotilum* tuvieron una incidencia de enfermedad de 30% mientras que las plantas solamente inoculadas tuvieron 60% al 8vo día. El cultivar resistente (amarilla) tuvo mayor concentración de PPO que aumentó periódicamente después de la inducción.

# 1 Fase 1: Evaluación de tratamientos biológicos, químicos e inductores de resistencia al mal seco en yautía sembrada en suelo con dos manejos distintos bajo condiciones de invernadero

## 1.1 INTRODUCCIÓN

El control de enfermedades ha evolucionado mucho con la introducción de plaguicidas y tecnología en la agricultura. En las pasadas décadas ha aumentado el uso de productos a base de organismos beneficiosos a la planta que atacan directamente los patógenos que las afectan y ha disminuido el uso de plaguicidas químicos debido a los muchos estudios que demuestran que causan daño a la salud del ser humano, el ambiente y los demás seres vivos.

En esta fase de esta investigación el objetivo fue evaluar diferentes controles biológicos, químicos e inductores de resistencia en la planta de yautía (*Xanthosoma* spp. Schott) selección Nazareno sembrada en suelo de dos manejos distintos para determinar la efectividad en prevenir o reducir la enfermedad del mal seco. Se sembró en un suelo en descanso, sin siembra de yautía por un periodo de tres años, y en suelo de uso continuo, donde se sembró yautía anteriormente. Los tratamientos consistían de cuatro productos comerciales y cinco bacterias con potencial biocontrolador. Los productos fueron: Bioplex®, que contiene micorrizas, cepas de *Trichoderma* spp. y *Bacillus* spp., benecificiosas en diferentes ambientes, Cito Grower®, una citoquinina que estimula el crecimiento apical de la planta, Kocide 3000®, un fungicida de contacto a base de cobre, y Serenade®, un producto a base de *Bacillus subtilis*, una bacteria utilizada para el control biológico y también inductor de sistema de resistencia adquirido de ciertas plantas. En las bacterias se incluyen cuatro bacterias previamente determinadas con potencial biocontrolador de los hongos causantes del mal seco y otra bacteria que estimula el crecimiento del sistema radicular de la planta (M. Zapata, información personal). Las variables medidas fueron el peso de cormos, follaje, de raíces (fresco) y % de daño en las raíces.

## **1.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1.2.1 Lugar de los experimentos**

Los experimentos fueron realizados en las facilidades del Departamento de Ciencias Agroambientales localizadas en la finca Alzamora, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez 00681.

### **1.2.2 Recolección de suelo**

Se buscaron dos tipos de suelo con diferencias en el manejo en la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Isabela de la Universidad de Puerto Rico: suelo en descanso (**SD**), sin sembrar yautía por tres años, y un suelo de uso continuo (**SC**), donde se había sembrado yautía el año anterior. Se llenaron tiestos de 7.57 L con diámetro de 21.5 cm para cada tipo de suelo. Los tiestos fueron colocados sobre platos plásticos de 66.04 cm de diámetro para que al momento de regar o de aplicar los tratamientos no saliera el producto por escorrentía.

### **1.2.3 Preparación para la siembra (Fig. 1.1)**

Se utilizaron para la siembra los cormos de yautía (*Xanthosoma* spp.) selección Nazareno provenientes de la EEA de Isabela. La semilla se limpió eliminando las raíces y todo exceso de tierra. Se cortaron pedazos de cormo de 5.08 cm de ancho y éstos se cortaron por la mitad. Se eliminó la parte distal de la semilla por tener éste un potencial mayor de portar patógenos asociados al mal seco. Los pedazos de semilla se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 5 min. Luego se colocaron con la pulpa hacia arriba y se expusieron al sol durante 2-3 hrs para cicatrizar las heridas de los cortes y evitar la pudrición e introducción de patógenos. Los pedazos suberizados fueron sembrados en un germinador con perlita como sustrato a 5.08 cm de profundidad con el peridermo (cáscara) hacia abajo. Se dejó durante 7 días en el

germinador para estimular las yemas axilares y fuera más efectiva la brotación. El sistema de riego fue automático y diario. A los 7 días, los cormos fueron desterrados y se seleccionaron aquellos con brotes nuevos sin pudrición. Se dejó una sola yema en el centro del cormo y se eliminaron las otras yemas con cuchillo previamente esterilizado. Se transportaron las semillas al invernadero para sembrarlas en los tiestos con la tierra (SD y SC). Se sembraron los cormos a 5.08 cm de profundidad con el peridermo boca abajo en los tiestos. La cantidad de agua regada varió durante la experimentación dependiendo del clima, las condiciones en el suelo y el desarrollo de las plantas. Se regaron las plantas con 600 ml de agua tres veces por semana.



**Figura 1.1.** Procedimiento para siembra de yautía selección Nazareno en suelo en descanso (SD) y suelo de uso continuo (SC). A) Se adquirió tierra de la EEA de Isabela y se llenaron tiestos. B) Los cormos de Nazareno se limpiaron de raíces y tierra, se trozaron en discos de 5.08 cm y luego se cortaron por la mitad. C) Se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 5 min. D) Los pedazos se colocaron con la pulpa expuesta al sol durante 2 hrs para la suberización. E) Los pedazos de cormos se sembraron en una germinadora con perlita por 7 días con alta humedad para estimular los brotes. F) A los 7 días, los pedazos de cormo se sacaron del germinador y se sembraron en los tiestos que contenían SD y SC.

### 1.2.4 Diseño del experimento

Para cada manejo de suelo, se utilizó un diseño de bloques completos aleatorizados con 4 bloques y 8 tratamientos. En cada bloque había 16 plantas, donde cada tratamiento estuvo reproducido por 2 plantas. Se analizaron los dos manejos de suelo como experimentos separados. Los tratamientos fueron: **1) Kocide 3000®**, **2) Bacterias 1, 2, 3 y 4**, **3) Bacteria 5**, **4) Cito Grower®**, **5) Serenade®**, **6) Bioplex®**, **7) Control** y **8) Bacterias (1, 2, 3 y 4)** (Tabla 1.1). Los tratamientos del 1 al 6 tenían Bioplex® aplicado al suelo, mientras que el 7 y el 8 no tuvieron. Las bacterias (1, 2, 3 y 4) son controladoras de los hongos asociados al mal seco. La bacteria 5 es una bacteria estimuladora de crecimiento de las raíces. El Bioplex® (Bio-Plex Organics, Manheim, PA) consiste de un inoculante soluble en agua que contiene micorrizas, *Trichoderma spp.* y bacterias que se adaptan a diferentes climas, plantas y suelos. Serenade® (AgraQuest, Inc., Davis, CA) es un producto a base de *Bacillus subtilis*, un organismo que ha sido eficaz en el control de hongos que prevalecen en la superficie del ñame a nivel pos-cosecha (Okigbo, 2003). Kocide 3000® (DuPont, USA) es un bactericida y fungicida cuyo ingrediente principal es hidróxido de cobre. Cito Grower® es un producto que contiene nutrientes y la hormona citoquinina que promueve la producción de frutos más grandes y homogéneos; mantienen su sabor y consistencia después de la cosecha y promueve la senescencia tardía de las hojas y mejor crecimiento de la planta (Futureco, 2013). Los productos Kocide 3000®, Serenade® y Cito Grower® fueron aplicados en el follaje con bomba de aspersión. Las bacterias 1, 2, 3, 4 y 5 pertenecen a la colección de la Dra. M. Zapata y fueron cultivadas en caldo nutritivo (NB) a una concentración de  $10^7$  CFU/ml y fueron aplicadas al suelo para inocular las raíces de las plantas. El Bioplex® fue mezclado con agua estéril y aplicado también al suelo.

### 1.2.5 Procedimiento de aplicaciones

Se preparó un calendario para la aplicación de los tratamientos. El mes de siembra fue el 21 de octubre de 2013 (mes 0) y la cosecha comenzó el 5 de septiembre de 2014 (Mes 10) (Tabla 1.1).

**Tabla 1.1.** Calendario de aplicaciones de los tratamientos en yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos distintos.

| Tratamientos |                 | Meses          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                 |
|--------------|-----------------|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----------------|
| No.          | Descripción     | 0 <sup>a</sup> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 <sup>b</sup> |
| 1            | Kocide 3000® +  |                |   | √ | √ |   | √ |   | √ | √ | √ |                 |
|              | Bioplex®        |                | √ |   | √ |   | √ |   | √ |   |   |                 |
| 2            | Bacterias 1-4 + |                | √ |   | √ |   | √ |   |   |   |   |                 |
|              | Bioplex®        |                | √ |   | √ |   | √ |   | √ |   |   |                 |
| 3            | Bacteria 5 +    |                |   | √ | √ |   | √ |   |   |   |   |                 |
|              | Bioplex®        |                | √ |   | √ |   | √ |   | √ |   |   |                 |
| 4            | Cito Grower® +  |                |   | √ | √ |   | √ |   | √ | √ | √ |                 |
|              | Bioplex®        |                | √ |   | √ |   | √ |   | √ |   |   |                 |
| 5            | Serenade® +     |                |   | √ | √ |   | √ |   | √ | √ | √ |                 |
|              | Bioplex®        |                | √ |   | √ |   | √ |   | √ |   |   |                 |
| 6            | Bioplex®        |                | √ |   | √ |   | √ |   | √ |   |   |                 |
| 7            | Control (-)     |                |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                 |
| 8            | Bacterias 1-4   |                | √ |   | √ |   | √ |   |   |   |   |                 |

<sup>a</sup>Mes de siembra- 21 de octubre de 2013

<sup>b</sup>Mes de cosecha- 5 de septiembre de 2014

**Aplicación Mes 1:** Se regaron todas las plantas con 100 ml de agua excepto las plantas del testigo que se regaron con 200 ml agua. Se mezclaron 2 g de Bioplex® con 6 L de agua estéril. Se aplicaron 100 ml de la suspensión de Bioplex® a las plantas de los tratamientos 1 al 6. Las bacterias 1, 2, 3 y 4, ya preparadas en envases con caldo nutritivo (NB), fueron mezcladas también en el momento de aplicar. Se mezclaron 25 ml de cada bacteria hasta completar 100 ml para inocular las plantas del tratamiento 8.

**Aplicación mes 2:** Las plantas del tratamiento 2 se regaron con 500 ml y las del 3 con 400 ml. Las otras plantas se regaron con 600ml de agua. Para el tratamiento 2 se aplicaron 100ml por planta de la mezcla de las bacterias 1, 2, 3 y 4 que consistía de 25 ml de cada una. En el tratamiento 3 se aplicaron 200ml por planta de la suspensión de la bacteria 5. Para el tratamiento 1 se mezclaron 8 g del producto Kocide 3000® por 2 L de agua en una bomba de aspersión manual previamente calibrada. Se agitó bien el contenido en la

bomba y se asperjaron 25 ml en el haz y el envés de la hoja. Para el tratamiento 4 se mezclaron 1.6 ml del producto Citogrower por 2 L de agua en una bomba de aspersión manual previamente calibrada. Se agitó bien el contenido en la bomba y se asperjaron 25 ml en el haz y envés de la hoja. Para el tratamiento 5 se mezclaron 25 ml del producto Serenade® por 2 L de agua en una bomba de aspersión manual previamente calibrada. Se agitó bien el contenido en la bomba y se asperjaron 25 ml en el haz y envés de la hoja.

**Aplicación mes 3:** Las plantas del tratamiento 1 al 6 fueron regadas con 500 ml de agua y las de los tratamientos 7 y 8 se regaron con 600 ml de agua. Se preparó la suspensión de Bioplex® y se aplicaron 100 ml por planta de los tratamientos 1 al 6. Se esperaron 3 días para la aplicación de bacterias. Para la segunda parte de las aplicaciones, se regaron las plantas del tratamiento 2 y 8 con 500 ml, las plantas del tratamiento 3 se regaron con 400 ml y las plantas de los otros tratamientos se regaron con 600 ml. Se repitió el mismo protocolo para inocular las plantas de los tratamientos 2 y 8 con las bacterias 1, 2, 3 y 4 y las del tratamiento 3 con la bacteria 5. El mismo procedimiento usado en el mes 2 fue efectuado para la aspersión foliar con Kocide 3000® en el tratamiento 1, Cito Grower® para las plantas del tratamiento 4 y Serenade® para las plantas del tratamiento 5. Para los meses posteriores, se utilizó el mismo método de la aplicación del mes 3 según el calendario. Para los meses 7 al 9 se aplicó el insecticida malatión (Spectracide®, USA) cada 7 días para el control de los ácaros. Además, se aplicó 12g de abono granular de fórmula 12-6-16-3-EM (elementos menores) cada siete días por cuatro semanas en el mes 8 para ayudar al crecimiento foliar.

## **1.2.6 Toma de datos en la siembra de suelo en descanso**

### **1.2.6.1 Porcentaje de brotación**

Se tomaron datos de las plantas germinadas tres veces por semana. Se calculó el porcentaje de brotación durante los primeros dos meses de las 70 semillas sembradas.

### **1.2.6.2 Diversidad de síntomas observados durante el periodo de 60 días**

Se observaron las plantas con síntomas asociados al mal seco, la necrosis foliar bacteriana, virosis y efecto de factores abióticos.

### **1.2.6.3 Promedio de malezas en la población**

Se identificaron las diferentes especies de malezas que germinaron en el suelo. Una vez a la semana se tomaron datos de las especies de malezas en la población y se sacó promedio de cada una después de 4 meses. Cada semana se desyerbaba.

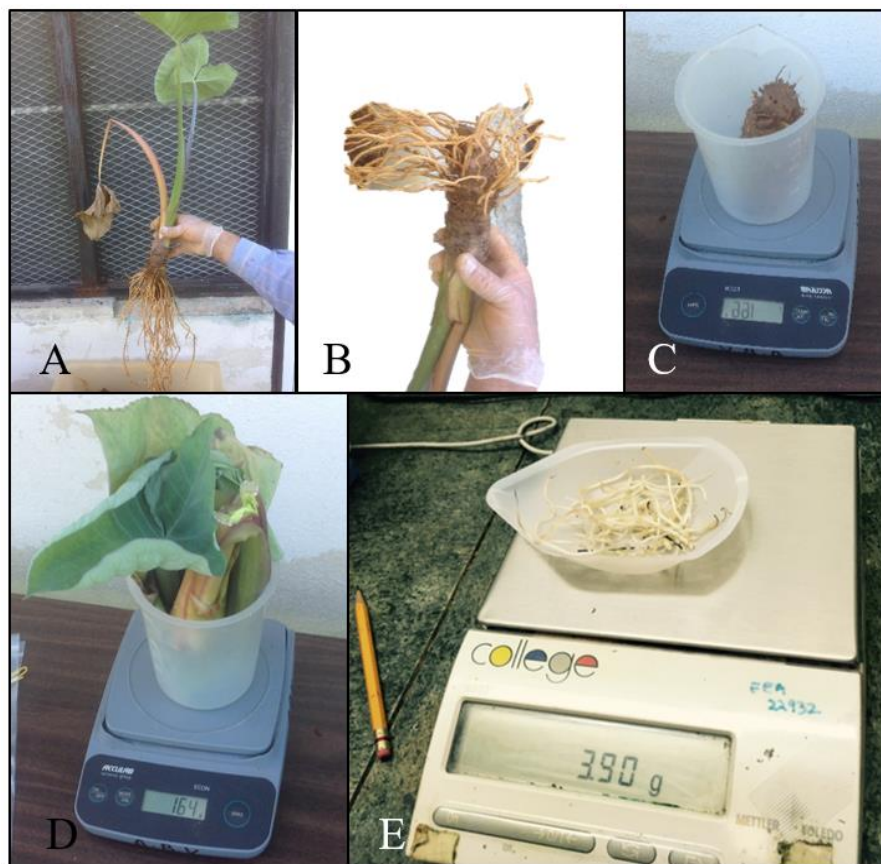
### **1.2.6.4 Variables altura, ancho y largo de hojas**

Se tomaron medidas del largo, ancho y altura de las hojas. De cada planta se seleccionó la tercera hoja más vieja para tomar las medidas. Esto se determinó observando el patrón de crecimiento del pseudotallo: las hojas más viejas tenían el peciolo en la parte exterior y las más nuevas salían del interior del tallo o entre los demás peciolos. Por lo tanto, se buscó la tercera hoja más vieja de afuera hacia dentro. Se tomó medida del largo desde el lóbulo inferior de la lámina foliar hasta la conexión con el peciolo. La medida de ancho se tomó buscando los lóbulos superiores de la hoja o la parte más ancha de la misma de forma horizontal. La medida de la altura se tomó desde la base del pseudotallo hasta el lóbulo inferior de la lámina foliar. Se tomaron datos del tamaño de las hojas a finales del mes 4, a principio del mes 6, a finales del mes 7 y a principio del mes 9. Se compararon los tratamientos y las fechas usando un diseño de parcelas divididas en bloques al azar. El Factor A en las parcelas completas fueron los tratamientos utilizados en el suelo en descanso ( $a= 8$ ). El Factor B en las subparcelas fueron las fechas cuando se midieron ( $b= 4$ ). Los bloques fueron cuatro. Se realizó análisis de varianza con prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para comparar las medias. Se utilizó el programa estadístico InfoStat® ver. 2015e para el resumen de datos y análisis estadístico.



### 1.2.7 Procedimiento de cosecha: SC y SD (Fig. 1.2)

Las yautías fueron cosechadas en el mes 10. Se sacaron individualmente empezando con las plantas del SD y luego el SC. Se utilizó el siguiente orden de cosecha en los tratamientos para evitar contaminación de las muestras con otros tratamientos: 7, 6, 1, 4, 5, 3, 2 y 8. No se regaron las plantas de dos días antes de empezar la cosecha para evitar exceso de tierra en las muestras de raíces. Se tomaron las plantas de un tratamiento y se sacaron del tiesto tratando no romper las hojas y las raíces. El exceso de tierra que quedó en las raíces de la planta extraída fue sacudido dentro de una bolsa limpia para recolectar el suelo que tuvo mayor contacto con las raíces para posteriormente usarlo para aislamiento. Luego, se evaluó el **porcentaje (%) de daño en raíces**. Esto se evaluó volteando la planta con las hojas hacia abajo de forma que las raíces se pudieran observar. Con un corte bilateral imaginario del cormo se observó la cantidad de raíces ausentes, necróticas y lesionadas en ambas partes y se estimó el % de daño en raíces. Después de tomar el % de daño en raíces, se arrancaron la mayor cantidad de raíces del cormo y se cortó el follaje de la planta desde la línea que divide el cormo y las hojas. Se sacó el **peso fresco del cormo**, el **follaje** y las **raíces** de cada planta. Las muestras de raíces de un mismo tratamiento del bloque 1 y 2 fueron guardadas en una misma bolsa. De esta misma forma se guardaron los cormos y el suelo. Se repitió los mismos pasos mezclando las muestras de los mismos tratamientos de los bloques 3 y 4. Las muestras de raíces fueron guardadas en un refrigerador a temperatura de 4°C y las muestras de suelo en una nevera de plástico con un “ice pad” para ser usadas posteriormente. Se utilizó un diseño en bloques completos aleatorizados para cada manejo de suelo como se especifica en la parte del diseño experimental (p. 5) y se realizó un análisis de varianza con prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para tratamientos y bloques. Se utilizó el programa estadístico InfoStat® ver. 2015e para el resumen de datos y análisis estadístico.



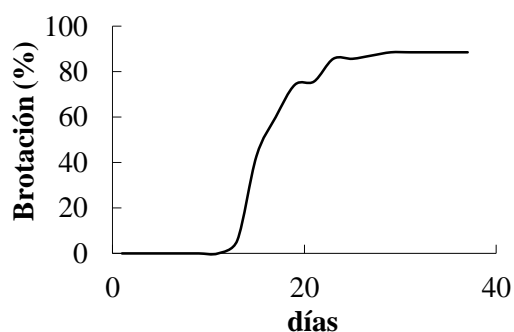
**Figura 1.2.** Procedimiento de cosecha de yautía Nazareno sembrada en invernadero en suelos de dos manejos distintos. A) Planta sacada del tiesto evitando el rompimiento de las raíces. B) % de daño en raíces. C) Peso del cormo. D) Peso foliar. E) Peso de las raíces.

## 1.3 RESULTADOS

### 1.3.1 Datos de siembra de suelo en descanso

#### 1.3.1.1 Porciento de brotación

Los brotes de las plantas de yautía empezaron a emerger a los 13 días. A los 20 días de sembrado se obtuvo una brotación de 85.94% y a los 30 días se alcanzó un 88.57% (Fig. 1.3).

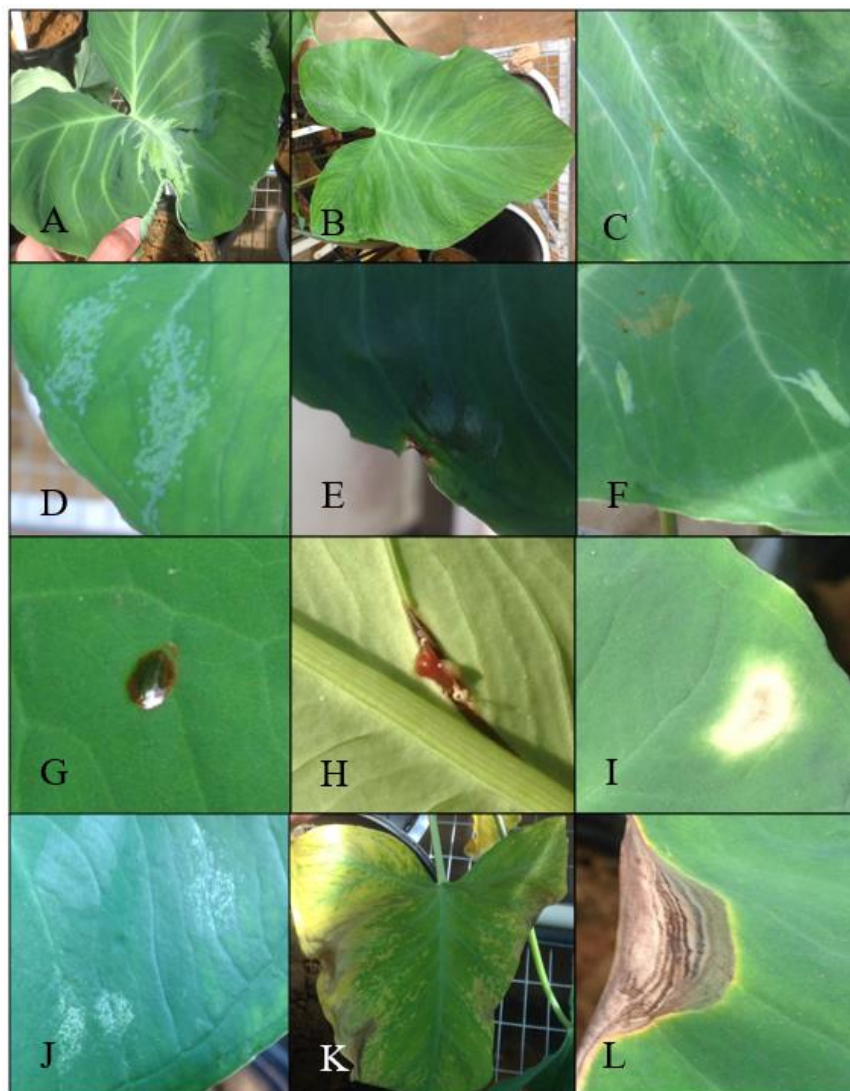


**Figura 1.3.** Porciento de brotación en la población de yautía Nazareno sembrado en tiestos con suelo en descanso bajo condiciones de invernadero.

#### 1.3.1.2 Diversidad de síntomas observados durante 60 días después de siembra (Fig. 1.4)

Se encontró una amplia variedad de síntomas. Empezando por los síntomas asociados a factores abióticos, se encontró clorosis intravenal posiblemente asociada a la deficiencia de magnesio. En los síntomas asociados a factores biológicos, hubo una incidencia de ácaros que provocaron pequeñas manchas cloróticas. Se observó la necrosis marginal y manchas intercostales en las hojas asociado a bacterias. Se hallaron unos anillos concéntricos y quemazones posiblemente asociados a bacterias o factores abióticos como agua en altas temperaturas. Se observó un caso de tizón severo en una planta del tratamiento #8

asociado a las bacterias aplicadas en el suelo para control del mal seco. No se observaron síntomas del mal seco, pero se observó un amarillamiento progresivo de las hojas jóvenes que llegaban a marchitarse, la necrosis parcial leve del peciolo, observado en la parte basal, y la flacidez de los peciolos. A las últimas semanas se observó más amarillamiento en hojas viejas asociándose a falta de nutrientes. La presencia del virus del mosaico de la Malanga (DMV, en sus siglas en inglés) (Reyes et al, 2006), estuvo en toda la población y se pudieron observar síntomas muy variables en severidad. Se observaron mosaicos amarillentos, manchas grises en forma de puntos o intravenales, manchas verdes claro y amarillentas en forma dispersada, lineal, esponjoso o irregular, exudaciones de la hoja de color marrón, enroscamientos y hasta pústulas que provocaban lesiones con el tiempo. Algunos síntomas desaparecieron los primeros meses, pero otros como el mosaico perduraron desde el principio y avanzaron con gran severidad hasta ser evidentes en todas las plantas.



**Figura 1.4.** Síntomas observados durante 60 días después de la siembra en yautía Nazareno en suelo en descanso. A) Haz de hoja con mancha radial en vena central. B) Haz de hoja con mosaico amarillo. C) Haz de hoja con pústulas. D) Haz de hoja con manchas grises en un extremo. E) Exudación seca en el borde de una hoja. F) Haz de hoja con manchas en forma de rayas. G) Exudación color ambar en el haz de una hoja. H) Exudación rojiza con pus en el envés de la hoja. I) Quemazón seco en el haz de la hoja provocado por agua caliente de una gotera del techo del invernadero. J) Manchas cloróticas provocadas por ácaros. K) Clorosis marginal provocada por bacterias. L) Lesión de bacteriosis marginal.

### 1.3.1.3 Ocurrencia de malezas en la población sembrada en invernadero en SD

#### (Tabla 1.2)

Durante 4 meses se observó una variedad de malezas en donde *Oxalis corymbosa* D.C. tuvo mayor ocurrencia, mientras que *Lepidium virginicum* L. fue la menor. Además, se observaron malezas como bledo, paraguaita morada, rabo de buey, leche vana, lechecillo, coquí, bejuco de puerco y quinino del pobre. Dos especies no pudieron ser identificadas.

**Tabla 1.2.** Malezas encontradas en la población de yautías sembradas en suelo en descanso durante cuatro meses

| <u>Nombre científico</u>                      | <u>Nombre común</u> | <u>Porcentaje (%)</u> |
|---|---------------------|-----------------------|
| <i>Amaranthus dubius</i> Mart. ex Thell.      | Bledo               | 2.62                  |
| <i>Chloris barbata</i> Sw.                    | Paraguaita morada   | 7.31                  |
| <i>Cyanthillium cinereum</i> (L.) H. Rob.     | Rabo de buey        | 3.94                  |
| <i>Cyperus rotundus</i> L.                    | Coquí               | 6.56                  |
| <i>Euphorbia heterophylla</i> L.              | Leche vana          | 12.68                 |
| <i>Euphorbia hirta</i> L.                     | Lechecillo          | 15.75                 |
| <i>Ipomea tiliacea</i> (Willd.) Choisy ex DC. | Bejuco de puerco    | 5.35                  |
| <i>Lepidium virginicum</i> L.                 | Mastuerzo           | 1.31                  |
| <i>Oxalis corymbosa</i> D.C.                  | Vinagrillo morado   | 19.39                 |
| <i>Phyllanthus niruru</i> L.                  | Quinino del pobre   | 9.62                  |
| <i>Portulaca oleracea</i> L.                  | Verdolaga           | 8.06                  |
| -   | Desconocida 1       | 4.59                  |
| -   | Desconocida 2       | 2.81                  |

### 1.3.1.4 Variables altura, ancho y largo de la hoja

Se analizaron los datos de las variables de altura, ancho y largo de las hojas para las plantas sembradas en suelo en descanso. No se halló normalidad de residuos según prueba de Shapiro-Wilks para la variable de largo (Valor-p=0.0001), por lo tanto, no se analizó la misma. Con el análisis de varianza no se observaron interacciones (Trat\*Mes) significativas en ninguna de las variables. Sin embargo, si hubo diferencias significativas entre tratamientos, bloques y meses en todas las variables. Los datos de altura y ancho

tuvieron coeficiente de determinación moderadamente alto ( $R^2=0.84$  y  $0.81$  respectivamente) y poca variación ( $CV= 8.37$  y  $11.20$  respectivamente). Esto indica que a medida que pasaba el tiempo (ya que se tomaron las medidas por 4 fechas diferentes) el follaje se desarrollaba más en altura y ancho (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3.** Análisis de varianza para medidas de hojas en plantas de yautía Nazareno sembradas en suelo en descanso en cuatro fechas diferentes.

| Variables | Fuente de variación <sup>a</sup> |             |         |        | R <sup>2c</sup> | CV <sup>d</sup> | Shapiro-Wilks <sup>e</sup> |
|-----------|----------------------------------|-------------|---------|--------|-----------------|-----------------|----------------------------|
|           | Interacción <sup>b</sup>         | Tratamiento | Mes     | Bloque |                 |                 |                            |
| Altura    | 0.2930                           | 0.0051      | <0.0001 | 0.0411 | 0.84            | 8.37            | 0.2345                     |
| Ancho     | 0.7704                           | 0.0014      | <0.0001 | 0.0202 | 0.81            | 11.20           | 0.5100                     |

<sup>a</sup>Valores p para fuentes de variación. Si el valor p es mayor al nivel de significancia (valor-p > 0.05), no hay diferencias significativas

<sup>b</sup>Tratamiento\*Mes

<sup>c</sup>Coefficiente de determinación

<sup>d</sup>Coefficiente de variación

<sup>e</sup>Valores p para pruebas de Shapiro-Wilks. Si valor-p > 0.05, hay normalidad de residuos.

### 1.3.1.4.1 Altura

En la variable de altura hubo diferencias significativas entre tratamientos y fechas. Los tratamientos (Ts) 3 y 2 (83.49 cm y 84.46 cm, respectivamente) tuvieron una altura significativamente mayor a los demás Ts. El T 7 (control (-)) tuvo altura menor (74.64 cm) a los otros Ts excepto con T 4 (73.97 cm) (Tabla 1.4). Para las fechas donde se tomaron los datos de altura, en el mes 7 (63.21 cm) la altura fue significativamente menor a los demás meses, mientras que en el mes 4 (90.20 cm) la altura fue significativamente mayor a los otros meses (Tabla 1.5). Esto puede estar asociado al daño ocasionado por los ácaros. Se registró un daño mayor al follaje en los meses 6 y 7, mientras que el mes 9 se observó una mejoría. El bloque 2 (74.52 cm) tuvo una altura significativamente menor a los demás bloques (Tabla 1.6).

### 1.3.1.4.2 Ancho

En la variable de ancho, también se reportaron diferencias significativas entre Ts y fechas. Se observó que las hojas en los Ts 3 y 2 (23.54 cm y 24.73 cm) fueron significativamente más anchas que los demás Ts, resultado visto en altura también (Tabla 1.4). El ancho de las hojas fue significativamente diferente en todas las fechas medidas. De menor a mayor: Mes 7 (17.49 cm), Mes 6 (20.71 cm), Mes 9 (22.73 cm) y Mes 4 (25.96 cm) (Tabla 1.5). Los bloques 2 y 1 (20.67 cm y 21.35 cm respectivamente) tuvieron ancho de hoja significativamente menor al bloque 3 (22.96 cm) (Tabla 1.6).

**Tabla 1.4.** Tamaño de hojas según tratamientos en plantas de yautía Nazareno sembradas en suelo en descanso.

| Trat           | Altura (cm) |               | Ancho (cm) |              |
|----------------|-------------|---------------|------------|--------------|
| 1 <sup>a</sup> | 76.12       | a*            | 21.09      | a            |
| 2              | 84.46       | b             | 24.73      | b            |
| 3              | 83.49       | b             | 23.54      | b            |
| 4              | 73.97       | a             | 20.67      | a            |
| 5              | 77.39       | a             | 21.04      | a            |
| 6              | 75.52       | a             | 20.45      | a            |
| 7              | 74.64       | a             | 20.79      | a            |
| 8              | 77.69       | a             | 21.45      | a            |
|                |             | DMS= 5.70346* |            | DMS= 1.99628 |

\*Medias con letras en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

\*Tratamientos: 1) Kocide 3000® + Bioplex®, 2) Bacterias 1-4 + Bioplex®, 3) Bacteria 5 + Bioplex®, 4) Cito Grower® + Bioplex®, 5) Serenade® + Bioplex®, 6) Bioplex®, 7) Control (-), 8) Bacterias 1-4.

**Tabla 1.5.** Tamaño de hojas de plantas de yautía Nazareno en suelo en descanso medidas en distintas fechas (meses).

| Mes | Altura (cm) |              | Ancho (cm) |             |
|-----|-------------|--------------|------------|-------------|
| 4   | 90.20       | c*           | 25.96      | d           |
| 6   | 78.64       | b            | 20.71      | b           |
| 7   | 63.21       | a            | 17.49      | a           |
| 9   | 79.60       | b            | 22.73      | c           |
|     |             | DMS=3.25084* |            | DMS=1.21208 |

\*Medias con letras en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

**Tabla 1.6.** Tamaño de hojas de plantas de yautía Nazareno en suelo en descanso promediado en bloques.

| Bloque | Altura (cm) |               | Ancho (cm) |             |
|--------|-------------|---------------|------------|-------------|
| 1      | 77.88       | ab*           | 21.35      | a           |
| 2      | 74.52       | a             | 20.67      | a           |
| 3      | 80.37       | b             | 22.96      | b           |
| 4      | 78.87       | b             | 21.91      | ab          |
|        |             | DMS= 4.03296* |            | DMS=1.41159 |

\*Medias con letras en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).



## 1.3.2 Variables de cosecha

En las variables evaluadas de peso de cormo, de follaje y de raíces y % de daño en raíces, se observaron pocas diferencias significativas en los tratamientos para los dos tipos de suelo. Sin embargo, todas las variables de peso en **suelo en descanso (SD)** tuvieron medias mayores que las de **suelo de uso continuo (SC)**. También las medias de % de daño en raíces en el SC fueron mayores que en el SD (Tabla 1.9).

### 1.3.2.1 Suelo de uso continuo

Según el análisis de varianza, no hay diferencias significativas para Ts en ninguna de las variables medidas, solo se observan diferencias significativas en los bloques para la variable de peso foliar (Valor-p = 0.0300) y peso de raíces (Valor-p = 0.0091). Existe normalidad en los residuos para los datos de todas las variables. Hay un  $R^2$  bajo en todas las variables especialmente en % de daño en raíces ( $R^2 = 0.17$ ). Los datos de peso de raíces tienen mayor variación (CV= 36.48) mientras que % de daño en raíces tiene menor variación (CV= 13.39) (Tabla 1.7).

**Tabla 1.7.** Análisis de varianza de variables de cosecha para plantas de yautía Nazareno sembradas en el suelo de uso continuo.

| Variables        | Fuentes de variación* |        | R <sup>2</sup> | CV    | Shapiro-Wilks <sup>a</sup> |
|------------------|-----------------------|--------|----------------|-------|----------------------------|
|                  | Tratamiento           | Bloque |                |       |                            |
| Peso de cormos   | 0.4711                | 0.5530 | 0.30           | 24.57 | 0.9744                     |
| Peso foliar      | 0.1211                | 0.0300 | 0.53           | 29.75 | 0.8752                     |
| Peso de raíces   | 0.5406                | 0.0091 | 0.50           | 36.48 | 0.5973                     |
| % daño de raíces | 0.9335                | 0.5781 | 0.17           | 13.39 | 0.6316                     |

\*Valores p para fuentes de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

<sup>a</sup>Valores p para pruebas de Shapiro-Wilks. Si valor-p > 0.05, hay normalidad de residuos.

#### 1.3.2.1.1 Peso de cormos

El T5 (86g) tuvo un peso significativamente mayor al T8 (58.13g) según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ). Sin embargo, el T7 (control) no tuvo un peso significativamente diferente al T5 (Tabla 1.9). El bloque (**B**) 1 obtuvo el peso más bajo (64.50 g), mientras que el B 2 fue el más alto (76 g) (Tabla 1.10).

### **1.3.2.1.2 Peso foliar**

El T3 (39.63g) tuvo un peso significativamente menor a los T5 y 1 (66.88g y 72.38g respectivamente), mientras que el peso del T2 (45.38g) es significativamente menor al T1 (Tabla 1.9) según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ). El B 3 (44.06g) tuvo un peso significativamente más bajo que los Bs 2 (61.75g) y 1 (64.75g), mientras que B 4 (45.31g) tuvo un peso significativamente más bajo al B 1 (Tabla 1.10).

### **1.3.2.1.3 Peso de raíces**

No hubo diferencias significativas entre Ts según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ). El T3 (30.88g) tuvo el peso menor, mientras que T2 (48.75g) tuvo el peso mayor (Tabla 1.9). El B 2 (54.13g) tuvo un peso significativamente mayor a los demás bloques (Tabla 1.10).

### **1.3.2.1.4 % de daño en raíces**

No hubo diferencias significativas entre Ts y Bs según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ). El porcentaje de daño más alto fue en el T3 (84.38g) y el peso más bajo fue en el T7 (76.25g) (Tabla 1.9). El B con peso más alto fue B4 (82.81g) y el B con el peso más bajo fue el B2 (75.94g) (Tabla 1.10).

## **1.3.2.2 Suelo en descanso**

Según el análisis de varianza, solo existen diferencias significativas para Ts en peso foliar (Valor- $p=0.0497$ ) y diferencias significativas entre Bs para todas las variables excepto para peso de cormos (Valor- $p=0.4968$ ) (Tabla 1.8). El peso foliar tiene un  $R^2$  moderadamente alto ( $R^2= 0.81$ ), le sigue % de daño en raíces ( $R^2= 0.65$ ) y se empieza a perder en peso de raíces ( $R^2= 0.41$ ) y peso de cormos ( $R^2= 0.33$ ). El CV más bajo lo tiene el peso de cormos (CV= 17.33) y el CV más alto lo tiene peso de raíces (CV= 26.95).

**Tabla 1.8.** Análisis de varianza de variables de cosecha para plantas sembradas en suelo en descanso.

| Variables de cosecha | Fuentes de variación* |         | R <sup>2</sup> | CV    | Shapiro-Wilks <sup>a</sup> |
|----------------------|-----------------------|---------|----------------|-------|----------------------------|
|                      | Tratamiento           | Bloque  |                |       |                            |
| Peso de cormos       | 0.3698                | 0.4968  | 0.33           | 17.33 | 0.7521                     |
| Peso foliar          | 0.0497                | <0.0001 | 0.81           | 17.79 | 0.3813                     |
| Peso de raíces       | 0.8340                | 0.0285  | 0.41           | 26.95 | 0.5353                     |
| % de daño en raíces  | 0.9621                | 0.0001  | 0.65           | 18.17 | 0.6722                     |

\*Valores p para fuentes de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

<sup>a</sup>Valores p para pruebas de Shapiro-Wilks. Si valor-p > 0.05, hay normalidad de residuos.

### 1.3.2.2.1 Peso de cormos

El peso obtenido en T3 (154.25g) es significativamente mayor al T6 (116.50g). Los demás Ts no son significativamente diferentes entre sí según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ) (Tabla 1.9). El B 4 tiene peso menor (129.44g) mientras que el B 1 tiene peso mayor (145.56g) (Tabla 1.10).

### 1.3.2.2.2 Peso foliar

El T6 (147.38g) tuvo un peso significativamente mayor a los demás Ts según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ). El T7 tuvo el peso más bajo (100.38g) (Tabla 1.9). Los Bs 3 y 4 (75.06g y 89.38g respectivamente) tuvieron pesos significativamente menores a los Bs 2 y 1 (130.63g y 145.63g respectivamente) (Tabla 1.10).

### 1.3.2.2.3 Peso de raíces

No hubo diferencias significativas entre Ts según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ). El T1 (62.33g) tuvo el peso mayor, mientras que el T5 (48.88g) tuvo el peso menor (Tabla 1.9). El B 4 (44.44g) tuvo un peso significativamente menor a los Bs 1 (62g) y 2 (63.81g), mientras que el B 3 (47.31g) tuvo un peso significativamente menor al B 2 (Tabla 1.10).

#### **1.3.2.2.4 % de daño en raíces**

No hubo diferencias significativas entre los Ts según prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ). El T3 (62.50%) tuvo el % de daño mayor y el T7 (55%) tuvo el porcentaje menor (Tabla 1.9). Los B 1 (45.94%) y 2 (47.81%) tuvieron % de daño significativamente menor a los B 3 (69.06%) y 4 (70.31%) (Tabla 1.10).

### **1.3.3 Variables de cosecha con $\alpha=15\%$**

Con fines de discriminar el efecto entre tratamientos se corrió un análisis con  $\alpha=0.15$  para ambos tipos de suelo.

#### **1.3.3.1 Suelo Continuo**

##### **1.3.3.1.1 Peso de cormos**

El T8 tuvo un peso significativamente mayor a los Ts 1 y 5 según prueba Fisher ( $\alpha=0.15$ ). El efecto de las bacterias 1-4 es mayor al del CuOH y Serenade® que fueron, además, enmendadas con Bioplex®. El T6 tuvo un peso significativamente mayor al T5, indicativo de que el Bioplex® solo fue más efectivo que Bioplex® en presencia de Serenade® (Tabla 1.11).

##### **1.3.3.1.2 Peso de raíces**

Los T5 y 2 tuvieron un peso significativamente mayor al T3 según prueba Fisher ( $\alpha=0.15$ ). El T2 tuvo un peso significativamente mayor al T4. Esto puede significar que el T de Serenade® y las bacterias 1-4, enmendadas con Bioplex®, fueron significativamente mejor en prevenir la reducción de raíces por patógenos (Tabla 1.11).

### **1.3.3.1.3 % de daño en raíces**

No se observaron diferencias significativas según prueba Fisher ( $\alpha = 0.15$ ) (Tabla 1.11).

### **1.3.3.2 Suelo en descanso**

#### **1.3.3.2.1 Peso de cormos**

El T6 obtuvo un peso significativamente menor a los T1, 2 y 3 según prueba Fisher ( $\alpha=0.15$ ). El T4 tuvo un peso significativamente menor al T3. Esto significa que los Ts de CuOH, las bacterias 1-4 y la bacteria 5, enmendados con Bioplex®, fueron más efectivos que el Bioplex® solo. La bacteria 5, que se encontró que podía estimular el crecimiento de las raíces, fue más efectiva que Cito Grower®, que contiene citoquinina que estimula el crecimiento apical, por lo tanto, de las raíces (Tabla 1.11).

#### **1.3.3.2.2 Peso de raíces**

No hubo diferencias significativas entre los Ts con este nivel de significancia (Tabla 1.11).

### 1.3.3.2.3 % de daño en raíces

No hubo diferencias significativas entre los Ts con este nivel de significancia (Tabla 1.11).

**Tabla 1.9.** Peso de cormos, foliar, de raíces y % de daño en raíces según tratamientos aplicados a la yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos distintos

|                   | <u>Suelo de uso continuo</u> |     | <u>Suelo en descanso</u> |    |
|-------------------|------------------------------|-----|--------------------------|----|
| Trat <sup>a</sup> | Peso de cormos (g)           |     | Peso de cormos (g)       |    |
| 1                 | 79.25                        | ab* | 143.75                   | ab |
| 2                 | 70.88                        | ab  | 147.38                   | ab |
| 3                 | 67.88                        | ab  | 154.25                   | b  |
| 4                 | 73.88                        | ab  | 122.5                    | ab |
| 5                 | 86.00                        | b   | 138.5                    | ab |
| 6                 | 63.75                        | ab  | 116.5                    | a  |
| 7                 | 73.25                        | ab  | 130.63                   | ab |
| 8                 | 58.13                        | a   | 139.88                   | ab |
|                   | DMS= 25.87992*               |     | DMS= 34.82601            |    |
| Trat              | Peso foliar (g)              |     | Peso foliar (g)          |    |
| 1                 | 72.38                        | c   | 109.38                   | a  |
| 2                 | 45.38                        | ab  | 110.25                   | a  |
| 3                 | 39.63                        | a   | 103.13                   | a  |
| 4                 | 57.25                        | abc | 100.38                   | a  |
| 5                 | 66.88                        | bc  | 105.63                   | a  |
| 6                 | 49.25                        | abc | 147.38                   | b  |
| 7                 | 53.13                        | abc | 100.38                   | a  |
| 8                 | 47.88                        | ab  | 104.88                   | a  |
|                   | DMS= 23.61299                |     | DMS= 28.82062            |    |
| Trat              | Peso de raíces (g)           |     | Peso de raíces (g)       |    |
| 1                 | 42.88                        | a   | 63.00                    | a  |
| 2                 | 48.75                        | a   | 56.00                    | a  |
| 3                 | 30.88                        | a   | 49.00                    | a  |
| 4                 | 33.00                        | a   | 60.00                    | a  |
| 5                 | 46.75                        | a   | 49.00                    | a  |
| 6                 | 36.75                        | a   | 51.00                    | a  |
| 7                 | 35.25                        | a   | 55.00                    | a  |
| 8                 | 35.13                        | a   | 53.00                    | a  |
|                   | DMS=20.7434                  |     | DMS= 21.55199            |    |
| Trat              | % de daño en raíces          |     | % de daño en raíces      |    |
| 1                 | 80.00                        | a   | 58.13                    | a  |
| 2                 | 78.13                        | a   | 60.63                    | a  |
| 3                 | 84.38                        | a   | 62.50                    | a  |
| 4                 | 76.88                        | a   | 56.25                    | a  |
| 5                 | 76.88                        | a   | 60.63                    | a  |
| 6                 | 80.63                        | a   | 55.63                    | a  |
| 7                 | 76.25                        | a   | 55.00                    | a  |
| 8                 | 83.13                        | a   | 57.50                    | a  |
|                   | DMS= 15.65631                |     | DMS= 15.56871            |    |

\*Medias con letras en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )

<sup>a</sup>Tratamientos: 1) Kocide 3000® + Bioplex®, 2) Bacterias 1-4 + Bioplex®, 3) Bacteria 5 + Bioplex®, 4) Cito Grower® + Bioplex®, 5) Serenade® + Bioplex®, 6) Bioplex®, 7) Control (-), 8) Bacterias 1-4.

**Tabla 1.10.** Peso de cormo, foliar, de raíces y % de daño en raíces promediado en bloques para yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos diferentes

|               | <u>Suelo de uso continuo</u> |    | <u>Suelo en descanso</u>   |    |
|---------------|------------------------------|----|----------------------------|----|
| <b>Bloque</b> | <b>Peso de cormos (g)</b>    |    | <b>Peso de cormos (g)</b>  |    |
| 1             | 64.50                        | a* | 145.56                     | a  |
| 2             | 76.00                        | a  | 140.31                     | a  |
| 3             | 70.81                        | a  | 131.38                     | a  |
| 4             | 75.19                        | a  | 129.44                     | a  |
|               | DMS=18.29987*                |    | DMS=24.62571               |    |
| <b>Bloque</b> | <b>Peso foliar (g)</b>       |    | <b>Peso foliar (g)</b>     |    |
| 1             | 64.75                        | c  | 145.63                     | b  |
| 2             | 61.75                        | bc | 130.63                     | b  |
| 3             | 44.06                        | a  | 75.06                      | a  |
| 4             | 45.31                        | ab | 89.38                      | a  |
|               | DMS=16.69691                 |    | DMS=20.37926               |    |
| <b>Bloque</b> | <b>Peso de raíces (g)</b>    |    | <b>Peso de raíces (g)</b>  |    |
| 1             | 38.94                        | a  | 62.00                      | bc |
| 2             | 54.13                        | b  | 63.81                      | c  |
| 3             | 28.63                        | a  | 47.31                      | ab |
| 4             | 33.00                        | a  | 44.44                      | a  |
|               | DMS=14.66780                 |    | DMS=15.23956               |    |
| <b>Bloque</b> | <b>% de daño en raíces</b>   |    | <b>% de daño en raíces</b> |    |
| 1             | 78.13                        | a  | 45.94                      | a  |
| 2             | 75.94                        | a  | 47.81                      | a  |
| 3             | 81.25                        | a  | 69.06                      | b  |
| 4             | 82.81                        | a  | 70.31                      | b  |
|               | DMS=11.07068                 |    | DMS=11.00874               |    |

\*Medias con letras en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )

**Tabla 1.11.** Peso de cormos, de raíces y % de daño en raíces según tratamientos aplicados a la yautía Nazareno sembrada en suelo de dos manejos distintos con nivel de significancia de 15%.

|      | <u>Suelo de uso continuo</u> |     | <u>Suelo en descanso</u> |     |
|------|------------------------------|-----|--------------------------|-----|
| Trat | Peso de cormos (g)           |     | Peso de cormos (g)       |     |
| 1    | 79.25                        | bc* | 143.75                   | bc  |
| 2    | 70.88                        | abc | 147.38                   | bc  |
| 3    | 67.88                        | abc | 154.25                   |     |
| 4    | 73.88                        | abc | 122.50                   | ab  |
| 5    | 86.00                        | c   | 138.50                   | abc |
| 6    | 63.75                        | ab  | 116.50                   | a   |
| 7    | 73.25                        | abc | 130.63                   | abc |
| 8    | 58.13                        | a   | 139.88                   | abc |
|      | DMS=18.59461*                |     | DMS=25.02234             |     |
| Trat | Peso de raíces (g)           |     | Peso de raíces (g)       |     |
| 1    | 42.88                        | abc | 62.63                    | a   |
| 2    | 48.75                        | c   | 56.13                    | a   |
| 3    | 30.88                        | a   | 48.88                    | a   |
| 4    | 33.00                        | ab  | 60.25                    | a   |
| 5    | 46.75                        | bc  | 48.88                    | a   |
| 6    | 36.75                        | abc | 50.63                    | a   |
| 7    | 35.25                        | abc | 54.88                    | a   |
| 8    | 35.13                        | abc | 52.88                    | a   |
|      | DMS=14.90405                 |     | DMS=15.48501             |     |
| Trat | % de daño en raíces          |     | % de daño en raíces      |     |
| 1    | 80.00                        | a   | 58.13                    | a   |
| 2    | 78.13                        | a   | 60.63                    | a   |
| 3    | 84.38                        | a   | 62.50                    | a   |
| 4    | 76.88                        | a   | 56.25                    | a   |
| 5    | 76.88                        | a   | 60.63                    | a   |
| 6    | 80.63                        | a   | 55.63                    | a   |
| 7    | 76.25                        | a   | 55.00                    | a   |
| 8    | 83.13                        | a   | 57.50                    | a   |
|      | DMS=11.24899                 |     | DMS=11.18605             |     |

\*Medias con letras en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.15$ )

<sup>a</sup>Tratamientos: 1) Kocide 3000® + Bioplex®, 2) Bacterias 1-4 + Bioplex®, 3) Bacteria 5 + Bioplex®, 4) Cito Grower® + Bioplex®, 5) Serenade® + Bioplex®, 6) Bioplex®, 7) Control (-), 8) Bacterias 1-4.



## 1.4 DISCUSIÓN

En las medidas de hojas del SD se obtuvo una altura y ancho mejor con los Ts 2 y 3. El T2, que contiene 4 bacterias y el producto Bioplex®, productos con hongos biocontroladores, tuvieron un efecto positivo en la protección y el desarrollo de las plantas del SD (Tabla 1.4). Un estudio en yautía encontró que hay especies y cepas de *Pseudomonas* spp. que producen fenazinas que inhiben el crecimiento de *Pythium myriotylum* (Perneel et al, 2007). Otro experimento similar probó una cepa de *P. aeruginosa* y otra cepa mutada in vitro y encontraron que la no mutada producía metabolitos como oxiclrorafina que inhibieron el crecimiento micelial de *P. myriotylum* en caldo de papa y dextrosa. La cepa de *P. aeruginosa* fue más efectiva que la mutada en controlar *P. myriotylum* en suelo sembrado con yautía (Tambong y Höfte, 2001). No se ha encontrado mucha información sobre el producto Bioplex® pero si hay una gran cantidad de información de hongos como *Trichoderma* spp. que se encuentran en la mezcla del producto y se han usado intensamente en diferentes estudios. Se ha usado *Trichoderma harzianum* para controlar los hongos *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. para el control del “sancocho del semillero” en tomate (Perdomo et al, 2007). En una tesis con yautía se probó *Trichoderma* spp. y resultó ser un buen control, pero no tan bueno como metalaxil, un control químico utilizado contra *P. myriotylum* (Carcache Torres y Díaz Mayorga, 2010). La bacteria 5 se utilizó por ser una bacteria que estimula el crecimiento de las raíces en yautía. Las rizobacterias han sido estudiadas ampliamente en diversos cultivos, porque pueden estimular el crecimiento de las plantas y protegerlas de enfermedades. El crecimiento de las plantas es debido al aumento de nutrientes adquiridos o estimulación hormonal. Las bacterias pueden suprimir una enfermedad por medio de competencia por la colonización de las raíces, antagonismo o inducción del sistema de resistencia de la planta (García-Gutiérrez, 2012).

Por otra parte, las medidas de hojas para el SD dieron muchas diferencias significativas entre bloques, tratamientos y meses a pesar que algunos no tuvieron mucha diferencia en las pruebas Fisher

(Tabla 1.4, 1.5 y 1.6). Además, se observó que los bloques con medias más altas y frecuentes fueron el B3, B4 y por último B1. Se vio una diferencia muy marcada entre meses especialmente el 4to y 7mo mes. Apartir del mes 4 la población de ácaros aumentó y provocó reducción en el tejido foliar en los meses siguientes. El crecimiento del tejido foliar mejoró para el mes 9 gracias a la aplicación del insecticida malatión y el abono.

Los resultados para la cosecha indican que no hay diferencias significativas en los tratamientos bajo las variables de peso en los dos tipos de suelo estudiados. Solamente vemos que en peso foliar de SD hubo diferencias significativas ( $p > 0.0497$ ) con  $\alpha = 5\%$ . Observando las medias más altas vemos que en el SC, el Serenade® + Bioplex® (T5) tuvo peso de cormos más alto, el CuOH (T1) tuvo peso foliar más alto, las bacterias biocontroladoras + Bioplex® (T2) el peso de raíces más alto y en % de daño en raíces en el control (T7) fue el más bajo, mientras que la Bacteria estimulante de raíces + Bioplex® (T3) fue el % más alto. En SD, el T3 tuvo peso de cormos más alto, el Bioplex® (T6) el peso foliar más alto, el CuOH (T1) el peso de raíces más alto y, al igual que en SC, el T7 tiene % de daño en raíces más bajo y T3 tiene el % más alto. El Kocide 3000®, nombre comercial para el ingrediente activo de CuOH, y el Serenade®, conteniendo a *Bacillus subtilis* como ingrediente principal, se aplicaron foliarmente. El primero como fungicida preventivo y el segundo para inducir el mecanismo natural de defensa que tiene la planta tras la invasión de un patógeno. El cobre es un metal esencial para todos los seres vivos. Compone muchas enzimas importantes como la oxidasa del citocromo, componente del ciclo de Krebs llevado a cabo en las mitocondrias (Stenersen, 2004a). El ion cúprico ( $\text{Cu}^{2+}$ ) del fungicida actúa como productor de radicales libres. Cuando  $\text{Cu}^{2+}$  secuestra un electrón del catión cuproso ( $\text{Cu}^+$ ) se lo da al oxígeno y se produce un anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), un compuesto muy inestable. Esto provoca una reacción en cadena que destruye biomoléculas, después destruye la membrana celular, ácidos nucleicos y otras estructuras celulares (Stenersen, 2004b). Se necesita estudiar el crecimiento de los hongos patógenos de la yautía en presencia del CuOH para ver si afecta el crecimiento. No se ha estudiado el uso de *Bacillus* spp. como agente

biocontrolador e inductor del sistema de resistencia de la yautía. Sin embargo, se ha encontrado estimulando el sistema de resistencia de la soja (*Glycine max* L.) contra la mancha foliar causada por el hongo *Cercospora sojina*. La bacteria *Bacillus* spp. cepa CHEP 5 estimuló la biosíntesis de ácido jasmónico. En el estudio se midió el mRNA producido por el gen *GmAOS* de la soja, el cual está ligado al aumento de proteínas relacionadas a la patogenicidad como la sintasa de óxido de aleno, peroxidasa y el inhibidor de la quimotripsina. Las raíces de las plantas de soja fueron inoculadas con la bacteria y se observó una reducción de la enfermedad hasta un 40% en el follaje (Tonelli y Fabra, 2014). Esto explica que la resistencia inducida es un mecanismo sistémico en la planta. Otro estudio demostró que la cepa de *Bacillus subtilis* B579 no solo es un agente antagónico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, patógeno del pepino, sino que induce el sistema de defensa de la planta de pepino ya que se reportaron altos niveles de polifenol oxidasa, peroxidasa y fenilalanina amonialiasa, enzimas relacionadas a la defensa de la planta (Chen et al, 2010). Aunque no se ha estudiado compuestos producidos por el sistema de defensa inducidos por un microorganismo beneficioso en yautía, sí se ha estudiado cuando se le aplica compuestos imitadores del sistema de defensa de la planta. El Benzotidiazol (BTH) es un análogo del ácido salicílico que ha sido utilizado mucho para proteger a las plantas de enfermedades causadas por bacterias, hongos y virus. Mbouobda y colaboradores (2010) descubrieron que la aplicación de solo 200mg/L de un producto conteniendo BTH se obtuvo una incidencia menor de pudrición de raíces, causada por *Pythium myriotylum*. En el cultivar susceptible, las raíces de plantas tratadas con BTH e inoculadas con *P. myriotylum* obtuvieron 30% menos daño. Además se observó un aumento de compuestos fenólicos, peroxidasa y polifenoloxidasa, las cuales son enzimas claves para el control de la enfermedad usando el mecanismo de defensa de la planta.

Se confirmó que los pesos de cormo, de follaje y de raíces del SD son mayores que el SC. Estos resultados concuerdan con el conjunto tecnológico que recomienda dejar un suelo al barbecho por tres años para obtener mejores rendimientos en el cultivo de yautía. También el porcentaje de infección de raíces indicó que el mayor daño por patógenos ocurre en SC. Estos resultados concuerdan con los de Bosques

(1993), que sembró once variedades de yautía en la EEA de Isabela en un mismo terreno por dos años. El segundo año tuvo rendimientos significativamente más bajos que el primero. A los ocho meses de siembra se reportó una incidencia de mal seco de 80% en las plantas de los cultivares Barbados, Vinola, Alela y otros.

Dentro de las variables analizadas en la cosecha, en el SD los B2, B1 y B3 tuvieron medias más altas. En el SC los B2 y B1 también tuvieron medias más elevadas en las variables medidas. Esto podría explicarse no solo por los tratamientos, sino por el factor de luz solar y el daño causado por ácaros. Como el experimento se realizó en un invernadero se observaba mayor luz solar en tales bloques (B2 y B3) de SC mientras que los B3 y B4 de ambos tipos de suelo no recibían tanto la luz necesaria durante las horas de la mañana.

Se recomienda para futuros experimentos prevenir el ataque de ácaros que no tan solo afectaron el follaje, sino las otras variables. Sin un follaje vigoroso el proceso de fotosíntesis no se lleva a cabo eficientemente y se afectan los demás órganos que utilizan la energía sintetizada por fotosíntesis, en este caso, los cormos. Es necesario probar cada tratamiento por separado en pruebas *in vitro* e *in vivo* para saber cuál de los microorganismos o productos son más efectivos y donde se produce mayor control de los patógenos en la yautía.

## 1.5 BIBLIOGRAFÍA

**Adaskaveg, J. E., and R.B. Hine**, 1985. Copper tolerance and zinc sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease* 69: 993- 996.

**Adiobo, A., O. Oumar, M. Perneel, S. Zok, and M. Höfte**, 2007. Variation of Pythium-induced cocoyam root rot severity in response to soil type. *Soil Biology & Biochemistry* 39: 2915-2925.

**Alain Liogi, H., and L. F. Martorell**, 1982. *Flora of Puerto Rico and Adjacent Islands: A Systematic Synopsis*. Ed. Universidad de Puerto Rico, San Juan, Puerto Rico, p. 225.

- Artavia, S., L. Uribe, F. aborio, L. F. Arauz, L. Castro,** 2010. Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la supresión de *Pythium myriotylum* en plantas de Tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). Agronomía Costarricense 34(1): 17-29.
- Balzarini, M.G., L. González, M. Tablada, F. Casanoves, J.A. Di Rienzo y C.W. Robledo,** 2008. Infostat. Manual del Usuario, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina.
- Beale, A.,** 1992. Técnicas de Producción de Yautía (*Xanthosomas* spp.). Instituto Superior de Agricultura, Tenares, Salcedo, República Dominicana, pp. 14-16.
- Bejarano Mendoza, C. A.,** 1996. Microflora asociada a las raíces, rizoplano y rizosfera de variedades de yautía (*Xanthosoma* spp.) afectadas por la enfermedad del mal seco: identificación, función y control. Tesis de maestría, Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, 148 pp.
- Bejarano-Mendoza, C. A., M. Zapata, A. Bosques, E. Rivera-Amador y L.J. Liu.,** 1998. *Sclerotium rolfsii* como componente del complejo patológico causante del mal seco de la yautía (*Xanthosoma sagittifolium*) en Puerto Rico. J. Agric. Univ. PR 82 (1-2): 85-95.
- Bosques, A.,** 1990. Effect of continuous planting of tanager (*Xanthosomas* spp.) at the same side for two successive years. Caribbean Food Crop Society 434-440.
- Bosques, A.,** 2014. Revisión Conjunto Tecnológico para la producción de Raíces y Tubérculos. (Documento no publicado). Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, 12 pp.
- Bosques, A.,** 2017. Comunicado sobre el origen de la yautía selección Nazerno.
- Boudjeko, T., C. Andème-Onzighi, M. Vicré, N. Omokolo, & A. Driouich,** 2006. Loss of pectin is an early event during infection of cocoyam roots by *Pythium myriotylum*. Planta, 223, 271–282.
- Brown, V. M., and H. Asemota.,** 2009. *X. Campestris* pv. *dieffenbachiae*, the Causative Agent of Common Leaf Blight Disease in Dasheen (*Colocasia* spp.) and Cocoyam (*Xanthosoma* spp.). Journal of Biotech Research 1:1-12.
- Carcache Torres, J. y D.A. Díaz Mayorga,** 2010. Efecto de enmiendas orgánicas, *Trichoderma*, microorganismos eficientes y metalaxil en el manejo del mal seco (*Phyitium myriotylum* Drechs) en quequisque (*Xanthosomas sagittifolium* (L.) Schott) en suelo infectado en macetas, mayo 2009-octubre 2010. Tesis de bachillerato, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional Agraria, Managua, Nicaragua, 32 pp.
- Chase, A. R., R. E. Stall, N. C. Hodge and J. B. Jones,** 1992. Characterization of *Xanthomonas campestris* Strains from Aroids Using Physiological, Pathological, and Fatty Acid Analyses. Phytopathology 82, 752-759.
- Chen, F., M. Wang, Y. Zheng, J. Luo, X. Yang, & X. Wang,** 2010. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26(4), 675-684.

- Departamento de Agricultura**, 2016. Ingreso Bruto Agrícola de Puerto Rico. Departamento de Agricultura del Estado Libre Asociado de Puerto Rico, 5 pp. PDF.
- Díaz Rivera, M.**, 2004. El cultivo de la yautía, *Xanthosoma* spp., en Puerto Rico. Servicio de Extensión Agrícola, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico, 5 pp.
- DuPont**, 2012. Kocide 3000®. Wilmington, DE: DuPont Canada Company Agricultural Products, 17 pp. PDF.
- Estación Experimental Agrícola (EEA)**, 1997. Conjunto tecnológico para la producción de raíces y Tubérculos. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez, Mayagüez, Puerto Rico, 35 pp.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO)**, December 14, 2016. FAOSTAT. Obtained from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- Organización de la Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Secretaria de Estado de Agricultura (SEA)**, 1985. Curso de Adiestramiento en el cultivo de yautía. Secretaria de Estado de Agricultura, Santiago de los Caballeros, República Dominicana, 97 pp. PDF.
- Flores Moreno, R.M.F.**, 2010. Estudio poblacional de oomicetos aislados de suelos hortícolas en Tepetitla Tlaxcala. Tesis de maestría, Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala, México, 93pp.
- Futureco**, December 1, 2013. Citrogrower. Futureco Bioscience. Obtained from <http://futurecobioscience.com/en/products/biostimulants/citogrower/>
- García-Gutiérrez, L., D. Romero, H. Zeriuoh, F.M. Cazorla, J.A. Torés, A. De Vicente, & A. Pérez-García**, 2012. Isolation and selection of plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic resistance in melon. *Plant and Soil*, 358(1-2), 201-212.
- Hardin, Ben**, 1992. Less stressed spuds are best. Obtained from <http://www.thefreelibrary.com/Less+stressed+spuds+are+best-a013013627>.
- Huang, X., L. Chen, W. Ran, Q. Shen and X. Yang**, 2011. *Trichoderma harzianum* strain SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Appl Microbiol Biotechnol* 91:741–755.
- Jain, S., A. Vaishnav, A. Kasotia, S. Kumari, R.K. Gaur, & D. K. Choudhary**, 2014. Rhizobacterium-mediated growth promotion and expression of stress enzymes in *Glycine max* L. Merrill against fusarium wilt upon challenge inoculation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(2): 399-406.
- Larsen, J., J. H. Graham, J. Cubero and S. Ravnskov**, 2012. Biocontrol traits of plant growth suppressive arbuscular mycorrhizal fungi against root rot in tomato caused by *Pythium aphanidermatum*. *Eur J Plant Pathol* 133: 361–369.
- Lugo, W. I., E. Acevedo, A. González**, 5 de junio de 1992. Efecto de prácticas de manejo en el cultivo de

- yautía. Encuentro Interdisciplinario de los Investigadores del Mal Seco de la Yautía. Estación Experimental Agrícola Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, p. 7.
- León, J.**, 1987. Yautía, Tiquisque, *Xanthosoma sagittifolium*. En M. J. Snarskis (Ed.), Botánica de cultivos tropicales (pp. 109-111). San José, Costa Rica: Servicio Editorial del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 445 pp., Impreso.
- Mbouobda, H. D., Fotso, P. F. Djogoue, N. D. Omokolo, I. El Hadrami, & T. Boudjeko**, 2010. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic S-methyl ester (BTH) stimulates defense reactions in *Xanthosoma sagittifolium*. *Phytoparasitica* 38(1): 71-79.
- Nyochembeng, L. M., & C. A. Beyl**, 2015. Induction and characterization of pathogenesis-related proteins in roots of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* [L.] Schott) infected with *Pythium myriotylum*. *African Journal of Biotechnology*, 14(3), 212-221.
- Okigbo, R. N.**, 2003. Mycoflora of tuber surface of white yam (*Dioscorea rotundata* Poir) and postharvest control of pathogens with *Bacillus subtilis*. *Mycopathologia* 156: 81–85.
- Oumar, D., B.E. Akumah, and N.D. Tchinda**, 2015. Induction of Resistance in Cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) to *Pythium myriotylum* by Corm Treatments with Benzothiadiazole and its Effect on Vegetative Growth. *American Journal of Experimental Agriculture* 5(2): 164-171.
- Pal, K.K. and B. McSpadden Gardener**, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor, 25 pp. PDF.
- Perdomo, M., J. Peña, C. Guédez, C. Castillo y L. Cásales**, 2007. *Trichoderma harzianum* para el control de la enfermedad “sanchocho” en semilleros de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Academia* 4 (12): 52 - 61.
- Perneel, M., J. Heyrman, A. Adiobo, K. De Maeyer, J.M. Raaijmakers, P. De Vos and M. Höfte**, 2007. Characterization of CMR5c and CMR12a, novel fluorescent *Pseudomonas* strains from the cocoyam rhizosphere with biocontrol activity. *The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology* 103: 1007–1020.
- Plaza Delestre, J. A.**, 1994. La etiología del mal seco de la yautía (*Xanthosoma* sp. (L.) Schott) en Puerto Rico. Tesis de maestría, Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.
- Pohronezny, K., R. B. Volin and W. Dankers**, 1985. Bacterial leaf spot of cocoyam (*Xanthosomas caracu*), incited by *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae*, in Florida. *Plant Disease* 69: 170-173.
- Purseglove, J. W.**, 1992. Tropical Crops: Monocotyledons. Longman Scientific & Technical, England, pp. 70-74.
- Reyes Castro, G., M. Nyman & A.C. Rönnberg-Wästljung**, 2005. Agronomic performance of three cocoyam (*Xanthosoma violaceum* Schott) genotypes grown in Nicaragua. *Euphytica* 142: 265–272.

- Reyes, G., A. C. Rönnberg-Wästljung & M. Nymam**, 2006. Comparison of field performance between Dasheen mosaic virus-free and virus-infected in vitro plants of cocoyam (*Xanthosoma* spp.) in Nicaragua. *Expl Agric.* 42: 301-310.
- Snyder, V. A., A. González-Vélez, A. J. Beale, & M. A. Vázquez**, 2010. Raised beds and aeration tubing for growing taniar (*Xanthosoma* spp.) in a poorly drained upland Ultisol with a perched water table. *J. Agric. Univ. PR* 94 (3-4): 225–235.
- Stark, R. E., W. Sohn, R. A. Pacchiano, Jr., M. Al-Bashir, and J. R. Carbow**, 1994. Following Suberization in Potato Wound Periderm by Histochemical and Solid-State I3C Nuclear Magnetic Resonance Methods. *Plant Physiol.* 104: 527-533.
- Stenersen, J.**, 2004a. Fungicides with copper. In C. Russel (Ed.), *Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology* (p. 90). Florida, USA: CRC Press. PDF.
- Stenersen, J.**, 2004b. Toxicants that generate very reactive molecules that destroy cellular components. In C. Russel (Ed.), *Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology* (p. 50). Florida, USA: CRC Press. PDF.
- Tambong, J. T. & M. Höfte**, 2001. Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA 1. *European Journal of Plant Pathology* 107:511-521.
- Tonelli, M. L., & A. Fabra**, 2014. The biocontrol agent *Bacillus* sp. CHEP5 primes the defense response against *Cercospora sojina*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(9): 2503-9.
- Wehburg, C., S.A. Alfieri, K.R. Langdon, and J.W. Kimbroug**, 1975. Index of Plant Diseases in Florida. Florida Dept. of Agric. And Consumer Services Division of Plant Industry: 45-51.
- Williams, M. E.**, 2010. Introduction to Phytohormones. *The Plant Cell* 22(3): 10.
- Zapata, M. y A. Bosques**, 2013. Evaluación de productos biológicos y químicos para el control de la mancha bacteriana y el mal seco de la yautía selección Nazareno. (Documento no publicado). Universidad de Puerto Rico Recinto Universitario de Mayagüez, 2pp.
- Zapata, M. y A. Bosques**, 2015. Efecto del control de enfermedades en los rendimientos de la yautía Sel. Nazareno cultivada en dos suelos distintos. CONOCEC. UPR-RUM.
- Zapata, M. y A. Bosques**, 2015. Evaluación del control de la bacteriosis y el mal seco y rendimiento en yautía, *Xanthosoma* spp sembrada fuera de época. SOPCA. Resumen CPC-05 pág. 69.



## **2 Fase 2: Identificación, frecuencia y pruebas de patogenicidad de hongos asociados a la yautía selección Nazareno bajo condiciones de invernadero y laboratorio**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

En esta fase de la investigación se identificaron, se midieron las frecuencias y se realizaron pruebas de patogenicidad con los hongos asociados a la yautía selección Nazareno en suelo de dos manejos diferentes, tal como se describió en la Fase 1. Se aislaron sobre 30 cepas de hongos diferentes donde se encontraron *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Curvularia lunata*, *F. solani* y *S. rolfsii*. El objetivo de las pruebas de patogenicidad fue medir el daño provocado por los hongos en el tejido de yautía. Se sembraron cilindros de cormo con las yemas axilares, llamados “mini-sets” (Plaza-Delestre, 1994) bajo condiciones de invernadero. Los *mini-sets* se inocularon dos veces con hongos previamente creciendo en PDA. Dicho método no fue efectivo en mostrar la virulencia de los hongos. Es por eso, que se utilizó otro método con discos de cormos que resultó más efectivo para medir la virulencia. Los hongos más virulentos fueron: *S. rolfsii*, *F. solani* cepa 1 (*Fs* 1), *Fs* 2 y *Aspergillus niger*.

### **2.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.2.1 Lugar de los experimentos**

Los experimentos fueron realizados en las facilidades del Departamento de Ciencias Agroambientales localizadas en la finca Alzamora, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez 00681.

#### **2.2.2 Aislamiento de hongos**

En las pruebas de patogenicidad se utilizaron los hongos aislados de raíces y de muestras de suelo descritos en el experimento anterior. Los suelos de manejos distintos fueron: suelo de uso continuo (**SC**) y

suelo en descanso (**SD**). Para este experimento se trató de incluir todos los hongos y pseudohongos que, según la literatura, son patógenos de la yautía en cormos y raíces.

### **2.2.2.1 Aislamiento de hongos en muestras de suelo**

Se tomaron muestras de suelo de la rizósfera de las plantas sembradas en invernadero al momento de cosechar. Se realizaron diluciones en serie para cada muestra de suelo desde la dilución  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ . Para cultivar hongos, se realizaron 3 repeticiones por dilución donde en cada placa se sembraron 0.1 ml de la dilución en platos con agar de dextrosa y papa (**PDA**, Dickinson and Company®, EEUU) enmendado con ácido láctico (**ac**) al 25% y se distribuyeron bien en la superficie. Los cultivos fueron incubados a  $32 \pm 2$  C por 5 a 7 días. Se tomaron colonias de hongos morfológicamente diferentes de cada tratamiento y bloque de cada suelo. Éstos se purificaron, se tomaron datos del color y textura del micelio, tipo de esporas y estructuras de reproducción. También se identificó el medio más apropiado para hacer fructificar o esporular los especímenes y se midieron las estructuras importantes. Se identificaron algunas cepas a nivel de especie o género.

### **2.2.2.2 Aislamiento de hongos en raíces**

Se seleccionaron raíces con lesiones y se enjuagaron con agua corriente para sacar el exceso de tierra. Se cortaron de 1 cm de largo y se desinfectaron en una disolución de hipoclorito de sodio al 1% por 30 s, seguido por tres enjuagues con agua destilada por 1 min cada uno (Wokocha y Aduo, 2011). Se colocaron 3 pedazos por placa petri conteniendo PDA ac. Se hicieron tres repeticiones por cada tratamiento y bloque de cada tipo de suelo. Los cultivos se pusieron en incubadora a una temperatura de  $32 \pm 2$  C de 5 a 7 días. Se tomaron colonias de hongos morfológicamente diferentes para cada tratamiento en cada suelo, se purificaron y se tomaron datos del color y textura del micelio, el tipo de esporas y estructuras de

reproducción. Se identificó el medio apropiado para hacer fructificar o esporular los especímenes y se midieron las estructuras importantes. Se identificaron algunas cepas a nivel de especie o género.

### **2.2.3 Medios y métodos específicos para crecimiento de hongos**

Se utilizó PDA, PDA diluido a  $10^{-1}$ , PDA  $10^{-1}$  con trozos de 1 cm<sup>2</sup> de zanahoria, PDA  $10^{-1}$  con hojas de clavel, agar de maíz (CMA) y agar con jugo V8 al 20%. Se realizaron cámaras húmedas según Maldonado (2015) y se utilizó el manejo de fotoperiodo en aquellos casos donde no se obtuvieron estructuras en crecimiento bajo oscuridad.

### **2.2.4 Prueba de patogenicidad in vivo con *mini-sets***

Se realizaron bioensayos in vivo en un diseño completamente al azar con 3 repeticiones por hongo. Se utilizaron las 30 cepas de hongos aislados de las muestras de suelo y raíces (**Tabla 2.1**) más un control negativo como tratamientos (**Ts**). *Sclerotium rolfsii*, *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani* de la Tabla 2.2 fueron hongos que no se encontraron en las muestras de raíces y suelo. *S. rolfsii* fue hallado en cormos infectados de yautía provenientes de la Estación Experimento Agrícola (**EEA**) de Isabela y *Pythium* spp. y *R. solani* fueron prestados por Dra. M. Zapata.

**Tabla 2.1.** Cepas de hongos aislados de las muestras de raíces y suelo de la Fase 1 y encontrados por otros medios

| <b>Espécimen</b>              | <b>Abrv<sup>b</sup></b> | <b>Espécimen</b>                       | <b>Abrv</b> |
|-------------------------------|-------------------------|--|-------------|
| <i>Alternaria alternata</i>   | Alt                     | <i>Penicillium</i> spp. 1              | Pen 1       |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | Afla                    | <i>Penicillium</i> spp. 2              | Pen 2       |
| <i>Aspergillus niger</i>      | An                      | <i>Penicillium</i> spp. 3              | Pen 3       |
| <i>Aspergillus</i> spp. 1     | Asp 1                   | <i>Penicillium</i> spp. 4              | Pen 4       |
| <i>Aspergillus terreus</i>    | Ater                    | <i>Penicillium</i> spp. 5              | Pen 5       |
| <i>Cladobotryum</i> spp.      | Clad                    | <i>Pythium</i> spp. <sup>a</sup>       | Py          |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | Cbra                    | <i>Rhizoctonia solani</i> <sup>a</sup> | Rs          |
| <i>Curvularia lunata</i>      | Clun                    | <i>Sclerotium rolfsii</i> <sup>a</sup> | Sr          |
| Desconocido                   | Des                     | <i>Scolecobasidium</i> spp.            | Scol        |
| <i>Diplodia</i> spp.          | Dip                     | <i>Trichoderma harzianum</i>           | Thar        |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | Fox                     | <i>Trichoderma</i> spp.                | Tri         |
| <i>Fusarium solani</i> 1      | Fs1                     | <i>Verticillium</i> spp.               | Ver         |
| <i>Fusarium solani</i> 2      | Fs 2                    | Morfotipo* 1                           | M 1         |
| <i>Fusarium</i> spp.          | Fus                     | Morfotipo* 2                           | M 2         |
| <i>Geotrichum</i> spp.        | Geo                     | Morfotipo* 3                           | M 3         |

\* Morfotipo- espécimen que ha sido descrito detalladamente pero que no se ha podido identificar.

<sup>a</sup> hongos no aislados en muestras de raíces y suelo de yautía Nazareno

<sup>b</sup> Abreviaciones de las cepas

Se obtuvieron cormos de yautia Nazareno de la EEA de Isabela, se eliminaron las raíces y se lavaron dos veces para eliminar todo exceso de tierra y de inóculo. Se sacaron secciones de forma cilíndrica de aproximadamente 5.08 cm de diámetro y 3.81 cm de alto que contenían la yema axilar en el medio, parte del peridermo y la pulpa. Se utilizó un método parecido al de Plaza Delestre (1994) y se les nombró también *mini-sets* a estos cilindros. Los *mini-sets* se lavaron con hipoclorito de sodio al 10% durante 5 min y se colocaron con la pulpa hacia arriba expuestos al sol de 1-2 hrs para cicatrizar las heridas por los cortes. Se colocaron los *mini-sets* en cámaras húmedas con papel periódico humedecido a una temperatura aproximada de 26 C por 2-3 días. El propósito de las cámaras húmedas es estimular la brotación y seleccionar los *mini-sets* con yemas más saludables. Se sembraron con la parte del peridermo mirando hacia arriba a 5.08 cm de profundidad en tiestos de aproximadamente 12.70 cm de diámetro con 11.43 cm de alto en musgo (Pro-Moss®, Canadá) mezclado con perlita a razón 1:1 y esterilizado previamente. El riego fue de 50 ml por tiesto de forma manual en días impares (Ej: lunes, miércoles y viernes). La siembra duró desde el 22 de enero de 2016 hasta el 24 de febrero de 2016.

Se inocularon las plantas dos veces: 1) el día de la siembra y 2) a los 10 días de siembra. En la primera inoculación se tomaron cultivos de hongos de 7 días sembrados en PDA y se colocaron cuatro pedazos de micelio con agar de  $1\text{cm}^2$  cada uno encima del peridermo, luego se aterró el *mini-set* con la mezcla de musgo y perlita. Se repitió el proceso con todos los tratamientos. En la segunda inoculación, después de 10 días de sembradas, se realizaron suspensiones de hongos. Se inundó con agua destilada estéril el cultivo de 3-5 días creciendo en PDA y se raspó para sacar todo el micelio sin desprender el agar (Tambong, 1999). Se depositó el micelio en 300 ml de agua destilada estéril y se licuó por 30s (Bejarano Mendoza, 1996). El día de la inoculación, no se regaron las plantas y se aplicaron 50 ml de la suspensión de hongos por tiesto temprano en la mañana a una temperatura promedio de  $25\text{ }^\circ\text{C}$ . El riego procedió como de costumbre los siguientes días. Cuando la siembra cumplió 30 días, se cosecharon los *mini-sets*, se lavaron con agua corriente, se tomaron datos de peso de raíces y cantidad de raíces. El peso de raíces se obtuvo arrancando la mayor cantidad de raíces de las plantas. En la cantidad de raíces se contaron todas las raíces pequeñas y largas. La toma de datos se hizo por planta para evitar el aumento del error experimental. Se realizó un análisis de varianza con una prueba Tukey ( $\alpha = 0.05$ ) con el programa estadístico InfoStat (Di Riezo et al, 2014) para comparar las medias según el hongo con que se inoculó.

## 2.2.5 Pruebas de patogenicidad en discos de cormos

Se realizaron pruebas de patogenicidad con cormos según Acevedo y colaboradores (2015) enmendado en un diseño completamente aleatorizado. Se utilizaron todos los hongos descritos en la Tabla 2.2 (30) más un control negativo con 3 repeticiones de cada uno. El método consiste en limpiar los cormos, sacar raíces, exceso de tierra y hojas, enjuagar dos veces con agua corriente, pasar por hipoclorito de sodio al 20% durante 10 min, y luego tres enjuagues con agua estéril durante 10 min cada uno. Se dejaron secar y luego se cortaron en discos de aproximadamente 2.5 cm. En el centro del disco (pulpa) se puso un cilindro de 5 mm de agar con micelio de un cultivo de 5 días de viejo y luego se tapó con otro disco creando así una especie de “emparedado” en cámara húmeda. La cámara húmeda se realizó poniendo un papel tipo “kimwipe” en la placa del fondo, se humedeció con agua destilada estéril, se colocaron dos laminillas encima en forma de cruz y luego se puso el ‘sándwich’ de corno encima. Se tapó el “sándwich” con otra placa y se selló con papel de envoltura plástico para comida. Se puso a temperatura 25-27 C bajo oscuridad durante 7 días. Luego se sacaron y se midió el ancho y el largo de la lesión provocada por el hongo en el disco del fondo (el que se inoculó directamente), se sumo el ancho y el largo y se sacó el promedio. Se realizó un ANOVA con prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para determinar la virulencia de los hongos.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Descripción morfológica de hongos

Se encontraron 27 cepas de hongos de un total de 252 aislados de las muestras de raíces y suelo. Se identificaron hongos como *Curvularia lunata*, *Dactylella* spp., *Fusarium solani* y *Penicillium* spp. Se encontraron cuatro cepas de *Aspergillus* spp., dos de *Curvularia* spp. y cinco de *Penicillium* spp. Además, se estudiaron las cepas de *S. rolfsii*, *R. solani* y *Pythium* spp. A continuación, se ofrece una descripción

morfológica de todas las cepas aisladas que incluye el nombre de especie o género, el cultivo ejemplar (junto con el tipo de suelo (SC o SD), tipo de muestra (raíces o suelo) y tratamiento o T), el grupo, las características de la colonia, las características y tamaño de las estructuras microscópicas y los medios de cultivo utilizados.

### **1. *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl**

Cultivo ejemplar: 92 (SD, raíces, T1)

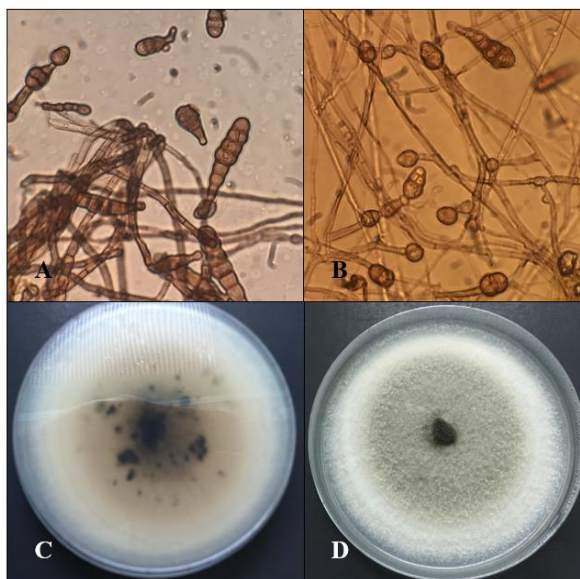
Grupo: G-20

Colonia: Color blanco y gris, textura algodonosa, margen entero. En el dorso tiene manchas negras en la zona central y un color un poco rosado.

Estructuras microscópicas: Conidióforos simples o ramificados con cadenas de conidias catenuladas de hasta nueve. Conidias de desarrollo acropetal color marrón cilíndrico o en forma de pera, frecuentemente con picos cilíndricos, muriforme, compuesto de 3-4 paredes transversales y 1-2 paredes longitudinales.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Conidias de 26.34- 56.44 $\mu$ m x 9.25- 13.12 $\mu$ m.



**Figura 2.1.** *A. alternata*. A-B) Conidias muriformes y conidióforos (40X); C) haz de la colonia en PDA; D) Dorso de la colonia.

## 2. *Aspergillus flavus* Link

Cultivo ejemplar: 147 (SC, suelo, T7)

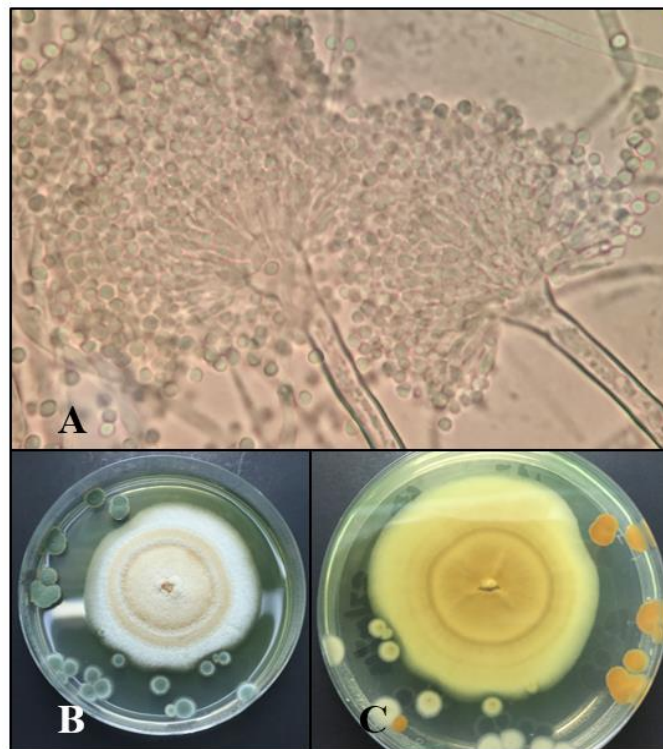
Grupo: G-13

Colonia: Color marrón claro y blanco, textura algodonosa, margen ondulado. Tiene anillos concéntricos con relieve y en el dorso estrías en la zona central.

Estructuras microscópicas: Conidióforos con vesícula globosa; fiálidos biseriados con conidias catenuladas color marrón.

Medio utilizado: PDA

Medidas: Cabeza de conidióforos (cubre toda el área donde están la masa de conidias) de 18.77-44.38  $\mu\text{m}$  x 19.68-27.56  $\mu\text{m}$ ; conidias de 2.09-2.31  $\mu\text{m}$  (diámetro).



**Figura 2.2.** *A. flavus*. A) conidias con fiálidos biseriados; B) haz de la colonia en PDA; C) Dorso de la colonia



### 3. *Aspergillus niger* Tiegh.

Cultivo ejemplar: 23 (SC, raíces, T1)

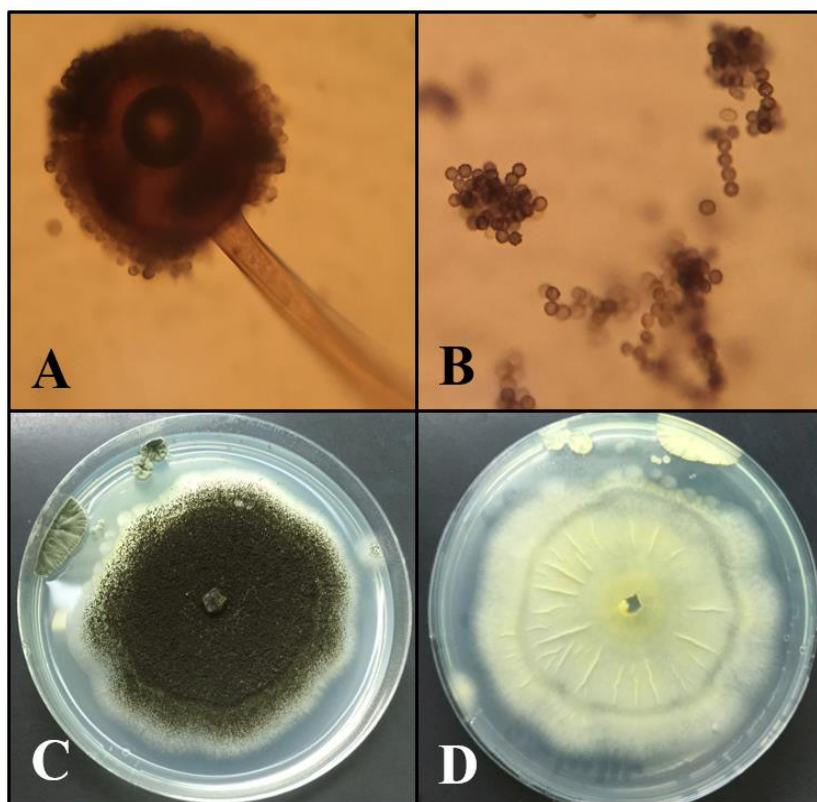
Grupo: G- J

Colonia: Color negro, textura polvorienta, margen ondulado. Se forman estrías en el haz y el dorso.

Estructuras microscópicas: Conidióforos con vesículas globosas repletas de fiálidos biseriados. Los fiálidos surgen de una métula marrón y ayudan a producir las conidias que miden de 3 a 5  $\mu\text{m}$  redondas y color marrón (Choi, 2010). Las conidias son elípticas, color marrón oscuro y de textura rugosa.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Cabeza de conidióforo de 51.87- 59.93  $\mu\text{m}$  x 42.45- 74.20  $\mu\text{m}$ ; conidias de 3.00-4.78  $\mu\text{m}$  x 3.04- 4.51  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.3.** *A. niger*. A) conidióforo con masa de conidias (40X); B) conidias aconglomeradas; C) haz de la colonia en PDA; D) dorso de la colonia.

#### 4. *Aspergillus* spp. 1 Link.

Cultivo ejemplar: 42 (SC, raíces, T7)

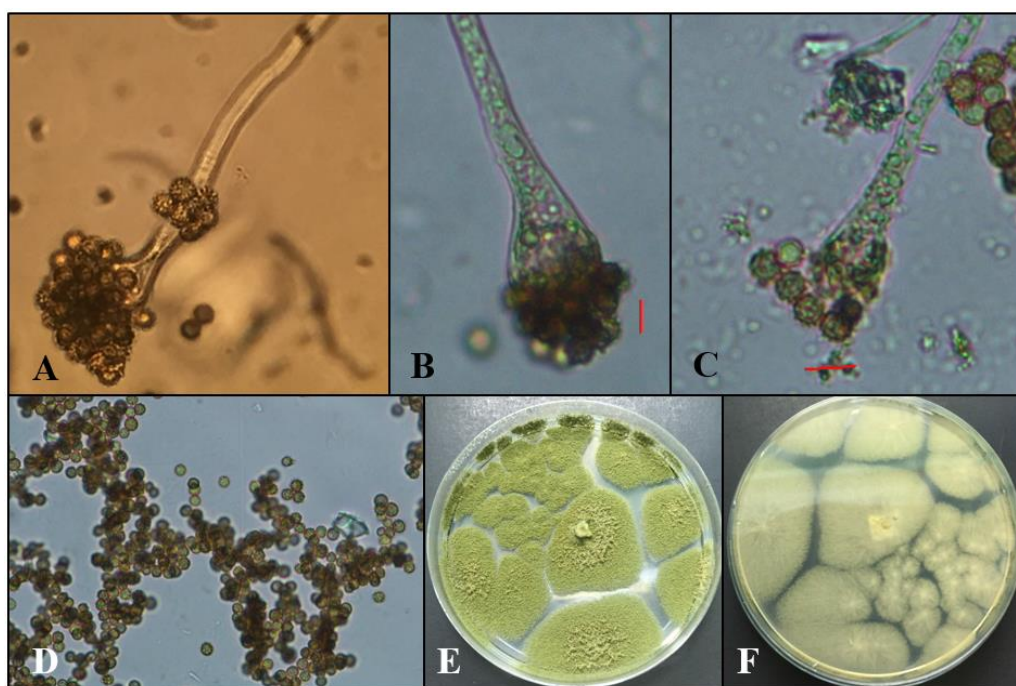
Grupo: G-17

Colonia: Color verde oscuro, textura en forma de alfombra, margen irregular. De olor fuerte; color crema en el dorso.

Estructuras microscópicas: Conidióforos hialinos con vesícula inflada, fiálidos uniseriados (vesícula sosteniendo fiálidos) sosteniendo conidias catenuladas. Conidias redondas, poco equinuladas, color marrón y rugosas.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Fiálidos de 5.67 - 9.36  $\mu\text{m}$  x 3.40 - 5.22  $\mu\text{m}$ ; vesículas de 18.31 - 21.77  $\mu\text{m}$  x 10.02 - 28.37  $\mu\text{m}$ ; conidias de 4.40 - 5.47  $\mu\text{m}$  x 3.48 - 5.28  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.4.** *Aspergillus* spp. 1. A) Conidióforo con conidias marrón rugosas (40X); B) vesícula inflada con conidias (40X) (línea roja mide 5.67  $\mu\text{m}$ ); C) Vesícula mostrando fiálidos y conidias (40X) (línea roja mide 8.65  $\mu\text{m}$ ); haz de la colonia en PDA; F) Dorso de la colonia.

## 5. *Aspergillus terreus* Thom

Cultivo ejemplar: 215 (SC, suelo, T6)

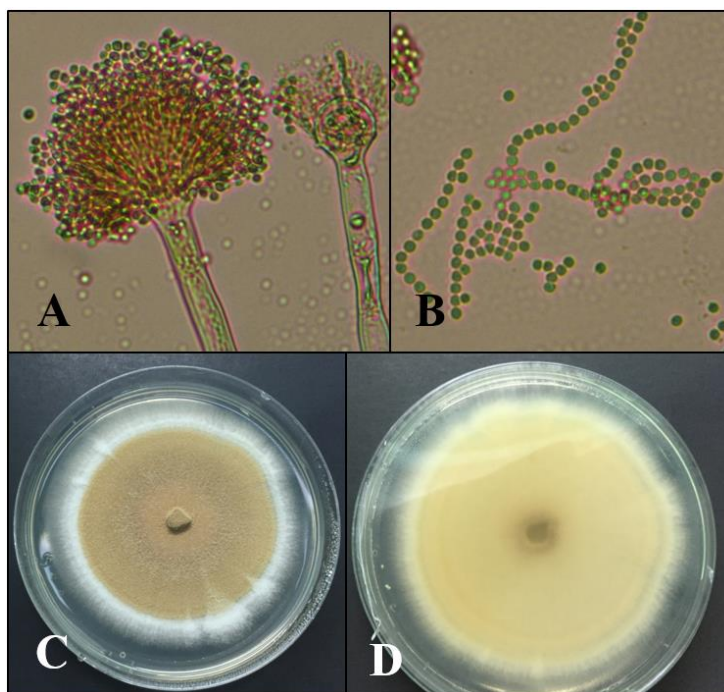
Grupo: G- 24

Colonia: Color marrón claro, textura polvorienta, margen ondulado. A veces forman estrías grandes en el dorso.

Estructuras microscópicas: Conidióforos con fiálidos biseriados, conidias elípticas y redondas, color marrón. Pie basal septado.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Cabeza de conidióforos de 22.58-43.47 $\mu$ m x 38.21- 61.41  $\mu$ m; Vesícula de 3.68- 21.55 $\mu$ m x 12.58- 14.81 $\mu$ m; conidias 1.89-2.68 $\mu$ m.



**Figura 2.5.** *A. terreus*. A) Conidioforos biseriados con masa de conidias color marrón (40X); B) Conidias catenuladas (40X); C) haz de la colonia en PDA; D) Dorso de la colonia.

## 6. Cladobotryum spp. Corda.

Cultivo ejemplar: 269 (SD, suelo, T1)

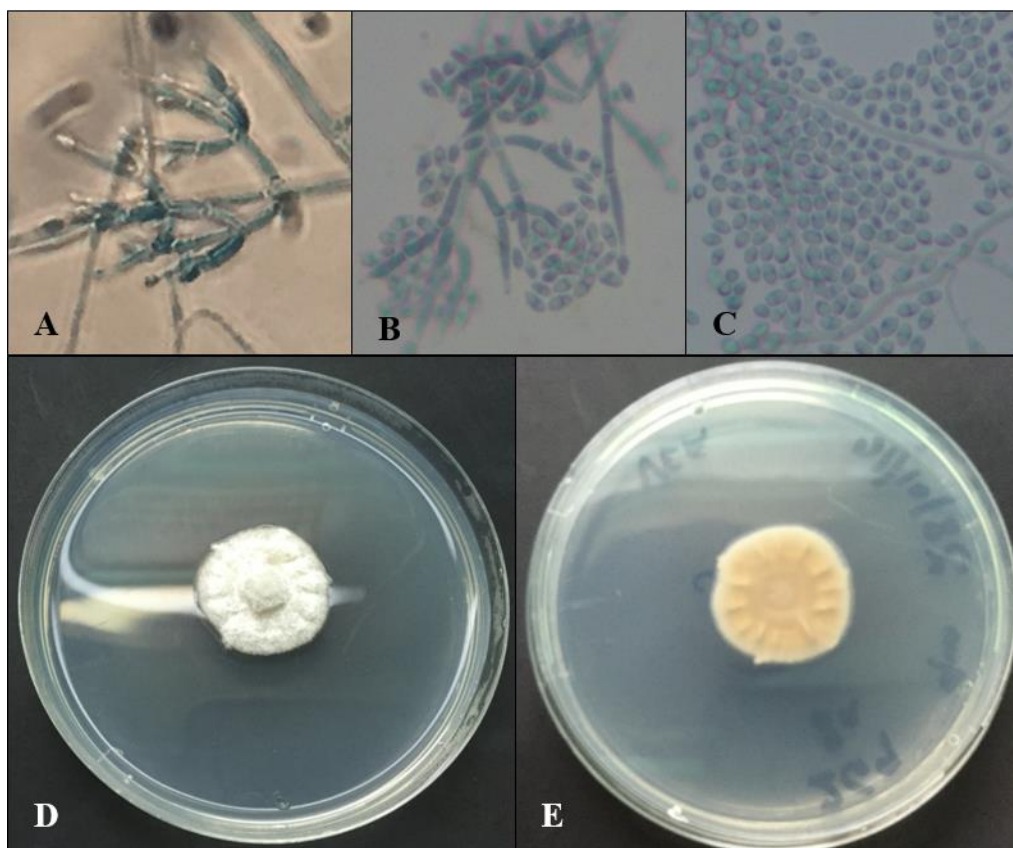
Grupo: 8a

Colonia: Color blanco, textura aterciopelada (tanto en el haz como el dorso), margen ondulado.

Estructuras microscópicas: Conidióforos erectos, hialinos, frecuentemente saliendo de micelio aéreo con ramificaciones irregulares o verticilados. Los fiálidos terminan en el ápice. Las conidias (fialosporas) son hialinas, generalmente de dos células ovoides, agrupadas en cadenas irregulares o enredadas.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: fiálidos de 12.30 – 14.23  $\mu\text{m}$  x 1.27 – 2.17  $\mu\text{m}$ ; conidias de 4.34 – 4.64  $\mu\text{m}$  x 1.61 – 2.11  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.6.** *Cladobotryum* spp. A-B) Conidióforos verticilados teñidos con AA (40X); C) Conidias ovoides de dos células (40X); D) haz de colonia en PDA; E) Dorso de colonia.



## 7. *Curvularia brachyspora* (Boedjin)

Cultivo ejemplar: 86 (SD, raíces, T7)

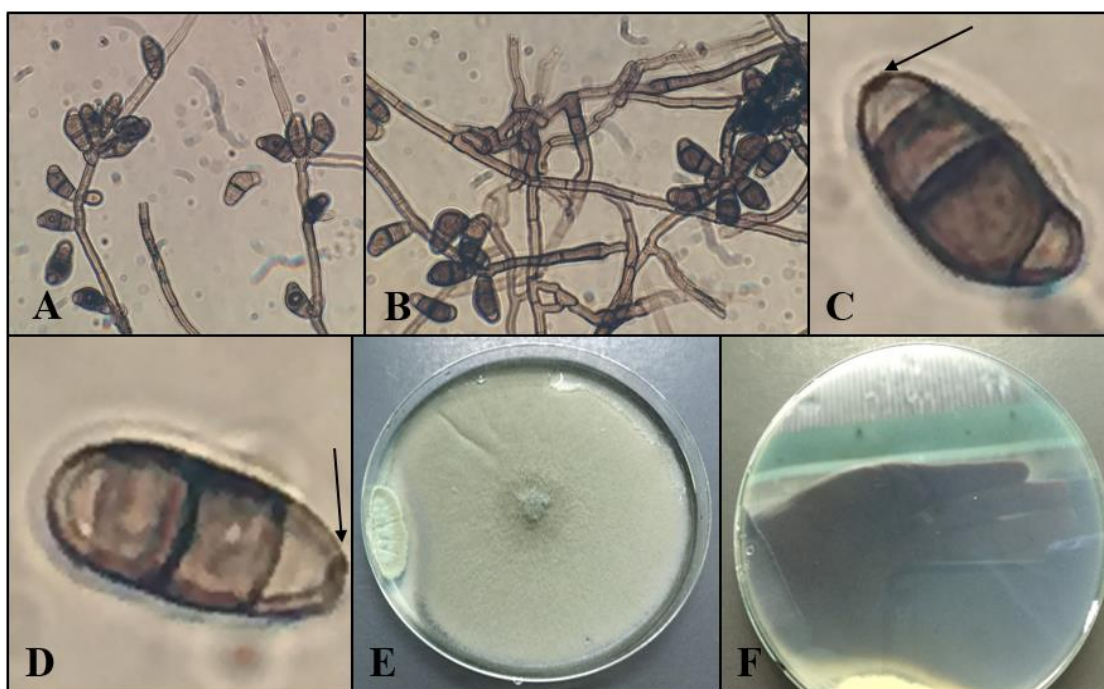
Grupo: G-19

Colonia: Color gris y negro, textura algodonosa, margen entero. En el haz hay un anillo concéntrico en medio.

Estructuras microscópicas: Conidióforos simples color marrón pálido que sostienen las conidias de forma lateral y apical. Las conidias son elípticas, color marrón pálido, mayormente de cuatro células con las células centrales más anchas y más pigmentadas. Las conidias no tienen hilo basal.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: conidias de 19.28 – 23.85  $\mu\text{m}$  x 8.90 – 11.75  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.7.** *C. brachyspora*. A-B) Conidióforos laterales y apicales (40X); C-D) Conidias ovoides de cuatro células y poro conspicuo (indica la flecha) (100X); E) haz de la colonia en PDA; F) Dorsal de la colonia.

## 8. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedjin

Cultivo ejemplar: 98 (SD, raíces, T4)

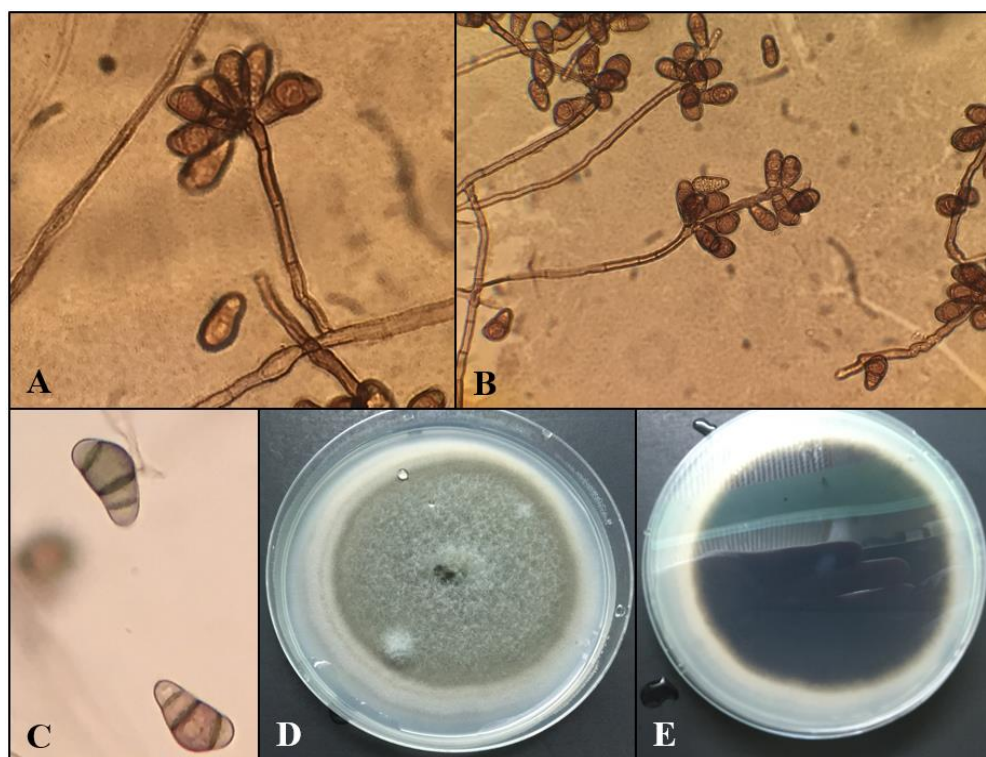
Grupo: G-21

Colonia: Color gris, gris claro y negro, textura aterciopelada, margen ondulado. Cuerpos fructíferos en forma redonda o ramificados.

Estructuras microscópicas: Conidióforos erectos, marrones, simples o ramificados. Sostienen conidias en zona apical o lateral. Se forman poros conspicuos después que se suelta la conidia. Las conidias son porosas, subelípticas, mayormente de cuatro células; son marrón oscuro en las células centrales y la penúltima es la más grande.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: conidias de 15.88 - 24.76  $\mu\text{m}$  x 9.71 - 11.63  $\mu\text{m}$ ; hifas de 15.39 - 22.76  $\mu\text{m}$  x 4.14 - 5.94  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.8.** *C. lunata*. A-B) Conidiófos con conidias en el ápice (40X); C) Conidias solitarias de cuatro células (40X); D) haz de colonia en PDA; E) Dorso de colonia.

## 9. Desconocido

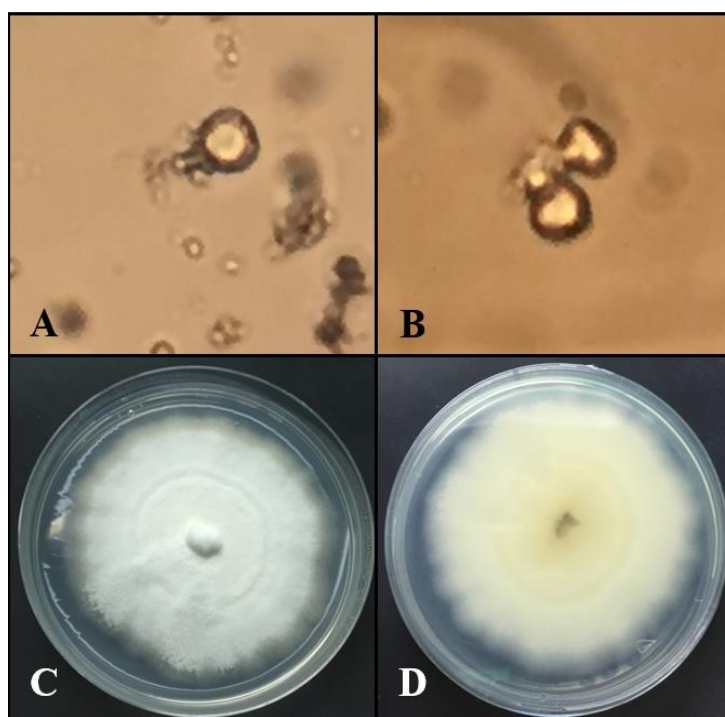
Cultivo ejemplar: 222 (SC, suelo, T7)

Grupo: 6a

Colonia: Color blanco, textura lisa, margen ondulado. Tiene un anillo concéntrico en medio del haz y el dorso.

Estructuras microscópicas: Se observaron unas estructuras como burbujas (Fig. 2.4: A-B), pero no hubo presencia de estructuras de reproducción.

Medios de cultivo utilizados: PDA, CMA, PDA diluido a la  $10^{-1}$  con hojas de clavel, PDA  $10^{-1}$  con zanahoria y V8. Los cultivos se dejaron crecer en oscuridad y bajo fotoperiodo (12 h luz y 12 h oscuridad), pero no esporularon.



**Figura 2.9.** Desconocido. A-B) estructuras con apariencia de burbujas (40X); C) haz de la colonia en PDA; D) dorso de la colonia.

## 10. Diplodia spp. Fr.

Cultivo ejemplar: 32 (SC, raíces, T4)

Grupo: G- L

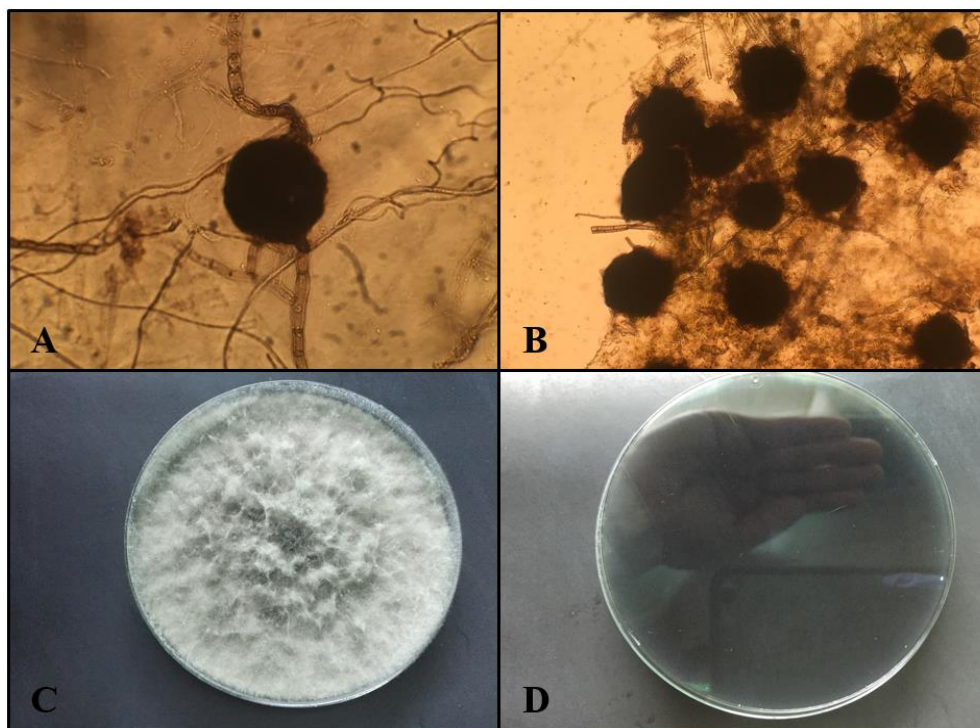
Colonia: Color gris, textura algodonosa, margen entero.

Estructuras microscópicas: Picnidios con conidias separadas o agregadas cuando se encuentra en un huésped. Los mismos son de color marrón oscuro a negro con ostiolos (apertura donde salen las esporas).

Tienen pared celular gruesa compuesta por “textura angularis”. Los fiálidos son hialinos y cilíndricos y producen una sola conidia en el ápice. Las conidias son ovoides, lisas, sin tabiques, más anchos en el medio, con ápice obtuso, base truncada o redonda. Al principio son hialinos y después se tornan marrón oscuro (Phillips et al, 2007).

Medios de cultivo utilizados: PDA y PDA diluido a la  $10^{-1}$  con fotoperiodo.

Medidas: picnidios de  $18.25 - 27.35 \mu\text{m} \times 19.18 - 26.01 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.10.** *Diplodia* spp.: A-B) Picnidios esféricos de color marrón redondo (10X); C) haz de la colonia en PDA; D) Dorso de la colonia.



### **11. *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder & Hansen**

Cultivo ejemplar: 182 (SC, suelo, T3)

Grupo: G-16

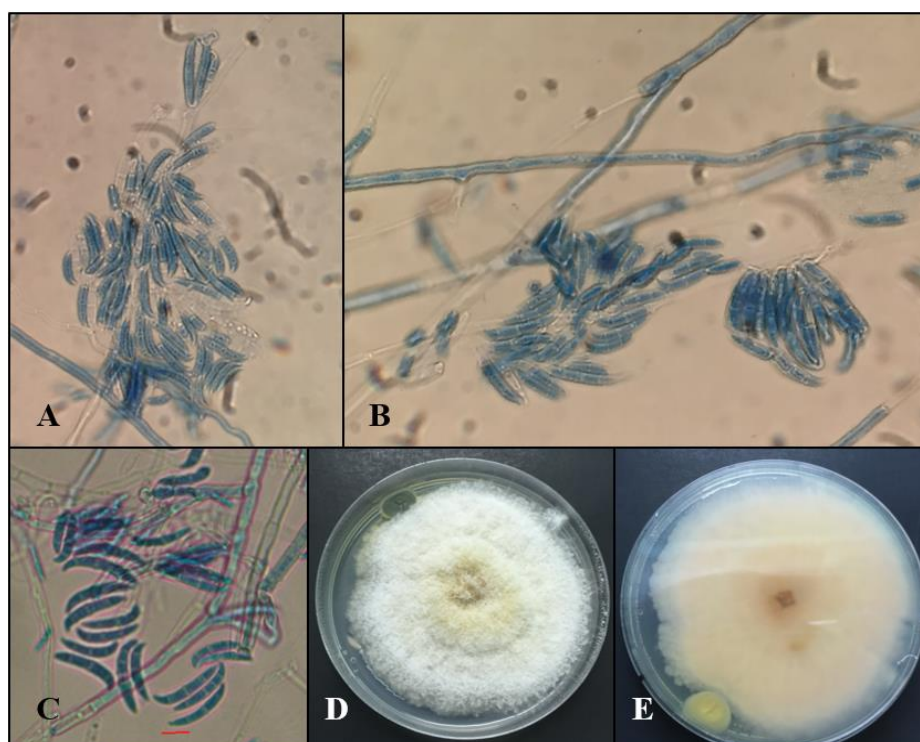
Colonia: Color marrón y gris en la zona central, blanco alrededor; textura algodonosa, margen ondulado.

La zona central es más elevada y tiene algunas estrías en el dorso.

Estructuras microscópicas: Conidióforos hialinos cortos y simples con conidias en el ápice. Conidias dimórficas: macroconidias en forma de bote con puntas curvadas en ambos extremos de 2-6 células; microconidias elípticas de una célula. Se formaron sinematas (masa de conidióforos fusionados). No se observaron clamidosporas.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Macroconidias de 16.15-20.58  $\mu\text{m}$  x 2.39-3.4; microconidias de 3.33-8.97  $\mu\text{m}$  x 1.61-2.4  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.11.** *F. oxysporum*. A-B) Sinemata hecho de muchas macroconidias fusionadas (40X); C) macroconidias teñidas (40X); haz de la colonia en PDA; E) Dorso de la colonia.

## 12. *Fusarium solani* 1 (Fs 1) (Mart.)

Cultivo ejemplar: 171 (SC, suelo, T1)

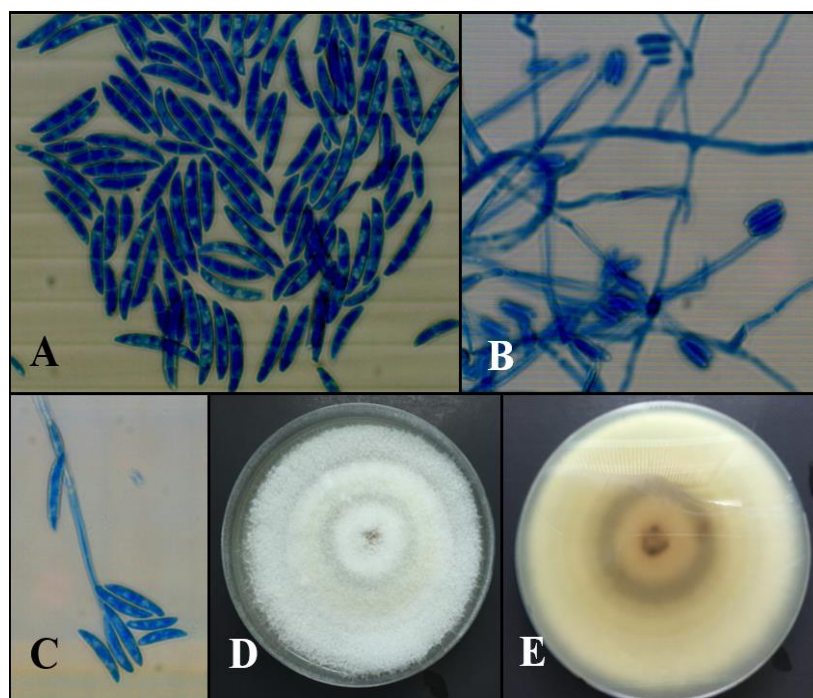
Grupo: G-4

Colonia: Color blanco y gris, textura algodonosa, margen entero. Anillos concéntricos claros de diferentes alturas.

Estructuras microscópicas: Conidióforos sencillos sosteniendo una masa de conidias. Dos tipos de conidias: microconidias (elípticas de una célula) y macroconidias (en forma de bote con una esquina más puntiaguda que otra; de 2 a 4 células).

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: macroconidias de cuatro células de 25.65 – 31.93  $\mu\text{m}$  x 2.75 – 4.63  $\mu\text{m}$ ; macroconidias de dos células de 17.08 – 26.35  $\mu\text{m}$  x 2.46 – 3.59  $\mu\text{m}$ ; microconidias de 4.15 – 10.20  $\mu\text{m}$  x 1.52 – 2.40  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.12.** *F. solani* cepa 1: A) Macroconidias de cuatro células tenidas con azul de algodón (AA) (100 X); B) conidióforos con macroconidias (100X); C) conidióforos con microconidias (100X); D) haz de la colonia en PDA; E) dorso de la colonia.

### **13. *Fusarium solani* cepa 2 (Fs 2) (Mart.)**

Cultivo ejemplar: 35 (SC, raíces, T6)

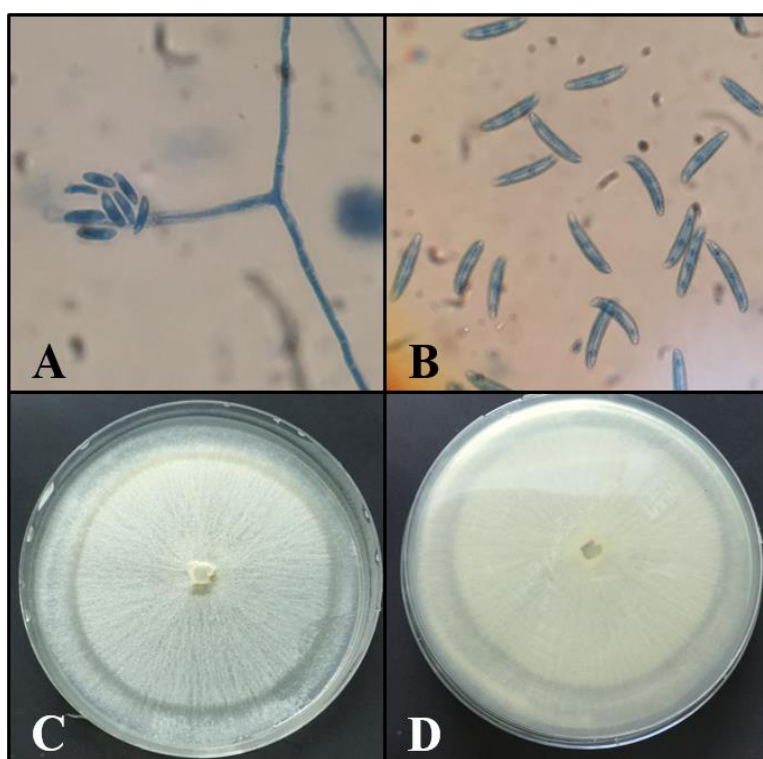
Grupo: 5a

Colonia: Color blanco, textura algodonosa, margen entero. Un anillo concéntrico.

Estructuras microscópicas: Conidióforos sencillos o ramificados hialinos con conidias hialinas dimórficas: microconidias elípticas de 1-2 células y macroconidias en forma de bote de 2-4 células.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: microconidias de 4.06 – 7.11  $\mu\text{m}$  x 1.33 – 2.40  $\mu\text{m}$ ; macroconidias (dos y cuatro células) de 10.02 – 17.35  $\mu\text{m}$  x 2.11 – 5.73  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.13.** *F. solani* cepa 2. A) conidióforo simple con masa de microconidias; B) macroconidias de 2-4 células; C) haz de la colonia en PDA; D) dorso de la colonia.

#### 14. *Fusarium* spp. Link.

Cultivo ejemplar: 187 (SC, suelo, T3)

Grupo: G-10

Colonia: Color blanco y violeta, textura plana y algodonosa, margen ondulado. Anillo concéntrico color violeta en haz y dorso de la colonia en PDA.

Estructuras microscópicas: Conidioforos simples, cortos, sosteniendo masa de esporas en el ápice. Conidias dimórficas: las microconidias son ovaladas de 1-2 células; las macroconidias son en forma de bote con células apicales curvadas de 4-6 células. Las clamidosporas generalmente solitarias.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Microconidias de 5.22-8.61 $\mu\text{m}$  (largo) x 1.23-2.75  $\mu\text{m}$  (ancho); macroconidias de 10.44-17.72  $\mu\text{m}$  x 2.27- 2.98  $\mu\text{m}$ ; clamidosporas de 7.21-8.65  $\mu\text{m}$  x 6.04-9.29  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.14.** *Fusarium* spp. A) Conidióforos apicales y laterales con masa de microconidias teñidos con AA (40X); B) haz de la colonia en PDA; C) Dorso de la colonia.

### 15. *Geotrichum* spp. Link.

Cultivo ejemplar: 180 (SC, suelo, T2)

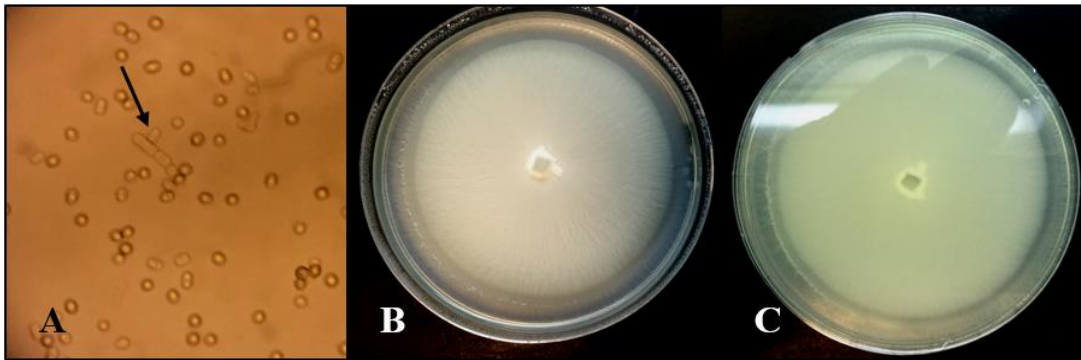
Grupo: G-1

Colonia: Color blanco, textura plana y cremosa, margen entero; tiene un anillo concéntrico.

Estructuras microscópicas: Artrosporas (esporas) hialinas, cilíndricas y elípticas; clamidosporas subglobosas que salen del esterigmata de la hifa.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: artrosporas cilíndricas de  $3.49 - 5.87 \mu\text{m} \times 1.79 - 3.74 \mu\text{m}$ ; artrosporas elípticas  $3.78 - 4.96 \mu\text{m} \times 2.98 - 4.19 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.15.** *Geotrichum* spp.: A) artrosporas con clamidosporas (indicado en la flecha) (40 X); B) haz de la colonia en PDA; C) Dorso de la colonia.

## 16. *Penicillium* spp. 1 Link.

Cultivo ejemplar: 197 (SC, suelo, T5)

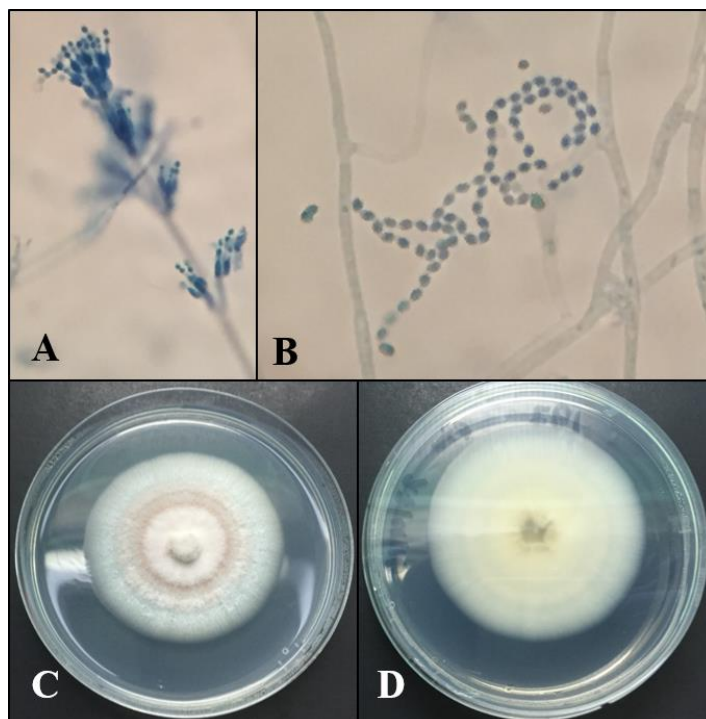
Grupo: G-12

Colonia: Color blanco y rosa, textura algodonosa, margen entero. Tiene anillos concéntricos color rosado de diferentes tonos. La zona central es más alta que los bordes.

Estructuras microscópicas: Conidióforos hialinos, con dos o más ramificaciones después de los filidos y la métula (biverticilado). Filidos en forma de bolos o vasijas; conidias catenuladas, hialinas, ovoides o redondas y lisas con un extremo apiculado.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: conidias de  $1.81 - 2.98 \mu\text{m} \times 1.81 - 2.75 \mu\text{m}$ ; cabeza de conidióforo (incluye las ramificaciones y masa de conidias) de  $15.51 - 55.38 \mu\text{m} \times 11.05 - 34.33 \mu\text{m}$ ; métula de  $12.70 - 13.72 \mu\text{m} \times 2.09 - 3.60 \mu\text{m}$ ; filidos de  $7.46 - 9.48 \mu\text{m} \times 1.23 - 1.61 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.16.** *Penicillium* spp. 1. A) Conidióforos biverticilados teñidos con AA (40X); B) conidias catenuladas en forma de ovoides (40X); C) haz de la colonia en PDA; D) Dorsal de la colonia.



### 17. *Penicillium* spp. 2 Link.

Cultivo ejemplar: 191 (SC, suelo, T3)

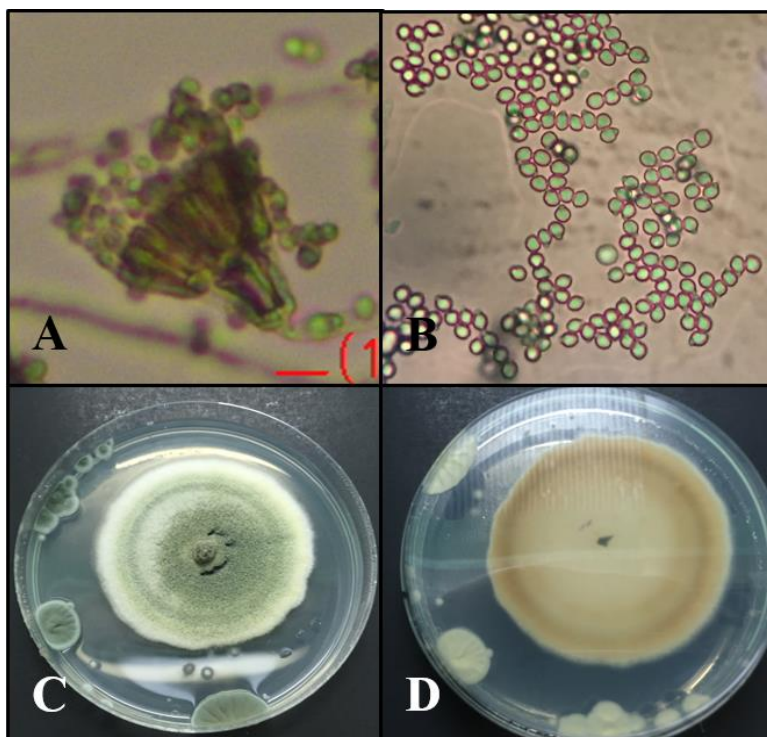
Grupo: G-18

Colonia: Color verde marrón, textura como de alfombra, margen ondulado. Leves anillos concéntricos en el haz y el dorso.

Estructuras microscópicas: Conidióforos biverticilados hialinos; conidias catenuladas, redondas y acuminadas en un extremo; son de color verde y marrón.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Cabeza de 19.21-29.33 $\mu$ m x 7.8-19.86 $\mu$ m; conidias de 1.69-2.53 $\mu$ m.



**Figura 2.17.** *Penicillium* spp. 2: A) Conidióforo biverticilado (40X) (línea roja mide 5.07 $\mu$ m); B) conidias catenuladas con un extremo puntiagudo (40X); C) haz de la colonia en PDA; D) Dorso de la colonia.

### **18. *Penicillium* spp. 3 Link.**

Cultivo ejemplar: 296 (SD, suelo, T4)

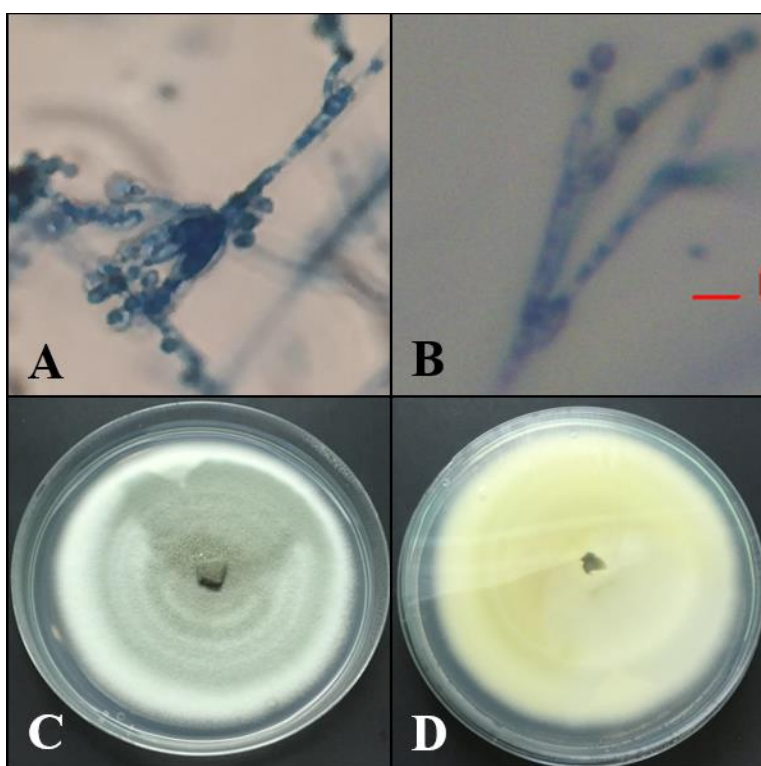
Grupo: G- 30

Colonia: Color verde y gris, textura polvoriento y plana, margen lobulado. Dorso de colonias color blanco, crema y marrón.

Estructuras microscópicas: Conidióforos hialinos, erectos, verticilados con fiálidos en forma de vasija sosteniendo conidias catenuladas. Las conidias son redondas o elípticas, hialinas, lisa y con un extremo apiculado.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: fiálidos de 9.93 – 14.25  $\mu\text{m}$  x 1.19 – 2.75  $\mu\text{m}$ ; conidias de 1.52 – 2.98  $\mu\text{m}$  x 1.52 – 2.70  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.18.** *Penicillium* spp. 3. A-B) Conidióforos verticilados con conidias catenuladas teñidos con AA (40X); C) haz de la colonia PDA; D) Dorso de la colonia.



### 19. *Penicillium* spp. 4 Link.

Cultivo ejemplar: 140 (SC, suelo, T6)

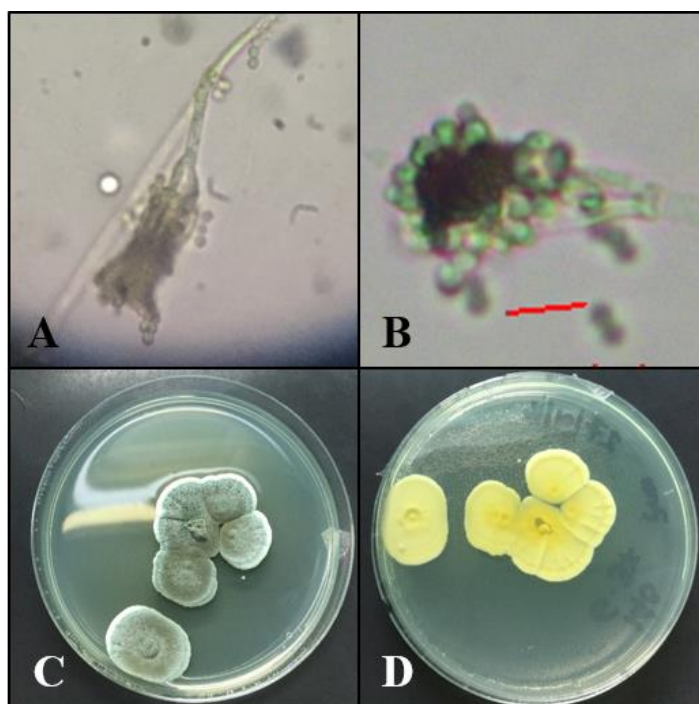
Grupo: G-37

Colonia: Color verde oscuro y blanco, textura polvorienta y lisa, margen lobulado. Protuberancias en centro de colonias color blanco.

Estructuras microscópicas: Conidióforos hialinos ramificados con conidias redondas con un extremo apiculado color verde-marrón. Al menos dos ramificaciones visibles por conidióforo (biverticilado).

Medio cultivo utilizado: PDA

Medidas: cabeza de conidióforos (incluye las ramificaciones y masa de conidias) 19.47 – 23.89  $\mu\text{m}$  x 7.18 – 13.66  $\mu\text{m}$ ; conidias de 1.49 – 1.91  $\mu\text{m}$  x 1.49 – 2.11  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.19.** *Penicillium* spp. 4. A-B) Conidióforo verticilado; C) haz de la colonia en PDA; D) Dorso de la colonia.

## 20. *Penicillium* spp. 5 Link.

Cultivo ejemplar: 261 (SD, suelo, T4)

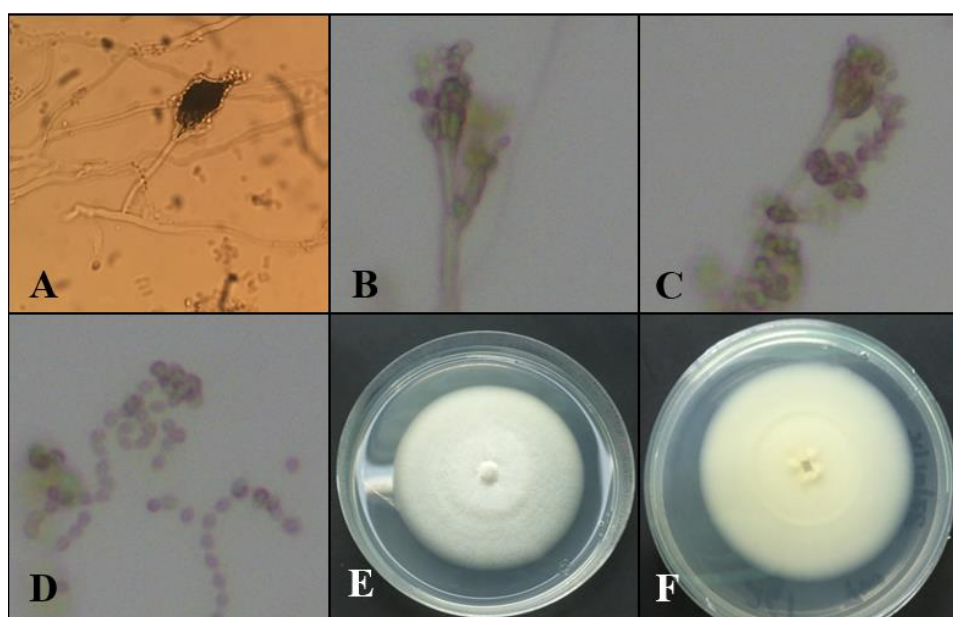
Grupo: 7a

Colonia: Color blanco, textura un poco algodonosa, margen entero. A veces con anillos concéntricos color rosado.

Estructuras microscópicas: Conidióforos sencillos, hialinos con una ramificación (una métula) después de los fiálidos. Conidias catenuladas y hialinas; masas de conidias color marrón oscuro.

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: conidias de 1.81 – 2.46  $\mu\text{m}$  x 1.49 – 1.61  $\mu\text{m}$ ; fiálidos de 5.99 – 8.40  $\mu\text{m}$  x 1.19 – 2.00  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.20.** *Penicillium* spp. 5. A-C) conidióforo con una ramificación y/o fiálidos (40X); D) conidias catenuladas (40X); E) haz de la colonia en PDA; F) Dorsal de la colonia.

## 21. *Pythium* spp. Dresch.

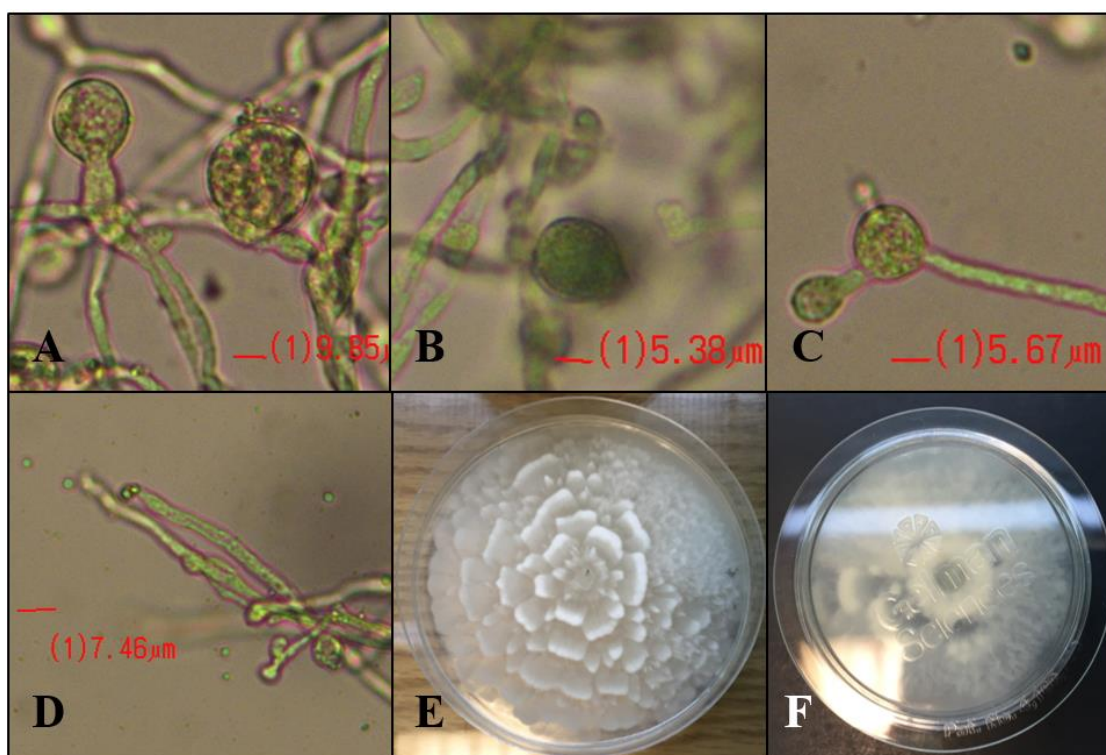
Origen de espécimen: Especimen preservado de la Dra. Zapata

Colonia: Al crecer en agar de harina de maíz (CMA) demuestra un color blanco, textura plana y encrespada, con apariencia de flor; margen ondulado.

Estructuras microscópicas: Esporangios globosos o forma de pera hialinos. No se observaron oogonios ni anteridios (Mycobank, 2016).

Medios de cultivo utilizados: CMA, PDA y V8.

Medidas: Esporangios de 8.78- 16.72  $\mu\text{m}$  x 6.67- 12.4  $\mu\text{m}$ ; esporangiosporas 2.19- 2.4  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.21.** *Pythium* spp. A-B) Esporangios globosos y en forma de pera (40X); C) esporangio terminal con vesícula asexual emergiendo (40X); D) vesículas emergiendo de filamentos inflados (40X); haz de la colonia en PDA; E) dorso de la colonia.

## 22. *Rhizoctonia solani* Kunh

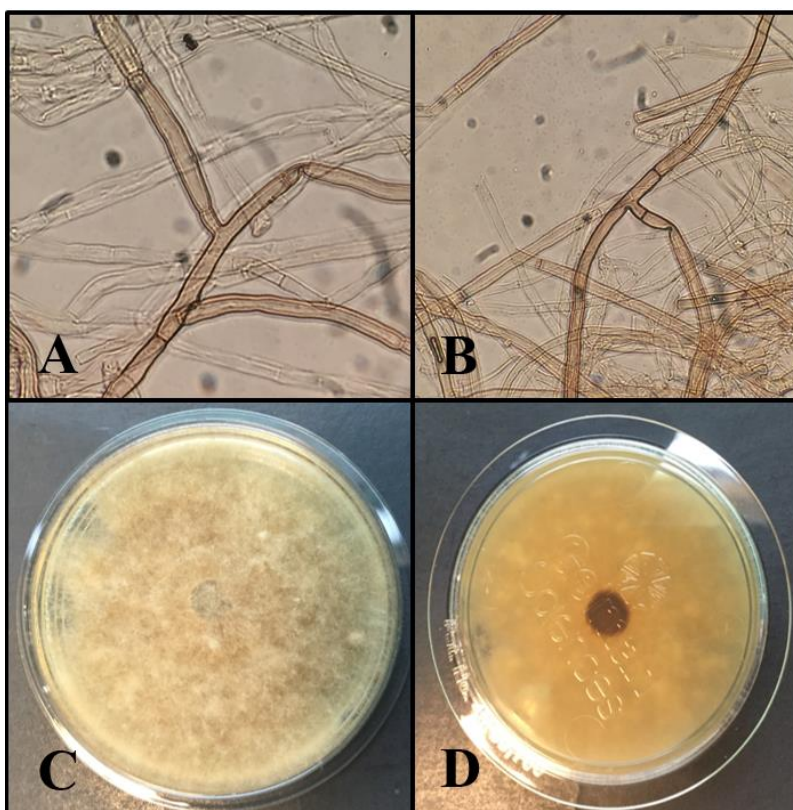
Origen de espécimen: Especimen preservado de la Dra. Zapata

Colonia: Color marrón-blanco, textura algodonosa, margen entero. No se forman esclerocios.

Estructuras microscópicas: micelio color marrón pálido con células bien largas, marcadas con septas; en las ramificaciones se forma un ángulo de 90 grados característico de la especie. No se observaron células conidiógenas o esporodoquios (Barnett y Hunter, 1987)

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: Hifas de 23.68-58.68  $\mu\text{m}$  x 4.65-5.72  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.22.** *R. solani*. A-B) Micelio con ramificación en posición de 90° (40X); C) haz de la colonia en PDA; D) Dorso de la colonia.

### **23. *Sclerotium rolfsii* Sacc.**

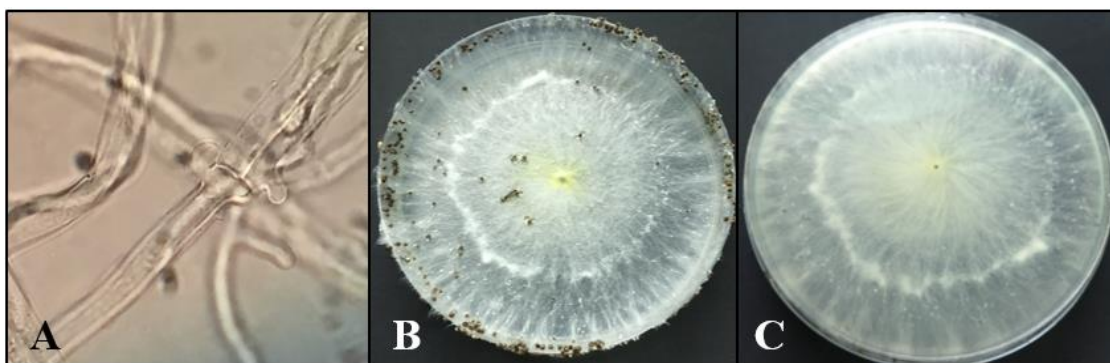
Origen de espécimen: Cormo de yautía selección Nazareno infectado con esclerocios.

Colonia: Micelio blanco y grueso que tiende a agregarse en cordones rizomórficos; de crecimiento acelerado. Forma esclerocios color marrón oscuro a negro luego de 4-7 días.

Estructuras microscópicas: Se producen al menos dos tipos de hifas. Una es de células gruesas, rectas y grandes, que tienen conexiones grapa en cada septo y pueden demostrar ramificación en el lugar de las conexiones grapa. En la segunda, las hifas son delgadas, tienen muchas ramificaciones y carece de conexiones grapas (Fichtner, 1999).

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: hifas de 5.48- 8.4  $\mu\text{m}$  de ancho; conexiones grapa de 8.95-12.61  $\mu\text{m}$  x 11.08- 22.78  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.23.** *S. rolfsii*. A) conexiones grapa con ramificaciones (40X); B) haz de la colonia en PDA demostrando esclerocios; C) dorso de la colonia.



## 24. *Scolecobasidium* spp. Abbott

Cultivo ejemplar: 142 (SC, suelo, T6)

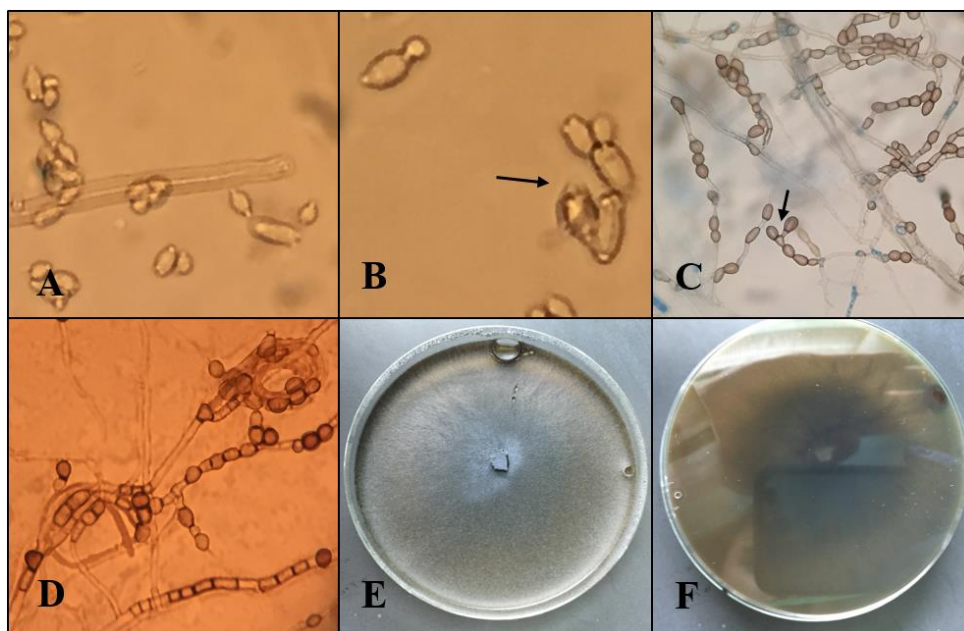
Grupo: G- C

Colonia: Color marrón, textura plana, margen entero. Micelio empieza de color hialino, luego amarillo-anaranjado y termina negro completamente.

Estructuras microscópicas: Conidióforos (o células conidiógenas) surgen de hifas aéreas, sencillas o en grupos, relativamente cortas a veces de una célula y de forma irregular. Las conidias son de color marrón, de una, dos o cuatro células, ovoides, cilíndricas o en forma de Y. Se producen en fialidos con dentículos que parecen a los esterigmas de las basidias (Barnett, 1978).

Medios de cultivo utilizados: PDA y PDA  $10^{-1}$  con hojas de clavel.

Medidas: conidias cilíndricas de  $6.29 - 13.02 \mu\text{m} \times 3.60 - 4.81 \mu\text{m}$ ; conidias ovoides de  $7.17 - 10.02 \mu\text{m} \times 4.85 - 6.15 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.24.** *Scolecobasidium* spp. A-B) Restos de fialidos conidias y parte de un conidióforo (flecha) (40X); C-D) conidias en cadena de forma ovoide, cilíndrica y en forma de 'Y' (ver flecha) de color marrón; E) haz de la colonia en PDA; F) dorso de la colonia.

## 25. *Trichoderma harzianum* Rifai

Cultivo ejemplar: 295 (SD, suelo, T4)

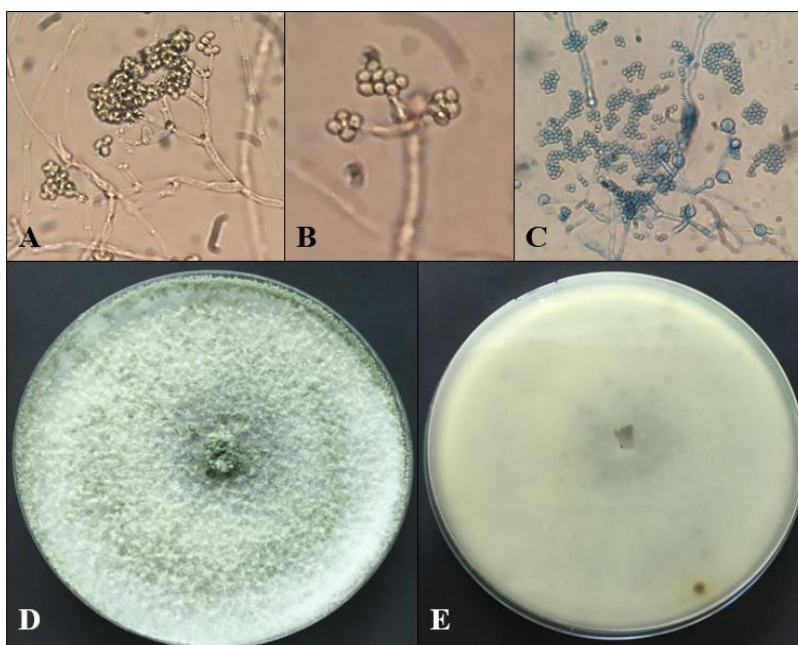
Grupo: 9<sup>a</sup>

Colonia: Color blanco, textura algodonosa, margen entero. Forma tenues anillos concéntricos color verde luego de 1 a 2 semanas.

Estructuras microscópicas: Conidióforos hialinos, ramificados en forma de pirámide, con ramificaciones cortas cerca del ápice y ramificaciones cortas en la zona basal; se ramifican en los ángulos derechos. Los fiálidos son en forma de vasija, verticilados de 3-5, atenuados en los ápices. Las conidias son sub-esféricas, de pared lisa, de transparente opaco a verde palido. Las clamidosporas son terminales o intercaladas, de pared celular lisa y hialinas (Mycobank, 2016).

Medio de cultivo utilizado: PDA

Medidas: conidias de 3.37 – 3.82  $\mu\text{m}$  x 2.33 – 3.23  $\mu\text{m}$ ; clamidosporas de 6.33 – 10.20  $\mu\text{m}$  x 6.08 – 8.23  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.25.** *T. harzianum*. A) conidióforo con hasta tres ramificaciones (40X); B) ramificación de un conidióforo con fiálidos cortos y conidias subhialinas (40X); C) clamidosporas globosas solitarias y conidias; D) haz de colonia en PDA demostrando un sublime anillo concéntrico; E) dorso de la colonia.

## 26. Trichoderma spp. Pers.

Cultivo ejemplar: 286 (SD, suelo, T3)

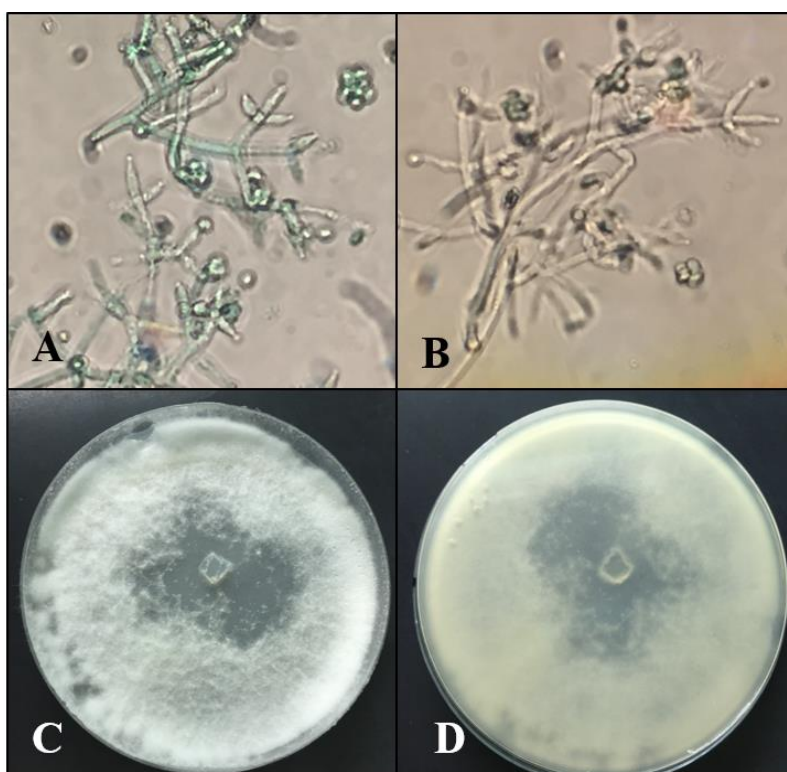
Grupo: G- 22

Colonia: Color blanco, textura algodonosa, margen irregular. Cubre la placa (85 mm aprox.) en tres días a  $\geq 30$  C. En PDA crece rápido pero no esporula.

Estructuras microscópicas: Conidióforos de tres o más ramificaciones, con dos o tres fiálidos, hialinos al principio y verdes cuando la colonia desarrolla cuerpos fructíferos. Conidias elípticas u ovoides, lisas y de color verde pálido.

Medios de cultivo utilizados: PDA  $10^{-1}$  con hojas de clavel y PDA  $10^{-1}$  con trozos de zanahoria.

Medidas: fiálidos de  $9.24 - 14.79 \mu\text{m} \times 1.20 - 2.69 \mu\text{m}$ ; primera ramificación de  $8.78 - 20.13 \mu\text{m} \times 1.08 - 1.90 \mu\text{m}$ ; conidias de  $3.33 - 4.08 \mu\text{m} \times 2.71 - 2.78 \mu\text{m}$ .



**Figura 2.26.** *Trichoderma* spp. A-B) Conidióforos ramificados con fiálidos a 450 (40X); C) haz de la colonia en PDA; D) dorso de la colonia en PDA.



## 27. *Verticillium* spp. Nees.

Cultivo ejemplar: 254 (SD, suelo, T4)

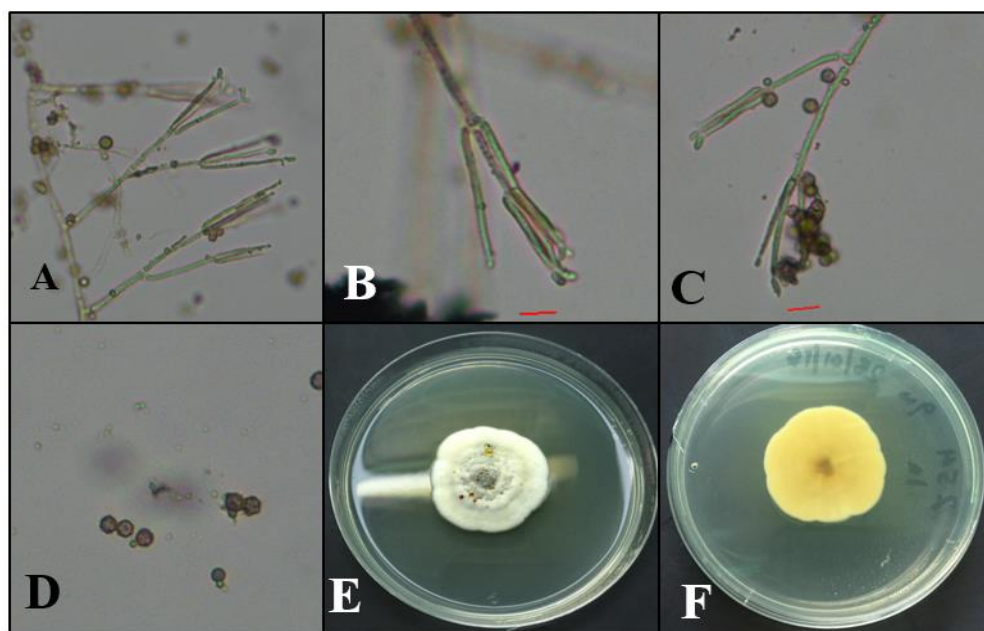
Grupo: 1a

Colonia: Color blanco anaranjado, textura algodonosa, margen ondulado. Libera muchos exudados y tiñe el agar con metabolitos.

Estructuras microscópicas: conidióforos hialinos, que tienen dos ramificaciones y tres fialidos delgados en forma de tenedor. Conidias de una célula, ovoides o elipsoides, equinuladas, color verde oliva; surgen solitarias o una pequeña masa en la zona apical de los fialidos. El espécimen se puede confundir fácilmente con *Penicillium* spp. por las conidias.

Medio de cultivo utilizado: PDA 10<sup>-1</sup> con hojas de clavel

Medidas: Fialidos de 17.13 – 34.48  $\mu\text{m}$  x 1.49 – 2.09  $\mu\text{m}$ ; primera ramificación de 14.00 – 26.20  $\mu\text{m}$  x 1.08 – 2.46  $\mu\text{m}$ ; conidias de 2.70 – 3.33  $\mu\text{m}$  x 2.40 – 3.92  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.27.** *Verticillium* spp.: A) conidióforos verticilados (40X); B) fialidos con primera ramificación (40X- línea mide 6.87  $\mu\text{m}$ ); C) conidióforos con conidias (40X- línea mide 7.18  $\mu\text{m}$ ); D) conidias elípticas rugosas color verde oliva; E) haz de la colonia en PDA; F) dorso de la colonia en PDA.

## 28. Morfotipo 1

Cultivo ejemplar: 179 (SC, suelo, T2)

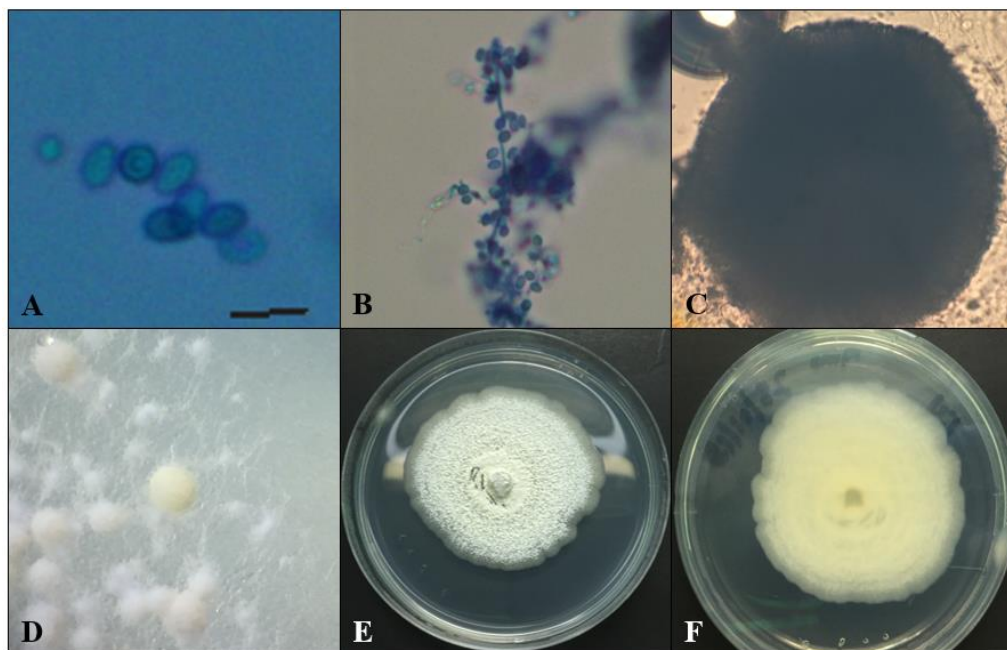
Grupo: G-6

Colonia: Color blanco, textura crateriforme, margen entero u ondulado. Cuerpos fructíferos color amarillo y después de 10 días se tornan verdes.

Estructuras microscópicas: Conidióforo erecto simple con conidias en la zona apical. Conidias hialinas de forma elípticas y ovoides. Estructuras grandes parecidas a picnidios color amarillo, esporas parecidas a ascosporas. No se vieron ascas.

Medios de cultivo utilizados: PDA, V8, PDA 10<sup>-10</sup> con pedazos de zanahoria, PDA 10<sup>-10</sup> con hojas de clavel y medio de maíz (CMA).

Medidas: picnidios de 94.58 – 132.64  $\mu\text{m}$  x 85.50 – 122.73  $\mu\text{m}$ ; conidias de 2.75 – 4.01  $\mu\text{m}$  x 1.81 – 2.67  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.28.** Morfotipo 1: A) Esporas teñidas con AA (40X- línea de 5.38  $\mu\text{m}$ ); B) conidióforo recto con conidias axilares (40X); C-D) Estructura semejante a un picnidio (10X y 4X); D) haz de la colonia en PDA; E) Dorso de la colonia.

## 29. Morfotipo 2

Cultivo ejemplar: 202 (SC, suelo, T5)

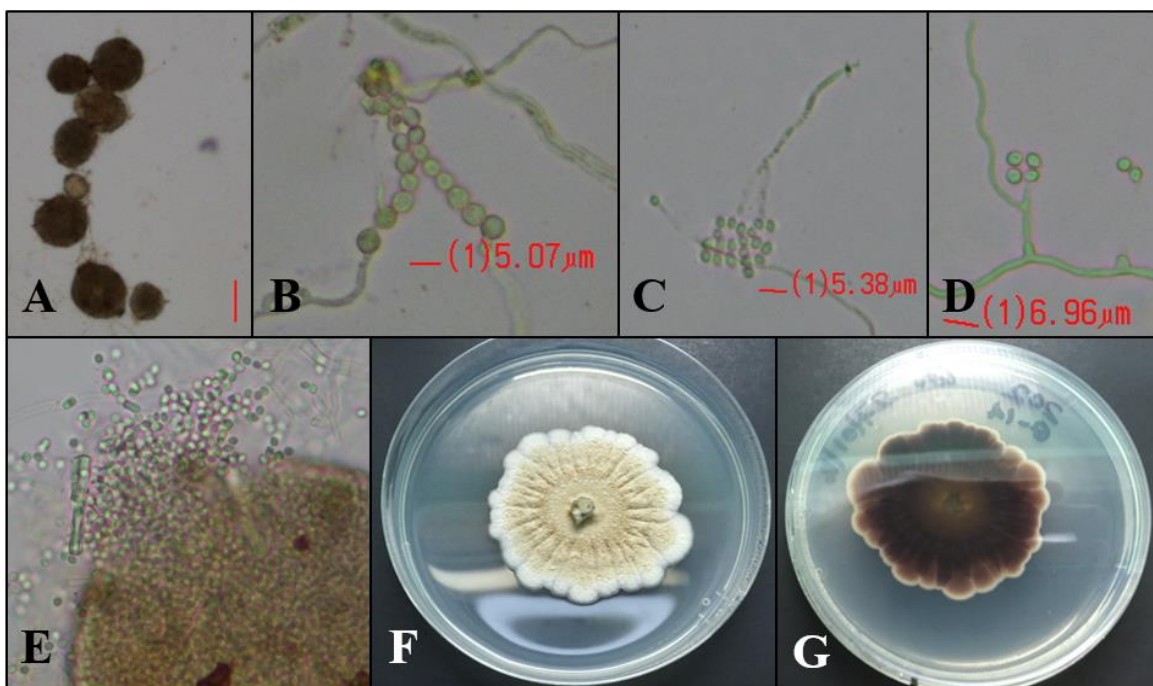
Grupo: G-14

Colonia: Color marrón claro y crema, textura aterciopelada, margen ondulado.

Estructuras microscópicas: Conidióforos erectos, simples o ramificados, no muy definidos, sosteniendo conidias en el ápice. Estructuras como peritecios color marrón oscuro con ostiolos en cuellos cortos; contenían abundantes aniloconidias catenuladas (las conidias salen en forma anillada) o conidias solitarias. Cadenas de esporas de 4 a 12 conidias de color verde pálido en forma ovoide. Muy parecido a *Scopulariopsis* spp.

Medios de cultivo utilizados: PDA, V8, PDA 10<sup>-10</sup> con pedazos de zanahoria, PDA 10<sup>-10</sup> con hojas de clavel y CMA.

Medidas: Peritecios de 13.15-27.24  $\mu\text{m}$  x 14.15-31.27  $\mu\text{m}$ ; conidias de 2.27-3.88  $\mu\text{m}$  x 2.55-3.69  $\mu\text{m}$ .



**Figura 2.29.** Morfotipo 2. A) Grupos de peritecios en forma de limón (10X) (línea roja mide 7.75  $\mu\text{m}$ ); B) Dos cadenas de conidias (40X); C) Conidióforo con una ramificación y masa de conidias (40X); D) Conidióforo simple (40X); E) picnidio eclosionando y liberando esporas; F) haz de la colonia en PDA; y G) Dorsal de la colonia.

### 30. Morfotipo 3

Cultivo ejemplar: 150 (SC, suelo, T7)

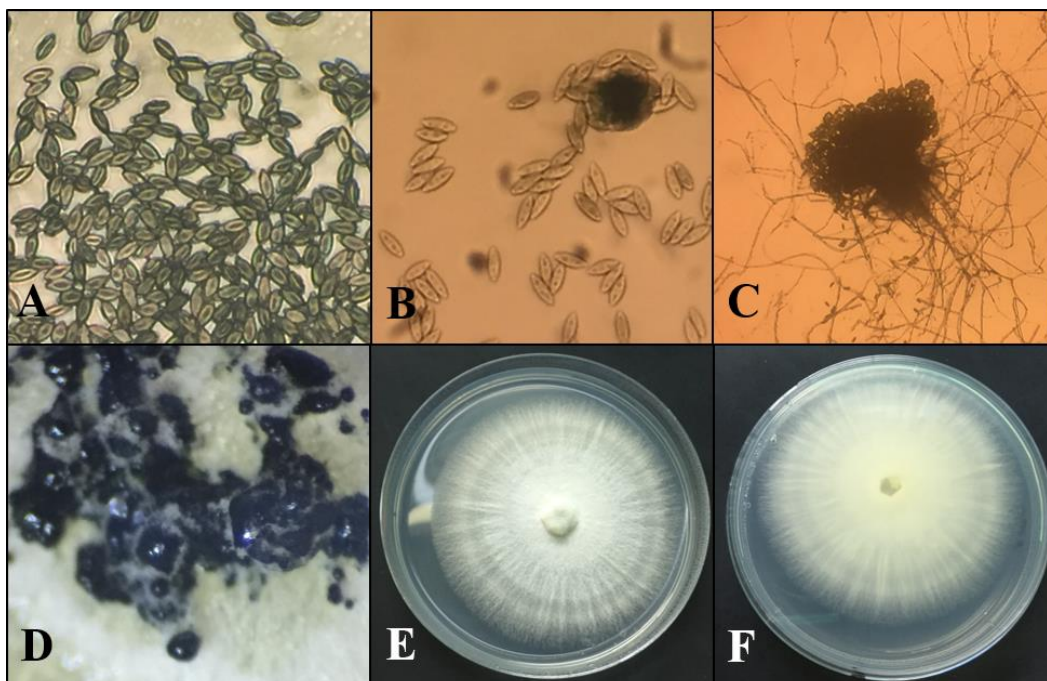
Grupo: 3a

Colonia: Color blanco, textura vellosa, margen entero. Después de 10 días de maduración surgen estromas negros empezando desde las orillas.

Estructuras microscópicas: Conidias en forma de limón color gris oscuro y hialino con dos puntos adentro que asemejan a ascosporas. Se encuentran abundantemente en estromas color negro parecidos a peritecios en algunos casos. En el cultivo se observan estromas parecidos a exudados color negro que surgen luego de dos semanas. Es muy parecido a *Nectria ralfsii* Berk. & Br. Se necesitan observar más estructuras para mejor clasificación.

Medios de cultivo utilizados: PDA, PDA 10<sup>-10</sup>, PDA 10<sup>-10</sup> con hojas de clavel y PDA 10<sup>-10</sup> con trozos de zanahoria.

Medidas: esporas de 5.87 – 7.76 µm x 2.55 – 3.21 µm.



**Figura 2.30.** Morfotipo 3. A-B) conidias que se asemejan a ascosporas color gris oscuro y hialinas (40X); C-D) estromas donde se hallan las esporas y tienen apariencia de exudado (40X y 10X); E) haz de la colonia en PDA; F) Dorso de la colonia.

## 2.3.2 Frecuencias de la población de hongos

### 2.3.2.1 Frecuencia general de hongos

En las muestras de raíces y de suelo de los dos manejos (descanso y uso continuo), se obtuvo una diversidad de hongos. Los hongos con mayor frecuencia en la población (de mayor a menor) fueron *Fusarium solani* (**Fs**) (Frecuencia absoluta -**FA**- = 66), seguido del Morfotipo 1 (**M 1**) (FA= 26), *Penicillium* spp. 2 (**Pen 2**) (FA= 25), *Aspergillus flavus* (**Afla**) (FA= 15) y *A. terreus* (**Ater**) (FA= 14). Los hongos con menor frecuencia fueron *Penicillium* spp. 5 (**Pen 5**), *Geotrichum* spp. (**Geo**), Desconocido (**Des**) y *Cladosporium* spp. (**Clad**) (FA= 1 c/u) (Tabla 2.2).

**Tabla 2.2.** Frecuencia general de la población de hongos

| Espécimen                     | FA <sup>1</sup> | FR <sup>2</sup> |
|-------------------------------|-----------------|-----------------|
| <i>Fusarium solani</i>        | 66              | 0.262           |
| Morfotipo 1                   | 26              | 0.103           |
| <i>Penicillium</i> spp. 2     | 25              | 0.099           |
| <i>Fusarium</i> spp.          | 15              | 0.06            |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | 15              | 0.06            |
| <i>Aspergillus terreus</i>    | 14              | 0.056           |
| <i>Penicillium</i> spp. 1     | 12              | 0.048           |
| <i>Aspergillus niger</i>      | 12              | 0.048           |
| <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 11              | 0.044           |
| <i>Curvularia lunata</i>      | 10              | 0.04            |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | 9               | 0.036           |
| <i>Trichoderma harzianum</i>  | 6               | 0.024           |
| <i>Diplodia</i> spp.          | 6               | 0.024           |
| <i>Alternaria alternata</i>   | 4               | 0.016           |
| <i>Penicillium</i> spp. 3     | 3               | 0.012           |
| <i>Verticillium</i> spp.      | 2               | 0.008           |
| <i>Trichoderma</i> spp.       | 2               | 0.008           |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.   | 2               | 0.008           |
| <i>Penicillium</i> spp. 4     | 2               | 0.008           |
| Morfotipo 3                   | 2               | 0.008           |
| Morfotipo 2                   | 2               | 0.008           |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | 2               | 0.008           |
| <i>Penicillium</i> spp. 5     | 1               | 0.004           |
| <i>Geotrichum</i> spp.        | 1               | 0.004           |
| Desconocido                   | 1               | 0.004           |
| <i>Cladobotryum</i> spp.      | 1               | 0.004           |

<sup>1</sup> Frecuencia absoluta (FA)

<sup>2</sup> Frecuencia relativa (FR)

### 2.3.2.2 Frecuencia de hongos aislados de suelo

En el suelo de uso continuo (SC), *Fs* fue el más frecuente con FA= 45, seguido por M 1 con 21, *Ater* y *Pen 2* con 13 c/u. Los hongos menos frecuentes (FA= 1) fueron *Des*, Morfotipo 2 (**M 2**), *Alternaria alternata* (**Alt**), *Geo*, *Curvularia lunata* (**Clun**), *Verticillium* spp. (**Ver**), *Trichoderma* spp. (**Tri**), *Scolecobasidium* spp. (**Scol**) y *Aspergillus* spp. 1 (**Asp 1**) (Tabla 2.3). En el suelo en descanso (SD), *Fs* resultó con FA= 21, *Pen 2* con FA=21, *Asp 1* con FA=10 y *Clun* con FA= 9. Los hongos con FA= 1 en SD fueron *Ver*, *Trichoderma harzianum* (**Thar**), *Scol*, *Pen 5*, *Penicillium* spp. 3 (**Pen 3**), *Penicillium* spp. 1 (**Pen 1**), *M 2*, *Clad* y *Ater* (Tabla 2.4).

**Tabla 2.3.** Frecuencia de hongos en el suelo de uso continuo en todos los tratamientos

| Espécimen                     | FA | FR    |
|-------------------------------|----|-------|
| <i>Fusarium solani</i>        | 45 | 0.294 |
| Morfotipo 1                   | 21 | 0.137 |
| <i>Aspergillus terreus</i>    | 13 | 0.085 |
| <i>Penicillium</i> spp. 2     | 13 | 0.085 |
| <i>Penicillium</i> spp. 1     | 11 | 0.072 |
| <i>Fusarium</i> spp.          | 9  | 0.059 |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | 8  | 0.052 |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | 7  | 0.046 |
| <i>Aspergillus niger</i>      | 5  | 0.033 |
| <i>Diplodia</i> spp.          | 4  | 0.026 |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | 2  | 0.013 |
| Morfotipo 3                   | 2  | 0.013 |
| <i>Penicillium</i> spp. 3     | 2  | 0.013 |
| <i>Penicillium</i> spp. 4     | 2  | 0.013 |
| Desconocido                   | 1  | 0.007 |
| Morfotipo 2                   | 1  | 0.007 |
| <i>Alternaria alternata</i>   | 1  | 0.007 |
| <i>Geotrichum</i> spp.        | 1  | 0.007 |
| <i>Curvularia lunata</i>      | 1  | 0.007 |
| <i>Verticillium</i> spp.      | 1  | 0.007 |
| <i>Trichoderma</i> spp.       | 1  | 0.007 |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.   | 1  | 0.007 |
| <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 1  | 0.007 |

**Tabla 2.4.** Frecuencia de hongos en el suelo en descanso en todos los tratamientos

| Espécimen                     | FA | FR    |
|-------------------------------|----|-------|
| <i>Fusarium solani</i>        | 21 | 0.212 |
| <i>Penicillium</i> spp. 2     | 12 | 0.121 |
| <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 10 | 0.101 |
| <i>Curvularia lunata</i>      | 9  | 0.091 |
| <i>Aspergillus niger</i>      | 7  | 0.071 |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | 7  | 0.071 |
| <i>Trichoderma harzianum</i>  | 6  | 0.061 |
| <i>Fusarium</i> spp.          | 6  | 0.061 |
| Morfotipo 1                   | 5  | 0.051 |
| <i>Alternaria alternata</i>   | 3  | 0.030 |
| <i>Diplodia</i> spp.          | 2  | 0.020 |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | 2  | 0.020 |
| <i>Verticillium</i> spp.      | 1  | 0.010 |
| <i>Trichoderma</i> spp.       | 1  | 0.010 |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.   | 1  | 0.010 |
| <i>Penicillium</i> spp. 5     | 1  | 0.010 |
| <i>Penicillium</i> spp. 3     | 1  | 0.010 |
| <i>Penicillium</i> spp. 1     | 1  | 0.010 |
| Morfotipo 2                   | 1  | 0.010 |
| <i>Cladobotryum</i> spp.      | 1  | 0.010 |
| <i>Aspergillus terreus</i>    | 1  | 0.010 |

### 2.3.2.3 Frecuencia de hongos por tratamientos

En las frecuencias de los hongos por tratamiento (**T**), *Fs* es el más frecuente en 6/8 de los Ts, mientras que el M1 fue el segundo con 2/8. En el T1, *Fs* tiene frecuencia relativa (**FR**) igual a 37.5%, *Aspergillus niger* (**An**) 12.5% y *Pen* 2 con 9.4%. Los hongos con FR menor (3.1% c/u) fueron *Clad*, *Clun* y *Afla*. El T2 tiene a M1 con FR= 19.2%, seguido por *Pen* 2 y *Fs* con 11.5 c/u. Algunos de los hongos con menor FR son *Fox*, *Diplodia* spp. (**Dip**), *Pen* 3, *Thar* y *Ver* (FR= 3.8%). En el T 3, M1 y *Fs* tienen FR= 15.4. Algunos de baja FR fueron *Fusarium oxysporum* (**Fox**), *Tri*, *Dip* y *Curvularia brachyspora* (**Cbra**) (FR= 3.8%). En el T4, *Fs* tuvo FR= 24.4% y *Pen* 2 y *Clun* 12.2% c/u. Algunos con FR menor (2.4%) fueron *Ver*, *Tri* y *Ater*. En el T5, *Fs* tuvo FR= 33.3% y M1 18.2%. Los hongos con FR menor (3.0%) fueron M 2 y *Dip*. En el T6, *Fs* tuvo FR= 27.3% y *Pen* 2 18.2%. Algunos hongos con FR menor (3.0%) fueron *Afla*, *Cbra*, M 2 y *Fusarium* spp. (**Fus**). En el T7 (Control -) *Fs* tuvo FR= 16.1% y *Ater*, *Cbra* y *Fus* 12.9% c/u. Algunos con FR menor (3.2%) son M1, *Alt* y *Thar*. En el T8, *Fs* tuvo FR= 40% y *Fus* y *Asp* 1 10%. Algunos con FR menor (3.3% c/u) fueron *An*, *Pen* 1, 3 y 4. El número de cepas aisladas por cada tratamiento fueron 10 en T1, 15 en T2, 14 en T3, 14 en T4, 9 en T5, 13 en T6, 14 en T7 y 12 en T8 (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5.** Frecuencias de hongos por tratamientos en suelo en descanso y de uso continuo

| Trat* | Espécimen                   | FA | FR    | Trat | Espécimen                  | FA | FR    |
|-------|-----------------------------|----|-------|------|----------------------------|----|-------|
| 1     | <i>Fusarium solani</i>      | 12 | 0.375 | 5    | <i>Fusarium solani</i>     | 11 | 0.333 |
| 1     | <i>Aspergillus niger</i>    | 4  | 0.125 | 5    | Morfotipo 1                | 6  | 0.182 |
| 1     | <i>Penicillium</i> spp. 2   | 3  | 0.094 | 5    | <i>Penicillium</i> spp. 1  | 6  | 0.182 |
| 1     | Morfotipo 1                 | 3  | 0.094 | 5    | <i>Aspergillus terreus</i> | 2  | 0.061 |
| 1     | <i>Alternaria alternata</i> | 3  | 0.094 | 5    | <i>Aspergillus niger</i>   | 2  | 0.061 |
| 1     | <i>Fusarium</i> spp.        | 2  | 0.063 | 5    | <i>Aspergillus flavus</i>  | 2  | 0.061 |
| 1     | <i>Aspergillus</i> spp. 1   | 2  | 0.063 | 5    | <i>Fusarium</i> spp.       | 2  | 0.061 |
| 1     | <i>Cladobotryum</i> spp.    | 1  | 0.031 | 5    | Morfotipo 2                | 1  | 0.03  |
| 1     | <i>Curvularia lunata</i>    | 1  | 0.031 | 5    | <i>Diplodia</i> spp.       | 1  | 0.03  |
| 1     | <i>Aspergillus flavus</i>   | 1  | 0.031 |      |                            |    |       |
| Trat  | Espécimen                   | FA | FR    | Trat | Espécimen                  | FA | FR    |
| 2     | Morfotipo 1                 | 5  | 0.192 | 6    | <i>Fusarium solani</i>     | 9  | 0.273 |
| 2     | <i>Penicillium</i> spp. 2   | 3  | 0.115 | 6    | <i>Penicillium</i> spp. 2  | 6  | 0.182 |
| 2     | <i>Fusarium solani</i>      | 3  | 0.115 | 6    | <i>Aspergillus terreus</i> | 3  | 0.091 |
| 2     | <i>Aspergillus terreus</i>  | 2  | 0.077 | 6    | <i>Curvularia lunata</i>   | 2  | 0.061 |
|       |                             |    |       | 6    | <i>Aspergillus</i> spp. 1  | 2  | 0.061 |



[Tabla 2.5 continuación]

|   |                               |   |       |
|---|-------------------------------|---|-------|
| 2 | <i>Aspergillus flavus</i>     | 2 | 0.077 |
| 2 | <i>Fusarium</i> spp.          | 2 | 0.077 |
| 2 | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Geotrichum</i> spp.        | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Fusarium oxysporum</i>     | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Penicillium</i> spp. 1     | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Diplodia</i> spp.          | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Penicillium</i> spp. 3     | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Trichoderma harzianum</i>  | 1 | 0.038 |
| 2 | <i>Verticillium</i> spp.      | 1 | 0.038 |

| Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
|------|-------------------------------|----|-------|
| 3    | Morfotipo 1                   | 4  | 0.154 |
| 3    | <i>Fusarium solani</i>        | 4  | 0.154 |
| 3    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 3  | 0.115 |
| 3    | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 3  | 0.115 |
| 3    | <i>Penicillium</i> spp. 1     | 2  | 0.077 |
| 3    | <i>Trichoderma harzianum</i>  | 2  | 0.077 |
| 3    | <i>Curvularia lunata</i>      | 1  | 0.038 |
| 3    | <i>Fusarium</i> spp.          | 1  | 0.038 |
| 3    | <i>Aspergillus niger</i>      | 1  | 0.038 |
| 3    | <i>Fusarium oxysporum</i>     | 1  | 0.038 |
| 3    | <i>Penicillium</i> spp. 4     | 1  | 0.038 |
| 3    | <i>Trichoderma</i> spp.       | 1  | 0.038 |
| 3    | <i>Diplodia</i> spp.          | 1  | 0.038 |
| 3    | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1  | 0.038 |

| Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
|------|-------------------------------|----|-------|
| 4    | <i>Fusarium solani</i>        | 10 | 0.244 |
| 4    | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 5  | 0.122 |
| 4    | <i>Curvularia lunata</i>      | 5  | 0.122 |
| 4    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 4  | 0.098 |
| 4    | Morfotipo 1                   | 3  | 0.073 |
| 4    | <i>Diplodia</i> spp.          | 3  | 0.073 |
| 4    | <i>Trichoderma harzianum</i>  | 2  | 0.049 |
| 4    | <i>Curvularia brachyspora</i> | 2  | 0.049 |
| 4    | <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 2  | 0.049 |
| 4    | <i>Verticillium</i> spp.      | 1  | 0.024 |
| 4    | <i>Trichoderma</i> spp.       | 1  | 0.024 |
| 4    | <i>Penicillium</i> spp. 5     | 1  | 0.024 |
| 4    | <i>Penicillium</i> spp. 3     | 1  | 0.024 |
| 4    | <i>Aspergillus terreus</i>    | 1  | 0.024 |

|   |                               |   |       |
|---|-------------------------------|---|-------|
| 6 | <i>Aspergillus niger</i>      | 2 | 0.061 |
| 6 | Morfotipo 1                   | 2 | 0.061 |
| 6 | <i>Penicillium</i> spp. 1     | 2 | 0.061 |
| 6 | <i>Fusarium</i> spp.          | 1 | 0.030 |
| 6 | <i>Aspergillus flavus</i>     | 1 | 0.030 |
| 6 | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1 | 0.030 |
| 6 | Morfotipo 2                   | 1 | 0.030 |
| 6 | <i>Scolecobasidium</i> spp.   | 1 | 0.030 |

| Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
|------|-------------------------------|----|-------|
| 7    | <i>Fusarium solani</i>        | 5  | 0.161 |
| 7    | <i>Aspergillus terreus</i>    | 4  | 0.129 |
| 7    | <i>Curvularia brachyspora</i> | 4  | 0.129 |
| 7    | <i>Fusarium</i> spp.          | 4  | 0.129 |
| 7    | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 3  | 0.097 |
| 7    | <i>Aspergillus niger</i>      | 2  | 0.065 |
| 7    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 2  | 0.065 |
| 7    | Desconocido                   | 1  | 0.032 |
| 7    | <i>Curvularia lunata</i>      | 1  | 0.032 |
| 7    | <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 1  | 0.032 |
| 7    | Morfotipo 1                   | 1  | 0.032 |
| 7    | Morfotipo 3                   | 1  | 0.032 |
| 7    | <i>Alternaria alternata</i>   | 1  | 0.032 |
| 7    | <i>Trichoderma harzianum</i>  | 1  | 0.032 |

| Trat | Espécimen                   | FA | FR    |
|------|-----------------------------|----|-------|
| 8    | <i>Fusarium solani</i>      | 12 | 0.400 |
| 8    | <i>Fusarium</i> spp.        | 3  | 0.100 |
| 8    | <i>Aspergillus</i> spp. 1   | 3  | 0.100 |
| 8    | <i>Aspergillus terreus</i>  | 2  | 0.067 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 2   | 2  | 0.067 |
| 8    | Morfotipo 1                 | 2  | 0.067 |
| 8    | Morfotipo 3                 | 1  | 0.033 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 1   | 1  | 0.033 |
| 8    | <i>Aspergillus niger</i>    | 1  | 0.033 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 3   | 1  | 0.033 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 4   | 1  | 0.033 |
| 8    | <i>Scolecobasidium</i> spp. | 1  | 0.033 |

\*Tratamientos: 1) Kocide 3000® + Bioplex®, 2) Bacterias 1-4 + Bioplex®, 3) Bacteria 5 + Bioplex®, 4) Cito Grower® + Bioplex®, 5) Serenade® + Bioplex®, 6) Bioplex®, 7) Control (-), 8) Bacterias 1-4.



### 2.3.2.4 Frecuencias de hongos en cada tratamiento por tipo de suelo

En el SC, el T1 tuvo un FR= 37.6% en *Fs* y en M1 y *An* 18.8%. Los hongos de menor FR (6.3%) fueron *Fus* y *Afla*. En el T2, el M1 tuvo una FR mayor con 25% seguido de *Ater* con 16.7%. Algunos hongos con FR menor (8.3%) fueron *Ver*, *Fus*, *Fox* y *Cbra*. En el T3, *Pen 2* y M1 tuvieron una FR= 18.8%, y *Pen 1* 12.5%. Algunos hongos con FR menor (6.3%) fueron *Fus* spp., *Fs*, *Fox* y *An*. En el T4, *Fs* tuvo mayor FR con 33.3%, seguido por M1 con 20% y *Afla* con 13.3%. Algunos hongos poco frecuentes (FR=6.7%) fueron *Tri*, *Pen 2*, *Cbra* y *Ater*. En el T5, *Fs* tuvo FR=37.9%, *Pen 1* y M 1 con 20.7%, *Afla* y *Ater* 6.9% y M 2 y *Dip* 3.4%. En el T6, *Fs* tuvo FR= 38%, *Pen 2* 19%, *Ater* 14% y *Pen 1* 10%. Algunos hongos con frecuencia menor (FR= 5%) fueron *Clun* y *Afla*. En el T7, *Fus* y *Ater* tuvieron FR= 18.2% c/u, *Fs* y *Cbra* 13.6%, *Pen 2* 9.1%. Algunos hongos de FR menor (4.5%) fueron M 1, *Alt*, *An* y *Afla*. En el T8, *Fs* tuvo FR= 50% y *Fus* spp. y M 1 tuvieron 9.1% c/u. Algunos hongos con FR menor (4.5%) fueron *Asp* 1 y las cepas de *Pen 1*, 2, 3 y 4 (Tabla 2.6).

**Tabla 2.6.** Frecuencias de hongos por tratamiento en el suelo de uso continuo.

| Trat* | Espécimen                     | FA | FR    | Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
|-------|-------------------------------|----|-------|------|-------------------------------|----|-------|
| 1     | <i>Fusarium solani</i>        | 6  | 0.375 | 5    | <i>Fusarium solani</i>        | 11 | 0.379 |
| 1     | Morfotipo 1                   | 3  | 0.188 | 5    | <i>Penicillium</i> spp. 1     | 6  | 0.207 |
| 1     | <i>Aspergillus niger</i>      | 3  | 0.188 | 5    | Morfotipo 1                   | 6  | 0.207 |
| 1     | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 2  | 0.125 | 5    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 2  | 0.069 |
| 1     | <i>Fusarium</i> spp.          | 1  | 0.063 | 5    | <i>Aspergillus terreus</i>    | 2  | 0.069 |
| 1     | <i>Aspergillus flavus</i>     | 1  | 0.063 | 5    | Morfotipo 2                   | 1  | 0.034 |
|       |                               |    |       | 5    | <i>Diplodia</i> spp.          | 1  | 0.034 |
| Trat  | Espécimen                     | FA | FR    | Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
| 2     | Morfotipo 1                   | 3  | 0.25  | 6    | <i>Fusarium solani</i>        | 8  | 0.380 |
| 2     | <i>Aspergillus terreus</i>    | 2  | 0.167 | 6    | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 4  | 0.190 |
| 2     | <i>Verticillium</i> spp.      | 1  | 0.083 | 6    | <i>Aspergillus terreus</i>    | 3  | 0.140 |
| 2     | <i>Penicillium</i> spp. 3     | 1  | 0.083 | 6    | <i>Penicillium</i> spp. 1     | 2  | 0.100 |
| 2     | <i>Geotrichum</i> spp.        | 1  | 0.083 | 6    | <i>Scolecobasidium</i> spp.   | 1  | 0.050 |
| 2     | <i>Fusarium</i> spp.          | 1  | 0.083 | 6    | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1  | 0.050 |
| 2     | <i>Fusarium oxysporum</i>     | 1  | 0.083 | 6    | <i>Curvularia lunata</i>      | 1  | 0.050 |
| 2     | <i>Diplodia</i> spp.          | 1  | 0.083 | 6    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 1  | 0.050 |
| 2     | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1  | 0.083 |      |                               |    |       |
| Trat  | Espécimen                     | FA | FR    | Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
| 3     | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 3  | 0.188 | 7    | <i>Fusarium</i> spp.          | 4  | 0.182 |

[Continuación Tabla 2.6]

|   |                               |   |       |   |                               |   |       |
|---|-------------------------------|---|-------|---|-------------------------------|---|-------|
| 3 | Morfotipo 1                   | 3 | 0.188 | 7 | <i>Aspergillus terreus</i>    | 4 | 0.182 |
| 3 | <i>Penicillium</i> spp. 1     | 2 | 0.125 | 7 | <i>Fusarium solani</i>        | 3 | 0.136 |
| 3 | <i>Penicillium</i> spp. 4     | 1 | 0.063 | 7 | <i>Curvularia brachyspora</i> | 3 | 0.136 |
| 3 | <i>Fusarium</i> spp.          | 1 | 0.063 | 7 | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 2 | 0.091 |
| 3 | <i>Fusarium solani</i>        | 1 | 0.063 | 7 | Morfotipo 3                   | 1 | 0.045 |
| 3 | <i>Fusarium oxysporum</i>     | 1 | 0.063 | 7 | Morfotipo 1                   | 1 | 0.045 |
| 3 | <i>Diplodia</i> spp.          | 1 | 0.063 | 7 | Desconocido                   | 1 | 0.045 |
| 3 | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1 | 0.063 | 7 | <i>Alternaria alternata</i>   | 1 | 0.045 |
| 3 | <i>Aspergillus niger</i>      | 1 | 0.063 | 7 | <i>Aspergillus niger</i>      | 1 | 0.045 |
| 3 | <i>Aspergillus flavus</i>     | 1 | 0.063 | 7 | <i>Aspergillus flavus</i>     | 1 | 0.045 |

| Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
|------|-------------------------------|----|-------|
| 4    | <i>Fusarium solani</i>        | 5  | 0.333 |
| 4    | Morfotipo 1                   | 3  | 0.2   |
| 4    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 2  | 0.133 |
| 4    | <i>Trichoderma</i> spp.       | 1  | 0.067 |
| 4    | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 1  | 0.067 |
| 4    | <i>Diplodia</i> spp.          | 1  | 0.067 |
| 4    | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1  | 0.067 |
| 4    | <i>Aspergillus terreus</i>    | 1  | 0.067 |

| Trat | Espécimen                  | FA | FR    |
|------|----------------------------|----|-------|
| 8    | <i>Fusarium solani</i>     | 11 | 0.500 |
| 8    | <i>Fusarium</i> spp.       | 2  | 0.091 |
| 8    | Morfotipo 1                | 2  | 0.091 |
| 8    | <i>Aspergillus</i> spp. 1  | 1  | 0.045 |
| 8    | <i>Aspergillus terreus</i> | 1  | 0.045 |
| 8    | Morfotipo 3                | 1  | 0.045 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 1  | 1  | 0.045 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 2  | 1  | 0.045 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 3  | 1  | 0.045 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 4  | 1  | 0.045 |

\*Tratamientos: 1) Kocide 3000® + Bioplex®, 2) Bacterias 1-4 + Bioplex®, 3) Bacteria 5 + Bioplex®, 4) Cito Grower® + Bioplex®, 5) Serenade® + Bioplex®, 6) Bioplex®, 7) Control (-), 8) Bacterias 1-4.

En el T1 de SD, *Fs* tuvo FR más alto con 37.5%, *Alt* 18.8% y *Asp* 1 12.5%. Algunos hongos con baja FR (6.3%) fueron *Clad*, *Clun*, *An* y *Fus*. En el T2, *Pen* 2 y *Fs* tuvieron FR= 21.4% c/u y M 1 y *Afla* 14.3% c/u. Unos de FR menor (7.1%) fueron *Fus* y *Thar*. En el T3, *Fs* tuvo FR=30%, *Thar* y *Afla* tuvieron FR de 20%; los de FR= 10% fueron *Tri*, M 1 y *Clun*. En el T4, *Fs* y *Clun* tuvieron FR= 19.2%, *Pen* 2 15.2%, *Dip*, *Thar* y otros tuvieron FR= 7.7%; *Ver*, *Cbra* y otros tuvieron 3.8%. En el T5, solo se aislaron *An* y *Fus* con FR= 50 c/u. En el T6, *An*, M 1 y otros tuvieron FR= 6.7% c/u, y *Fus.*, *Fus* y otros tuvieron FR= 8.3% c/u. En el T 7, *Fs* tuvo FR= 22.2%, mientras que *Tri*, *Clun* y otros tuvieron 11.1% c/u. En el T8, *Asp* 1 tuvo FR= 25%, *Fs*, *Fus* y *Pen* 2 y otros tuvieron 12.5% c/u (Tabla 2.7).

**Tabla 2.7.** Frecuencias de hongos por tratamiento en el suelo en descanso.

| Trat | Espécimen                   | FA | FR    |
|------|-----------------------------|----|-------|
| 1    | <i>Fusarium solani</i>      | 6  | 0.375 |
| 1    | <i>Alternaria alternata</i> | 3  | 0.188 |
| 1    | <i>Aspergillus</i> spp. 1   | 2  | 0.125 |
| 1    | <i>Cladobotryum</i> spp.    | 1  | 0.063 |
| 1    | <i>Curvularia lunata</i>    | 1  | 0.063 |
| 1    | <i>Aspergillus niger</i>    | 1  | 0.063 |
| 1    | <i>Penicillium</i> spp. 2   | 1  | 0.063 |
| 1    | <i>Fusarium</i> spp.        | 1  | 0.063 |

| Trat | Espécimen                    | FA | FR    |
|------|------------------------------|----|-------|
| 2    | <i>Penicillium</i> spp. 2    | 3  | 0.214 |
| 2    | <i>Fusarium solani</i>       | 3  | 0.214 |
| 2    | Morfotipo 1                  | 2  | 0.143 |
| 2    | <i>Aspergillus flavus</i>    | 2  | 0.143 |
| 2    | <i>Aspergillus</i> spp. 1    | 1  | 0.071 |
| 2    | <i>Fusarium</i> spp.         | 1  | 0.071 |
| 2    | <i>Penicillium</i> spp. 1    | 1  | 0.071 |
| 2    | <i>Trichoderma harzianum</i> | 1  | 0.071 |

| Trat | Espécimen                    | FA | FR    |
|------|------------------------------|----|-------|
| 3    | <i>Fusarium solani</i>       | 3  | 0.300 |
| 3    | <i>Trichoderma harzianum</i> | 2  | 0.200 |
| 3    | <i>Aspergillus flavus</i>    | 2  | 0.200 |
| 3    | <i>Trichoderma</i> spp.      | 1  | 0.100 |
| 3    | Morfotipo 1                  | 1  | 0.100 |
| 3    | <i>Curvularia lunata</i>     | 1  | 0.100 |

| Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
|------|-------------------------------|----|-------|
| 4    | <i>Fusarium solani</i>        | 5  | 0.192 |
| 4    | <i>Curvularia lunata</i>      | 5  | 0.192 |
| 4    | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 4  | 0.154 |
| 4    | <i>Diplodia</i> spp.          | 2  | 0.077 |
| 4    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 2  | 0.077 |
| 4    | <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 2  | 0.077 |
| 4    | <i>Trichoderma harzianum</i>  | 2  | 0.077 |
| 4    | <i>Penicillium</i> spp. 3     | 1  | 0.038 |
| 4    | <i>Penicillium</i> spp. 5     | 1  | 0.038 |
| 4    | <i>Verticillium</i> spp.      | 1  | 0.038 |
| 4    | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1  | 0.038 |

| Trat | Espécimen                | FA | FR    |
|------|--------------------------|----|-------|
| 5    | <i>Aspergillus niger</i> | 2  | 0.500 |
| 5    | <i>Fusarium</i> spp.     | 2  | 0.500 |

| Trat | Espécimen                 | FA | FR    |
|------|---------------------------|----|-------|
| 6    | <i>Aspergillus niger</i>  | 2  | 0.167 |
| 6    | <i>Aspergillus</i> spp. 1 | 2  | 0.167 |
| 6    | <i>Penicillium</i> spp. 2 | 2  | 0.167 |
| 6    | Morfotipo 1               | 2  | 0.167 |
| 6    | <i>Fusarium</i> spp.      | 1  | 0.083 |
| 6    | <i>Fusarium solani</i>    | 1  | 0.083 |
| 6    | <i>Curvularia lunata</i>  | 1  | 0.083 |
| 6    | Morfotipo 2               | 1  | 0.083 |

| Trat | Espécimen                     | FA | FR    |
|------|-------------------------------|----|-------|
| 7    | <i>Fusarium solani</i>        | 2  | 0.222 |
| 7    | <i>Aspergillus niger</i>      | 1  | 0.111 |
| 7    | <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 1  | 0.111 |
| 7    | <i>Curvularia lunata</i>      | 1  | 0.111 |
| 7    | <i>Aspergillus flavus</i>     | 1  | 0.111 |
| 7    | <i>Curvularia brachyspora</i> | 1  | 0.111 |
| 7    | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 1  | 0.111 |
| 7    | <i>Trichoderma harzianum</i>  | 1  | 0.111 |

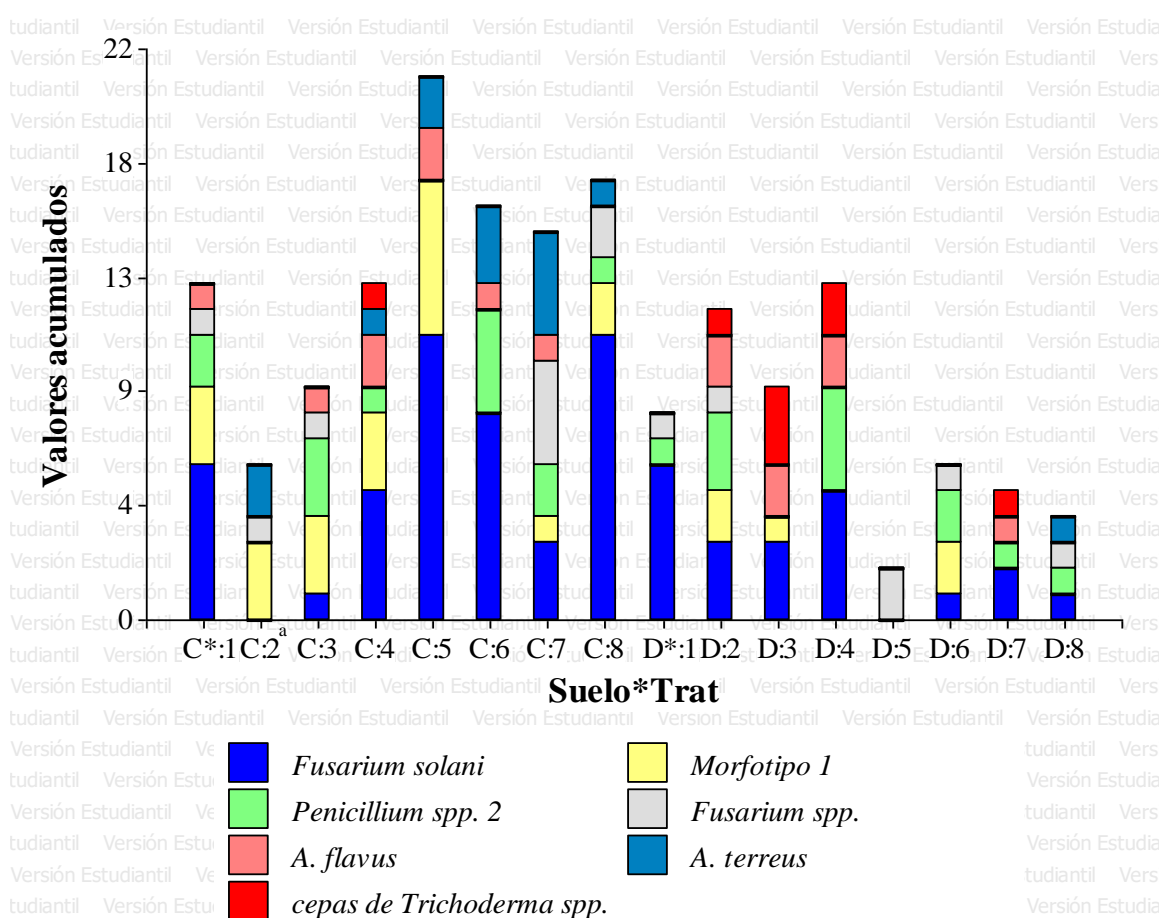
  

| Trat | Espécimen                   | FA | FR    |
|------|-----------------------------|----|-------|
| 8    | <i>Aspergillus</i> spp. 1   | 2  | 0.25  |
| 8    | <i>Scolecobasidium</i> spp. | 1  | 0.125 |
| 8    | <i>Penicillium</i> spp. 2   | 1  | 0.125 |
| 8    | <i>Fusarium</i> spp.        | 1  | 0.125 |
| 8    | <i>Fusarium solani</i>      | 1  | 0.125 |
| 8    | <i>Aspergillus terreus</i>  | 1  | 0.125 |
| 8    | <i>Aspergillus niger</i>    | 1  | 0.125 |

\*Tratamientos: 1) Kocide 3000® + Bioplex®, 2) Bacterias 1-4 + Bioplex®, 3) Bacteria 5 + Bioplex®, 4) Cito Grower® + Bioplex®, 5) Serenade® + Bioplex®, 6) Bioplex®, 7) Control (-), 8) Bacterias 1-4.

*Fs* es un hongo asociado al complejo del mal seco, por eso se discute con mayor detalle a continuación. En el SC, se encontró que *Fs* en 6 de los Ts fue el hongo más frecuente, mientras que en el

SD en 5 de los Ts. *Fs*, *M 1*, *Pen 2*, *Fus*, *Afla* y *Ater* fueron los hongos más frecuentes en la población en general (Tabla 2.1). La FA de c/u de estos hongos por suelo y T mostró mayor frecuencia a *Fs* en SC (45) versus SD (21). *Fs* tuvo la misma FA en T1 (6) en ambos suelos. En el T2, no se detectó en SC, pero sí en SD (FA=3). En el T3, es menor en SC (FA= 1) que en SD (FA=3). En el T4 es igual en ambos suelos (FA=5). En el T5, no apareció en SD, pero sí en SC (FA= 11). En el T6, fue significativamente mayor en SC (FA= 8) que en SD (FA= 1). En el T7, fue un poco más alto en SC (FA= 4) que en SD (FA= 2). En el T8, fue significativamente mayor en SC (FA= 11) que en SD (FA= 1) (Tabla 2.6-2.7; Figura 2.31).



\*C= Suelo de uso continuo; D= Suelo en descanso

\*Tratamientos: 1) Kocide 3000® + Bioplex®, 2) Bacterias 1-4 + Bioplex®, 3) Bacteria 5 + Bioplex®, 4) Cito Grower® + Bioplex®, 5) Serenade® + Bioplex®, 6) Bioplex®, 7) Control (-), 8) Bacterias 1-4.

**Figura 2.31.** Hongos más frecuentes de los dos manejos de suelo (SC y SD) y tratamientos en siembra de yautía Nazareno.

Similarmente, M1 fue más frecuente en SC (FA= 21) que en SD (FA= 5). Por otro lado, a los hongos más conocidos por su beneficio en las plantas y control biológico, las cepas de *Trichoderma* spp. (cuando se incluyen las dos cepas), fueron más frecuentes en SD que en SC. Lo notamos en el T2 (FA=1), T3 (FA=3), T4 (FA=2) y T7 (FA=1) con un total de FA= 7, mientras que en SC aparece solo una vez en T4 (Tabla 2.6, 2.7 y Fig. 2.31).

### 2.3.2.5 Frecuencia de hongos aislados de muestras de suelo y raíces

*Fs* fue el hongo más frecuente en las muestras. En muestras de suelo de SC, *Fs* tuvo FR= 30.2%, seguido por M1 con FR= 17.2% y *Pen 2* con FR= 11.2%. Algunos que tuvieron frecuencia más baja (FR= 0.9%) fueron *Fox*, *An*, *Tric* y *Scol*. En muestras de raíces, *Fs* tuvo FR= 27, seguido por *Cbra* (FR= 18.9%) y *An* (10.8%). Algunos de menor frecuencia (FR= 2.7%) fueron *Fox*, *Asp 1* y *Alt* (Tabla 2.8).

**Tabla 2.8.** Frecuencia de hongos en muestras de suelo y raíces en suelo de uso continuo

| Origen         | Espécimen                   | FA | FR    | Origen         | Especimen                     | FA | FR    |
|----------------|-----------------------------|----|-------|----------------|-------------------------------|----|-------|
| S <sup>a</sup> | <i>Fusarium solani</i>      | 35 | 0.302 | R <sup>b</sup> | <i>Fusarium solani</i>        | 10 | 0.270 |
| S              | Morfotipo 1                 | 20 | 0.172 | R              | <i>Curvularia brachyspora</i> | 7  | 0.189 |
| S              | <i>Penicillium</i> spp. 2   | 13 | 0.112 | R              | <i>Aspergillus niger</i>      | 4  | 0.108 |
| S              | <i>Penicillium</i> spp. 1   | 11 | 0.095 | R              | <i>Diplodia</i> spp.          | 4  | 0.108 |
| S              | <i>Aspergillus terreus</i>  | 11 | 0.095 | R              | <i>Fusarium</i> spp.          | 3  | 0.081 |
| S              | <i>Aspergillus flavus</i>   | 8  | 0.069 | R              | <i>Aspergillus terreus</i>    | 2  | 0.054 |
| S              | <i>Fusarium</i> spp.        | 6  | 0.052 | R              | <i>Penicillium</i> spp. 4     | 2  | 0.054 |
| S              | <i>Penicillium</i> spp. 3   | 2  | 0.017 | R              | <i>Fusarium oxysporum</i>     | 1  | 0.027 |
| S              | Morfotipo 3                 | 2  | 0.017 | R              | <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 1  | 0.027 |
| S              | <i>Fusarium oxysporum</i>   | 1  | 0.009 | R              | <i>Curvularia lunata</i>      | 1  | 0.027 |
| S              | <i>Aspergillus niger</i>    | 1  | 0.009 | R              | <i>Alternaria alternata</i>   | 1  | 0.027 |
| S              | <i>Geotrichum</i> spp.      | 1  | 0.009 | R              | Morfotipo 1                   | 1  | 0.027 |
| S              | Morfotipo 2                 | 1  | 0.009 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Verticillium</i> spp.    | 1  | 0.009 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Trichoderma</i> spp.     | 1  | 0.009 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Scolecobasidium</i> spp. | 1  | 0.009 |                |                               |    |       |
| S              | Desconocido                 | 1  | 0.009 |                |                               |    |       |

<sup>a</sup> S= muestra de suelo

<sup>b</sup> R= muestra de raíces

En muestras de suelo de SD, *Fs* fue el de mayor ocurrencia (FR= 27.9), seguido por *Pen 2* (FR=14.7%), *Asp 1* (FR= 13.2%). Algunos de menor frecuencia (FR= 1.5%) fueron *Clad*, *Pen 1*, *Ver* y *Tri*. Las muestras de raíces de SD fueron las únicas con *Fs* más bajo (FR= 29%), seguido por *An* (FR= 22.7%) y *Alt* (9.7%). Algunos con FR= 6.5% fueron *Thar*, *Pen 2* y de FR= 3.2% fueron *Asp 1* y *Fus* (Tabla 2.9).

**Tabla 2.9.** Frecuencia de hongos en muestras de suelo y raíces en suelo en descanso

| Origen         | Espécimen                    | FA | FR    | Origen         | Espécimen                     | FA | FR    |
|----------------|------------------------------|----|-------|----------------|-------------------------------|----|-------|
| S <sup>a</sup> | <i>Fusarium solani</i>       | 19 | 0.279 | R <sup>b</sup> | <i>Curvularia lunata</i>      | 9  | 0.29  |
| S              | <i>Penicillium</i> spp. 2    | 10 | 0.147 | R              | <i>Aspergillus niger</i>      | 7  | 0.226 |
| S              | <i>Aspergillus</i> spp. 1    | 9  | 0.132 | R              | <i>Alternaria alternata</i>   | 3  | 0.097 |
| S              | <i>Aspergillus flavus</i>    | 7  | 0.103 | R              | <i>Curvularia brachyspora</i> | 2  | 0.065 |
| S              | Morfotipo 1                  | 5  | 0.074 | R              | <i>Diplodia</i> spp.          | 2  | 0.065 |
| S              | <i>Fusarium</i> spp.         | 5  | 0.074 | R              | <i>Trichoderma harzianum</i>  | 2  | 0.065 |
| S              | <i>Trichoderma harzianum</i> | 4  | 0.059 | R              | <i>Penicillium</i> spp. 2     | 2  | 0.065 |
| S              | <i>Cladobotryum</i> spp.     | 1  | 0.015 | R              | <i>Fusarium solani</i>        | 2  | 0.065 |
| S              | Morfotipo 2                  | 1  | 0.015 | R              | <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 1  | 0.032 |
| S              | <i>Penicillium</i> spp. 1    | 1  | 0.015 | R              | <i>Fusarium</i> spp.          | 1  | 0.032 |
| S              | <i>Penicillium</i> spp. 3    | 1  | 0.015 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Aspergillus terreus</i>   | 1  | 0.015 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Penicillium</i> spp. 5    | 1  | 0.015 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Verticillium</i> spp.     | 1  | 0.015 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Scolecobasidium</i> spp.  | 1  | 0.015 |                |                               |    |       |
| S              | <i>Trichoderma</i> spp.      | 1  | 0.015 |                |                               |    |       |

<sup>a</sup>S= muestra de suelo  
<sup>b</sup>R= muestra de raíces

### 2.3.3 Prueba de patogenicidad in vivo con *mini-sets*

La variable de peso de raíces no tuvo diferencias significativas entre los Ts según el estadístico p-valor (valor-p=0.0562). La variable de cantidad de raíces tuvo diferencias significativas (valor-p=0.0190). El peso de raíces tuvo un CV = 43.56 y R<sup>2</sup> = 0.43; y la cantidad de raíces tuvo un CV = 41.63 y R<sup>2</sup> = 0.46 (Tabla 2.10).

**Tabla 2.10.** Análisis de varianza para variables medidas en la prueba de patogenicidad in vivo con *mini-sets* de yautía Nazareno.

| Variable           | Trat*  | CV    | R <sup>2</sup> | SW <sup>a</sup> |
|--------------------|--------|-------|----------------|-----------------|
| Peso de raíces     | 0.0562 | 43.56 | 0.43           | 0.1091          |
| Cantidad de raíces | 0.0190 | 41.63 | 0.46           | 0.0811          |

\*Valores p para fuente de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

<sup>a</sup>Valores p para pruebas de Shapiro-Wilks. Si valor-p > 0.05, hay normalidad de residuos.

En el peso de raíces para la prueba Tukey ( $\alpha=0.05$ ), *Sclerotium rolfsii* (*Sr*), con media de 0.0g, es significativamente diferente al peso de raíces de *Afla* (4.82g), M3 (4.82g) y *Fusarium solani* cepa 2 (*Fs 2*=5.20g). Los demás hongos no tuvieron diferencias significativas entre sí (DMS= 4.73763). En cantidad de raíces, *Sr* tuvo 0.0 raíces y fue significativamente menor a *Tri* (23g), *Fs 2* (23g), *Pen 5* (23.67g) y *Dip* (27.33g). Los demás hongos no tuvieron medias significativamente entre sí (DMS= 20.84889) (Tabla 2.11).

**Tabla 2.11.** Peso y cantidad de raíces en las pruebas de patogenicidad con *mini-sets* de yautía Nazareno sembradas bajo condiciones de invernadero

| Tratamiento                   | Peso de raíces (g) | Cantidad de raíces |
|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| <i>Alternaria alternata</i>   | 2.5 ab*            | 12.67 ab*          |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | 4.82 b             | 12 ab              |
| <i>Aspergillus niger</i>      | 3.49 ab            | 18.67 ab           |
| <i>Aspergillus terreus</i>    | 4.37 ab            | 19 ab              |
| <i>Aspergillus</i> spp. 1     | 2.38 ab            | 15.67 ab           |
| <i>Cladobotryum</i> spp.      | 3.03 ab            | 16 ab              |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | 2.23 ab            | 11.67 ab           |
| <i>Curvularia lunata</i>      | 4.18 ab            | 11.33 ab           |
| Desconocido                   | 2.7 ab             | 15.67 ab           |
| <i>Diplodia</i> spp.          | 4.26 ab            | 27.33 b            |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | 3.86 ab            | 15.33 ab           |
| <i>Fusarium solani</i> 1      | 2.49 ab            | 14 ab              |
| <i>Fusarium solani</i> 2      | 5.2 b              | 23 b               |
| <i>Fusarium</i> spp.          | 2.15 ab            | 10 ab              |
| <i>Geotrichum</i> spp.        | 3.29 ab            | 17.33 ab           |
| Morfotipo 1                   | 4.45 ab            | 20 ab              |
| Morfotipo 2                   | 2.81 ab            | 10.67 ab           |
| Morfotipo 3                   | 4.82 b             | 16.33 ab           |
| <i>Penicillium</i> spp. 1     | 2.14 ab            | 10 ab              |
| <i>Penicillium</i> spp. 2     | 3.79 ab            | 12.67 ab           |
| <i>Penicillium</i> spp. 3     | 4.11 ab            | 18 ab              |
| <i>Penicillium</i> spp. 4     | 3.86 ab            | 14 ab              |
| <i>Penicillium</i> spp. 5     | 3.74 ab            | 23.67 b            |
| <i>Pythium</i> spp.           | 3.73 ab            | 14.67 ab           |
| <i>Rhizoctonia solani</i>     | 3.66 ab            | 14 ab              |
| <i>Sclerotium rolfsii</i>     | 0 a                | 0 a                |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.   | 3.61 ab            | 16 ab              |
| <i>Trichoderma harzianum</i>  | 4.36 ab            | 20 ab              |
| <i>Trichoderma</i> spp.       | 4.63 ab            | 23 b               |
| <i>Verticillium</i> spp.      | 2.92 ab            | 18.67 ab           |
| Control                       | 2.73 ab            | 15.5 ab            |
|                               | DMS=4.73763*       | DMS=20.84889*      |

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

Otra variable que se observó informalmente fue la pudrición de los *mini-sets*. Se observó bastante pudrición en el tejido por los hongos, pero ninguno se comparaba con los *mini-sets* de *Sr* donde se llegaba a deshacer la pulpa por completo. *Sr* causó pudrición severa a los *mini-sets* evitando que brotara la yema axilar y surgieran raíces e hizo que crecieran estructuras de resistencia (esclerocios) en las mismas.

### 2.3.4 Pruebas de patogenicidad en discos de cormos

Las pruebas en discos fueron más efectivas que las pruebas con los *mini-sets* en evidenciar la patogenicidad de los hongos aislados. Se midieron las lesiones inducidas por los hongos en la pulpa (tejido expuesto). El tamaño de la lesión fue significativamente diferente entre las cepas de hongos (valor- $p=0.0001$ ) con un  $CV=24.98$  y un  $R^2=0.95$  (Tabla 2.12).

**Tabla 2.12** Análisis de varianza para la variable lesión de las pruebas de patogenicidad in vitro con discos de corno de yautía Nazareno.

| Variable    | Trat*   | CV    | R <sup>2</sup> | SW <sup>a</sup> |
|-------------|---------|-------|----------------|-----------------|
| Lesión (cm) | <0.0001 | 24.98 | 0.95           | 0.1296          |

\*Valor p para fuente de variación. Si valor- $p > 0.05$ , no hay diferencias significativas

<sup>a</sup>Valor p para prueba de Shapiro-Wilks. Si valor- $p > 0.05$ , hay normalidad de residuos.

Se obtuvieron medias de 0 mm a 90 mm. Después del control - (0.0 mm), *Clad* (8.33mm) tuvo la media más baja, mientras que *Sr* (90.0mm) tuvo la media más alta. Se observaron las medias de menor a mayor en la prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ; DMS= 6.44346) (Tabla 2.13). El grupo de hongos desde *Clad* a *Pen 4*, con lesiones desde 8.33mm a 9.50mm, tuvieron lesiones significativamente más bajas que el grupo de *Fus* a *Sr*, con lesiones de 16mm a 90mm. *Scol*, con lesión promedio de 16mm, fue significativamente menor al grupo de *Rs* a *Sr*, con lesiones de 16.17mm a 90mm. *Pen 5*, con lesión promedio de 9.83mm, fue significativamente menor al grupo de *Pen 2* a *Sr*, con lesiones de 16.33mm a 90mm. *Pen 1*, con lesión promedio de 10mm, fue significativamente diferente al grupo de *Des* a *Sr*, con lesiones desde 16.75mm a 90mm. *Cbra* y *M3*, con lesiones de 11mm, tuvieron lesiones con tamaño significativamente menor al grupo que va desde *Afla* hasta *Sr*, con lesiones desde 17.50mm a 90mm. El grupo de *Py* hasta *Dip*, con lesiones desde 11.17mm a 14.17mm, tuvieron lesiones significativamente menores al grupo que va de *An* a *Sr*, con



lesiones de 20.83mm a 90mm. El grupo de *Fox* hasta *An*, con lesiones desde 14.50mm a 20.83mm, fueron significativamente menores al grupo que va desde *Fs1* a *Sr*, con lesiones desde 27.67mm a 90mm. *Fs1* y *Fs 2*, con lesiones de 27.67mm y 30.50mm, respectivamente, fueron significativamente diferentes a *Sr*, que contiene el promedio de lesión más alto, 90mm. Éste es significativamente mayor a las lesiones promedio de todos los demás hongos.

**Tabla 2.13.** Tamaño de lesión provocada por los hongos en discos de cormo.

| Espécimen                     | Abreviatura  | Lesión (mm) |         |
|-------------------------------|--------------|-------------|---------|
| Control                       | Control      | 0.00        | a*      |
| <i>Cladobotryum</i> spp.      | <i>Clad</i>  | 8.33        | b       |
| <i>Aspergillus terreus</i>    | <i>Ater</i>  | 8.50        | b       |
| <i>Trichoderma harzianum</i>  | <i>Thar</i>  | 8.83        | b       |
| <i>Penicillium</i> spp. 3     | <i>Pen 3</i> | 9.17        | b       |
| Morfotipo 1                   | M1           | 9.33        | b       |
| <i>Penicillium</i> spp. 4     | <i>Pen 4</i> | 9.50        | b       |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.   | <i>Scol</i>  | 9.67        | bc      |
| <i>Penicillium</i> spp. 5     | <i>Pen 5</i> | 9.83        | bcd     |
| <i>Penicillium</i> spp. 1     | <i>Pen 1</i> | 10.00       | bcde    |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | <i>Cbra</i>  | 11.00       | bcdef   |
| Morfotipo 3                   | M3           | 11.00       | bcdef   |
| <i>Pythium</i> spp.           | <i>Py</i>    | 11.17       | bcdefg  |
| Morfotipo 2                   | M2           | 11.17       | bcdefg  |
| <i>Curvularia lunata</i>      | <i>Clum</i>  | 11.33       | bcdefg  |
| <i>Verticillium</i> spp.      | <i>Ver</i>   | 12.33       | bcdefg  |
| <i>Aspergillus</i> spp. 1     | <i>Asp 1</i> | 13.33       | bcdefg  |
| <i>Trichoderma</i> spp.       | <i>Tri</i>   | 13.83       | bcdefg  |
| <i>Geotrichum</i> spp.        | <i>Geo</i>   | 13.83       | bcdefg  |
| <i>Diplodia</i> spp.          | <i>Dip</i>   | 14.17       | bcdefg  |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | <i>Fox</i>   | 14.50       | bcdefgh |
| <i>Fusarium</i> spp.          | <i>Fus</i>   | 16.00       | cdefgh  |
| <i>Rhizoctonia solani</i>     | <i>Rs</i>    | 16.17       | defgh   |
| <i>Penicillium</i> spp. 2     | <i>Pen 2</i> | 16.33       | efgh    |
| Desconocido                   | <i>Des</i>   | 16.75       | fgh     |
| <i>Alternaria alternata</i>   | <i>Alt</i>   | 17.33       | fgh     |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | <i>Afla</i>  | 17.50       | gh      |
| <i>Aspergillus niger</i>      | <i>An</i>    | 20.83       | h       |
| <i>Fusarium solani</i> cepa 1 | <i>Fs 1</i>  | 27.67       | i       |
| <i>Fusarium solani</i> cepa 2 | <i>Fs 2</i>  | 30.50       | i       |
| <i>Sclerotium rolfsii</i>     | <i>Sr</i>    | 90.00       | j       |

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ ).

DMS= 6.44346

## 2.4 DISCUSIÓN

### 2.4.1 Importancia agrícola y/o médica de hongos en la población

Se encontró una alta diversidad de hongos en las muestras de raíces y suelo de los dos tipos de suelo donde se encontraban sembradas las yautías Nazareno. Se encontró una variedad de *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., y *Fusarium* spp. de morfologías diferentes. La identificación por género de los morfotipos no fue posible por caracterización morfológica ya que no se pudieron encontrar estructuras completas. Se intentó crecer en diferentes medios como WA, en pedazos de zanahoria y clavel y medio V8, los cuales dieron estructuras microscópicas similares que en PDA. El M1 tiene esporas de un ascomiceto, cuerpos fructíferos como cleistotecios, pero no se pudieron ver ascas, para deducir de que género se trataba. El M2 es muy parecido a *Scopulariopsis* spp. por los conidióforos erectos o ramificados. Además, se encontraron peritecios lo cual dan indicación de que se formó la fase sexual que es *Microascus* spp. Del mismo salen cantidad de esporas que eran como ascosporas inmaduras y conidias. *Microascus* spp. se ha encontrado en el suelo y en granos y es uno de los mohos ascomicetógenos más comunes y cosmopolitas. *M. cinereus* es poco común encontrarlo como patógeno de humanos o animales, pero un informe reportó el primer caso de absceso cerebral provocado por este organismo (Baddley et al, 2000). El mismo autor citó otras enfermedades asociadas a *Microascus* spp. las cuales están más vinculadas a pacientes inmunocomprometidos. El anamorfo, *Scopulariopsis* spp., ha estado asociado a infecciones superficiales de tejido con queratina como son las uñas, donde provocan onicomicosis (Macura y Skóra, 2015). Por lo tanto, la cepa recolectada tiene potencial como patógeno de humanos. El M3 es bastante parecido a *Nectria ralfsii* debido a sus esporas que, a la luz del microscopio, se asemejan a ascosporas por tener dos puntos dentro de la célula, indicativo de dos núcleos. *Nectria* spp. es un hongo ascomiceto con muchas especies alrededor del mundo. *Nectria fuckerliana* causa canchros en troncos de pinos en plantaciones comerciales de Chile y Nueva Zelanda. La enfermedad es transmitida en la poda y los síntomas son descortezamiento

del tronco, adelgazamiento del tallo, depresiones y canchales. Además, limita desarrollo de nudos para promover el crecimiento de madera de alta calidad (Hopkins et al, 2012). El hongo desconocido, no desarrolló las estructuras. Se creció en los medios mencionados anteriormente y medio de maíz (CMA), pero no dieron resultado. *Penicillium* spp. ha sido altamente estudiado ya que es uno de los hongos mitospóricos más comunes que pudren alimentos frescos y elaborados. Se encuentran en todo tipo de suelo, vegetación en descomposición, aire y como contaminantes en varios compuestos (Kung'u, 2016). *Aspergillus* spp., de la misma forma, se encuentra en el suelo y aire y puede provocar varias enfermedades en personas inmunocomprometidas como son aspergilosis y aspergilosis de pulmonía crónica (CPA) (Aspergillus & Aspergillosis Website). *A. flavus* afecta muchos cultivos como maíz, algodón, maní, nueces, arroz y especias especialmente en climas calientes. Es de importancia económica y a la salud porque produce micotoxinas (Mellon et al, 2007). Las aflatoxinas producidas por *A. flavus* son carcinógenas y han sido asociadas al bajo peso, cambios en el sistema inmunológico y retraso del crecimiento en niños de África Occidental (Okwu et al, 2011). *A. terreus* ha sido utilizado en biorremediación para degradar endosulfan en suelo contaminados, el cual fue más efectivo que *Cladosporium oxysporum* según Mukherja y Mittal (2005). No hay reportes que digan que afecta algún cultivo específico. *A. niger* afecta una variedad de cultivos como cebolla, café, maíz, maní y uvas. Es el responsable de la pudrición de muchos vegetales y frutas en el periodo antes y después de cosecha (Palencia et al, 2014). *Geotrichum* spp. tiene importancia en el área médica. *G. candidum* es un hongo común que se encuentra en el suelo, aire, agua, leche, plantas y tracto digestivo de animales y humanos. Está muy implicado en enfermedades pulmonares y también en infecciones orales, cutáneas, vaginales y gastrointestinales (Ellis, 2016). *Scolecobasidium* spp. incluye especies que descomponen materia orgánica del suelo. En un estudio se encontró que *S. humicola* es endófito de raíces de tomate y utilizándolo como tratamiento se descubrió que ayuda a aumentar la biomasa de plantas de tomate con fuentes orgánicas de nitrógeno (Mahmoud y Narisawa, 2013). *Diplodia* spp. es un hongo que provoca canchales y tizón en los brotes de los pinos en bosques de coníferas de América del Norte, canchales y muerte regresiva en viñedos de California, y, también, canchales, gomosis, muerte regresiva y tizón

de los brotes en árboles de manzana en Irán (Munk y Stanosz, 2009; Úrbez-Torres et al, 2008; Abdollanzadeh, 2015). *Verticillium* spp. causa marchitez de las plantas de algodón y ha causado pérdidas en un área de más de 200 millones de hectáreas cada año en China (Cai et al, 2009). *Cladobotryum* spp. causa la enfermedad de la “telaraña” en *Agaricus bisporus*, las setas comestibles más mercadeables mundialmente (Back et al, 2010). No hace falta hablar mucho de los beneficios que trae *Trichoderma* spp. a las plantas en el combate de hongos fitopatógenos. Sin embargo, hay que recordar que la asociación de *Trichoderma* spp. a las raíces de las plantas induce a que éstas produzcan enzimas como quitinasas y glucanasas, las cuales están relacionadas con la reducción de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Guzmán-Valle et al, 2014). *Curvularia lunata* provoca manchas en las hojas del maíz y es el patógeno del cultivo más distribuido en China (Liu et al, 2014). En un estudio, se encontró que *C. brachyspora* es un buen degradador de la queratina en las plumas. En la industria avícola las plumas se convierten en desechos que contaminan el ambiente y, por eso, es importante estudiar microorganismos que ayuden a degradarlas (Rodrigues Marcondes et al, 2008). *Fusarium oxysporum* es un hongo que afecta el tejido vascular de más de 100 especies de plantas, incluyendo cultivos de importancia económica. El hongo está dividido en grupos específicos según los huéspedes que atacan y están subdivididos en razas de acuerdo con la susceptibilidad de cultivares específicos. La especie de *F. oxysporum* que afecta el guineo es *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Hay tres razas reconocidas por causar enfermedad en diferentes cultivares de guineo. La raza 1 afecta Gros Michel, Pome y Silk, la raza 2 afecta Bluggoe y otros guineos de cocinar y la raza 4 afecta los Cavendish, los cuales forman hasta 80% de las exportaciones mundiales; además afecta los guineos que afectan la raza 1 y 2 (Sutherland et al, 2013). Los restantes hongos que hay en la población que se estudiaron son *F. solani*, *S. rolfsii*, *Pythium* spp. y *Rhizoctonia solani*, los cuales se discutirán más adelante porque están asociados a la patogénesis del mal seco en el cultivo de la yautía.

## 2.4.2 Frecuencia de hongos

En las muestras de raíces y suelo, *Fusarium solani* fue el hongo más frecuente y es uno de los hongos que compone el complejo del mal seco en Puerto Rico. No se consiguió aislar en las muestras de raíces y suelo los otros hongos asociados con la enfermedad del mal seco tal como *Sclerotium rolsfii*, *Pythium spp.* y *Rhizoctonia solani*. El suelo en descanso o en barbecho contiene una diversidad de microorganismos que pueden afectar la población de los microorganismos patógenos que hay en el suelo mientras que el SC hay menos diversidad de microorganismos y más población de los patógenos. Cuando se siembra yautía en un mismo lugar una segunda vez, se puede ver como los rendimientos disminuyen drásticamente y las plantas tienen síntomas de la enfermedad del mal seco (Bosques, 1990). Sin embargo, el efecto de SD no disminuyó tanto la frecuencia de *F. solani*. Los podemos ver también en los Ts. El hidróxido de cobre (CuOH) (T1) tiene una concentración de *F. solani* (FA=6) mayor que el control (T7 FA=4), la citoquinina (T4 FA=5) y la bacteria #5 (T3 FA=1), que todos fueron suplementados con Bioplex®. Además, el T1 del SC tiene la misma FA que el SD. El CuOH del producto usado (Kocide 3000®) es un fungicida utilizado para la fusariosis de la espiga en trigo (Du Pont, 2009). Por un lado, también disminuyó, al parecer, el efecto del Bioplex® al ser aplicado en conjunto con CuOH. Un estudio en Algeria donde muestrearon suelos para observar la frecuencia de hongos en suelos contaminados y no contaminados con fungicidas, encontraron una reducción significativa de hongos beneficiosos como *Trichoderma spp.* en suelos contaminados. Además, encontraron como el crecimiento de *Fusarium spp.* fue estimulado en el suelo contaminado (Bordjiba et al, 2001). Esto puede explicar por qué el T1 obtuvo mayor frecuencia de *F. solani* y no hubo presencia de *Trichoderma spp.* en el SD siendo, además, enmendado con Bioplex®, producto con *Trichoderma spp.* y otros microorganismos beneficiosos. Sin embargo, esto no da explicación de porqué las bacterias de T8 no fueron efectivas en disminuir *F. solani* (FA=12) y *Fusarium spp.* (FA=3) en SC. El T5 con la bacteria *Bacillus subtilis* (Serenade®) tiene la misma frecuencia de *F. solani* que T8 en SC. Observando todo en detalle no se puede comparar entre Ts y manejo de suelo ya que en los mismos

controles se observa que la frecuencia de *F. solani* fue más baja que la mayoría de los Ts. Es imperativo, entonces, sacar algunos Ts para probar en ensayos más controlados su efectividad.

Por otro lado, hubo una gama extensa de hongos que serán evaluados en posteriores estudios. También hay variables que se pueden comparar con experimentos anteriores con yautía. En experimentos previos con yautía realizados en la Estación Experimental Agrícola (EEA) de Isabela, PR, de donde se obtuvieron el SC y SD, se ha hallado hongos parecidos a los informados en este experimento. Plaza Delestre (1994) y Bejarano Mendoza (1996) han encontrado a *F. solani*, *R. solani*, *Pythium* spp. y *M. phaseolina* en los terrenos de Isabela donde se siembra yautía. El primer autor (Plaza Delestre, 1994) halló los siguientes hongos en raíces infectadas con mal seco que también fueron descubiertos en esta investigación: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *F. solani*, *Penicillium* spp. y *Trichoderma* spp. En las muestras de raíces del SC, se encontró que *F. solani* era más abundante (27%), mientras que en el catastro de raíces de Plaza Delestre *R. solani* fue el más abundante (43.2%) en terrenos de Isabela. Bejarano Mendoza (1996) obtuvo mayores cifras de *Macrophomina phaseolina* (74.9%) y *F. solani* fue el tercero más abundante (11.6%) aunque significativamente menor en la población. Este autor muestreo los suelos en tres épocas: Prebarbecho, barbecho y postbarbecho. En la época prebarbecho, la parcela afectada es comparable con los hongos obtenidos en SC para este estudio. El autor descubrió que *Penicillium* spp. (59.9%) y *F. solani* (46.6%) tenían una frecuencia alta comparado con *F. solani* y *Penicillium* spp. 2 que tuvieron frecuencias altas en este estudio. La época barbecho y post barbecho es comparable con el SD. Él obtuvo a *F. solani* (36.6%) con mayor frecuencia que *R. solani* (13.3%). El SD tuvo una frecuencia menor de *F. solani*, técnicamente, que el mencionado estudio. En comparación con este estudio, Bejarano Mendoza encontró *F. solani* y *F. oxysporum*, pero, además, encontró *M. phaseolina* y *Colletotrichum dematium*, hongos también informados por Plaza Delestre. Wokocha y Aduo (2011) aislaron hongos de raíces y suelo de plantas con síntomas de mal seco en tres localidades de Nigeria. En muestras de raíces aislaron siempre a *F. solani* y a *Pythium myriotylum*. En muestras de suelo fueron más frecuentes *S. rolfsii* y *Trichoderma harzianum*.

### 2.4.3 Pruebas de patogenicidad en *mini-sets* bajo condiciones de invernadero

Los ensayos de prueba de patogenicidad con *mini-sets* sembradas bajo condiciones de invernadero fueron erráticos y poco efectivos. Se notaron las diferencias significativas en el peso y cantidad de raíces especialmente con *Sr*. Sin embargo, vemos que hay discrepancias con el Control que tuvo un peso de raíces menor que *F. solani* 2 y *F. oxysporum*. Por otro lado, la patogenicidad de *Pythium* spp. y *R. solani* fue poco notable. Esto, posiblemente se debe a que las cepas perdieron virulencia al ser preservados.

En estas pruebas *S. rolfsii* fue el patógeno más agresivo en hacerle daño al tejido de la yautía. Bejarano Mendoza (1998) realizó pruebas de patogenicidad con los hongos asociados al mal seco en Puerto Rico y comprobó que *S. rolfsii* era el agente más agresivo de todos. *S. rolfsii* afectó los brotes, diámetro de raíces y altura de plantas más que *R. solani*, *F. solani* y *Pythium* spp. en yautía cv Amarilla del País sembrada bajo condiciones de invernadero. Contrario a los estudios mencionados en Puerto Rico, en un estudio en Nigeria probaron a *F. solani*, *S. rolfsii*, *R. solani* y *P. myriotylum* en plantas de yautía sembradas en invernadero y en sus resultados salió que este último fue el más virulento (Wokocha y Aduo, 2011).

### 2.4.4 Pruebas de patogenicidad en discos de cormos *in vitro*

En esta prueba se pudo observar de forma más precisa el daño de los hongos aislados de las muestras de suelo y raíces. *A. niger*, las dos cepas de *F. solani* y *S. rolfsii* fueron los más virulentos; este último mucho más que los demás. *A. niger* se convierte en un hongo asociado a la pudrición de cormos por su capacidad de daño en el tejido, aunque sigue siendo un saprofito facultativo. Por otro lado, *Pythium* spp. y *R. solani* no provocaron suficiente daño en comparación con los mencionados. Observando la Tabla 2.13 podemos inferir que los hongos que provocaron lesiones de 8.33mm a 11mm son saprofitos oportunistas, al menos eso se puede decir de las cepas de *Penicillium* spp, *T. harzianum* y *A. terreus*.

## 2.5 CONCLUSIÓN

En este experimento se pudo aislar, identificar y determinar la virulencia de los hongos aislados de raíces y suelo asociado a plantas de yautía sel. Nazareno. De los hongos asociados al mal seco, de investigaciones previas, se encontró a *F. solani* como el más abundante en la mayoría de las muestras. Se pudo determinar la patogenicidad de los hongos obtenidos usando diferentes métodos tanto in vivo como in vitro. Se observó que *S. rolfsii*, *Fusarium solani* 1 y 2 y *A. niger* fueron los más virulentos.

## 2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, M. L., M. Zapata, A. Bosques**, 2015. Identificación y patogenicidad de hongos asociados a pudrición en yautía variedad Nazareno (*Xanthosoma* spp.). Memorias Reunión Científica Anual SOPCA. Sociedad Puertorriqueña de Ciencias Agrícolas, Coamo, Puerto Rico, p. 51.
- Abdollahzadeh, J.**, 2015. *Diplodia bulgarica*, as a new pathogen and potential threat to the apple industry in iran. *Phytopathologia Mediterranea* 54(1): 128-132.
- Aspergillus and Aspergillosis Website**, 2012. What is *Aspergillus* and aspergillosis? Retrived from <http://www.aspergillus.org.uk/what-is-asp>
- Back, C., Y. Kim, W. Jo, H. Chung, & H. Jung**, 2010. Cobweb disease on *Agaricus bisporus* caused by *Cladobotryum mycophilum* in Korea. *Journal of General Plant Pathology*: 76(3): 232-235.
- Baddley, J.W., S.A. Moser, D.A. Sutton, and P.G. Pappas**, 2000. *Microascus cinereus* (Anamorph *Scopulariopsis*) Brain Abscess in a Bone Marrow Transplant Recipient. *J. of Clinical Microbiology* 38(1): 395-397.
- Barnett, H. L., and B.B. Hunter**, 1987. *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. Macmillan Publishing Company: United States, 233 pp.
- Beale, A.**, 1992. Técnicas de Producción de Yautía (*Xanthosomas* spp.). Instituto Superior de Agricultura: Tenares, Salcedo, República Dominicana, pp. 14-16.
- Bejarano Mendoza, C.A.**, 1996. Microflora asociada a las raíces, rizoplano y rizósfera de variedades de yautía (*Xanthosoma* spp.) afectadas por la enfermedad del mal seco: identificación, función y control. Tesis MS, Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico, 148 pp.



- Bejarano-Mendoza, C.A., M. Zapata, A. Bosques, E. Rivera-Amador y L.J. Liu,** 1998. *Sclerotium rolfii* como componente del complejo patológico causante del mal seco de la yautía (*Xanthosoma sagittifolium*) en Puerto Rico. J. Agric. Univ. PR 82 (1-2): 85-95.
- Bosques, A.,** 1990. Effect of continuous planting of tanager (*Xanthosomas* spp.) at the same side for two successive years. Caribbean Food Crop Society 434-440.
- Bosques, A.,** 2016. Comunicación personal sobre los brotes de los cormos. No publicado.
- Cai, Y., H. Xiaohong, J. Mo, Q. Sun, J. Yang, & J. Liu,** 2009. Molecular research and genetic engineering of resistance to *Verticillium* wilt in cotton: A review. African Journal of Biotechnology 8(25): 7363-7372.
- Choi, K.,** September 10, 2010. *Aspergillus niger*. Retrieved from [https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus\\_niger](https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Aspergillus_niger)
- Ellis, D.,** September 16, 2016. *Geotrichum candidum*. Retrieved from [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal\\_Descriptions/Hyphomycetes\\_\(hyaline\)/Geotrichum/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Geotrichum/).
- Fichtner, E.J.,** 1999. *Sclerotium rolfii* Sacc.: ‘Kudzu of the Fungal World’. Retrieved September 22, 2016 from <https://www.cals.ncsu.edu/course/pp728/Sclerotium/Srolfsii.html>.
- Guzmán-Valle, P., L. Bravo-Luna, R. Montes-Belmont, C. Guigón-López, and G. Sepúlveda-Jiménez,** 2014. Induction of resistance to *Sclerotium rolfii* in different varieties of onion by inoculation with *Trichoderma asperellum*. Eur J Plant Pathol 138:223–229.
- Hopkins, A. J.M., C.L. Todoroki, and D. Pont,** 2012. Assessment of the effect of *Nectria* flute canker on wood quality within mature *Pinus radiata* using multiple methods. Eur J Forest Res 131:485–491.
- Kung’u, J.,** 2016. *Penicillium* species: the mould that saved millions of lives. Retrieved from <https://www.moldbacteria.com/mold/penicillium.html>.
- Liu, T., B.C. Ma, J.M. Hou, & Y.H. Zuo,** 2014. Isolation and characterization of the PKAr gene from a plant pathogen, *Curvularia lunata*. Indian Journal of Microbiology, 54(3), 310-314.
- Macura, A. B., and M. Skóra,** 2015. 21-year retrospective study of the prevalence of *Scopulariopsis brevicaulis* in patients suspected of superficial mycoses. Postep Derm Alergol 32 (3): 189–194.
- Mahmoud, R.S., and K. Narisawa,** 2013. A New Fungal Endophyte, *Scolecobasidium humicola*, Promotes Tomato Growth under Organic Nitrogen Conditions. PLoS ONE 8(11): e78746.
- Mellon, J.E., P.J. Cotty, and M.K. Dowd,** 2007 *Aspergillus flavus* hydrolases: their roles in pathogenesis and substrate utilization. Appl Microbiol Biotechnol 77:497–504.
- Mukherjee, I., and A. Mittal,** 2005. Bioremediation of Endosulfan Using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75:1034–1040.

- Okwu, G.I., P.N. Achar, M.J. Ikenebomeh, and M.Y. Sreenivasa**, 2011. Studies of food thickeners in Nigeria for contamination by aflatoxigenic forms of *Aspergillus* and their detection by PCR. African Journal of Biotechnology 10(43): 8641-8646.
- Mukherjee, I., and A. Mittal**, 2005. Bioremediation of Endosulfan Using *Aspergillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 75:1034–1040.
- Munck, I.A., and G. R. Stanosz**, 2009. Quantification of conidia of *Diplodia* spp. extracted from red and jack pine cones. Plant Dis. 93:81-86.
- Mycobank**, 2016. *Pythium myriotylum* Drechsler. Retrieved from <http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=7805&Fields=All>.
- Mycobank**, 2016. *Trichoderma harzianum* Rifai. Retrieved from <http://mycobank.com/BioloMICS.aspx?TableKey=14682616000000063&Rec=11879&Fields=All>.
- Palencia, E.R., T.R. Mitchell, M.E. Snook, A.E. Glenn, S. Gold**, 2014. Analyses of Black Aspergillus Species of Peanut and Maize for Ochratoxins and Fumonisin. Journal of Food Protection 77(5): 805–813.
- Phillips, A.J.L., P.W. Crous, and A. Alves**, 2007. *Diplodia seriata*, the anamorph of “*Botryosphaeria*” *obtusata*. Fungal Diversity 25: 141-155.
- Rodrigues Marcondes, N., C. Ledesma Taira, D. Cirena Vandresen, T.I. Estivalet Svidzinski, M.K. Kadowaki, & R.M. Peralta**, 2008. New feather-degrading filamentous fungi. Microbial Ecology 56(1): 13-7.
- Sutherland, R., A. Viljoen, A.A. Myburg, & N. van den Berg**, 2013. Pathogenicity associated genes in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4. South African Journal of Science 109(5): 1-10.
- Tambong, J.T., J. Poppe and M. Höfte**, 1999. Pathogenicity, electrophoretic characterisation and in planta detection of the cocoyam root rot disease pathogen, *Pythium myriotylum*. European Journal of Plant Pathology 105: 597–607.
- Úrbez-Torres, J.R., G.M. Leavitt, J.C. Guerrero, J. Guevara, and W.D. Gubler**, 2008. Identification and pathogenicity of *Lasiodiplodia theobromae* and *Diplodia seriata*, the causal agents of bot canker disease of grapevines in Mexico. Plant Dis. 92: 519-529.
- Wokocho, R.C., and B.C. Aduo**, 2011. Pathogenicity of fungi associated with the cocoyam root rot blight complex in south-eastern Nigeria. Agro-Science Journal of Tropical Agriculture, Food, Environment and Extension 10 (3): 49 -54.

### 3 Fase 3: Pruebas de antagonismo y utilización de controles biológicos y químicos para el manejo de hongos patógenos de la yautía selección Nazareno bajo condiciones in vitro

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

Según Baker y Cook (1974), el control biológico, según el campo de la fitopatología, es “la reducción de la densidad o de las actividades productoras de enfermedades causadas por un patógeno o parásito, en su estado activo o en latencia, causada en forma natural o por la manipulación del ambiente, del hospedero o de antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar.” En la agricultura se buscan organismos que puedan controlar la población de los patógenos para disminuir la severidad de la enfermedad. Los atributos que se buscan en estos organismos biocontroladores es que sean antagonistas con los patógenos y mutualistas, comensalistas o neutrales con las plantas de interés. El mutualismo es la interacción de dos o más organismos que se benefician entre sí. En el comensalismo uno de las partes se beneficia mientras que la otra parte no se afecta. En un neutralismo ninguno de los dos organismos se beneficia, pero tampoco se afectan. Cuando se habla de antagonismo uno de los dos organismos se ve afectado por la competencia, el parasitismo y/o la depredación del adversario. En la competencia un microorganismo puede apoderarse del espacio y el alimento del otro lo que afectaría su crecimiento y habilidad de reproducirse. En un parasitismo un organismo vive a expensas de otro, el cual puede ser no relacionado filogenéticamente. La depredación es la eliminación de un organismo para que el otro lo consuma y pueda subsistir (Pal y McSpadden Gardener, 2006). Dentro de este último comportamiento entre hongos puede haber micoparasitismo donde uno consume al otro liberando enzimas líticas que destruyen la pared celular del otro y después lo consumen. Un ejemplo es *Trichoderma* spp. cuando es enfrentado a *Sclerotium rolfsii* o *Rhizoctonia solani*. *Trichoderma* spp. primero reconoce el micelio del hongo patógeno y libera enzimas de naturaleza celulolítica, glucanolítica, proteolítica y quitinolítica que degradan la pared celular del hongo para luego nutrirse de los productos del patógeno (Hoyos-Carvajal et al, 2008; Kotasthane

et al, 2014). Durante esa interacción puede existir el fenómeno de enroscamiento del hongo antagónico y el patógeno.

En esta fase de esta investigación relacionada con el mal seco de la yautía, se realizaron pruebas de antagonismo donde los patógenos utilizados fueron los hongos asociados al mal seco en Puerto Rico: *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp. y *Fusarium solani* (Plaza Delestre, 1994; Bejarano Mendoza, 1998). También se utilizaron las 27 cepas de hongos aislados de suelo en descanso y suelo de uso continuo. El propósito de estas pruebas es seleccionar dos hongos con potencial biocontrolador de los hongos asociados al mal seco. El segundo objetivo fue probar tratamientos (Ts) biológicos y químicos para controlar los hongos asociados al mal seco y los que fueron patógenos en las in vitro en discos de cormos. Los patógenos utilizados fueron *Sclerotium rolfsii* (**Sr**), *Rhizoctonia solani* (**Rs**), *Pythium* spp. (**Py**), *Fusarium solani* (**Fs**) 1, **Fs** 2 y *Aspergillus niger* (**An**). Los Ts comerciales utilizados fueron CuOH (Kocide 3000®), Serenade® y Bioplex®. En los Ts no comerciales se utilizaron los hongos *Trichoderma harzianum* (**Thar**) y *Scolecobasidium* spp. (**Scol**). En el primer experimento se probaron los Ts con los hongos patógenos creciendo en PDA. En la prueba con los Ts comerciales, se utilizó el método de Kirby-Bauer con discos impregnados y se midió el área de inhibición para evaluar el mejor tratamiento contra los patógenos. En la prueba con los Ts no comerciales, se utilizó el mismo método de las pruebas de antagonismo y se midió el crecimiento del patógeno. En el segundo experimento se utilizó el método ‘sándwich’ con los discos de cormos y se inocularon los discos con los hongos patógenos y los Ts. Se aplicaron los Ts en dos tiempos diferentes: antes de inoculación y después de inoculación. Se midió el tamaño de lesión en los discos para observar si los Ts podían reducir el daño de los patógenos y comprobar su efectividad.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Lugar de los experimentos

Los experimentos fueron ejecutados en el edificio BNF de la finca Alzamora, Colegio de Ciencias Agrícolas, Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez 00681.

### 3.2.2 Pruebas de antagonismo

Se realizaron pruebas de antagonismo con los cuatro hongos asociados al mal seco, *Sclerotium rolfsii* (**Sr**), *Rhizoctonia solani* (**Rs**), *Pythium* spp. (**Py**) y *Fusarium solani* cepa 1 (**Fs 1**), contra los 26 hongos aislados de las muestras de la Fase 2 (Tabla 3.1). Cada hongo asociado al mal seco (patógeno) se probó con las 29 cepas por separado más un control del mismo. El diseño fue un DCA con 3 repeticiones. Se realizó una prueba Fisher ( $\alpha=0.05$ ) para observar el contraste entre medias de los diferentes hongos aislados.

Se hicieron enfrentamientos duales donde primero se trazó una línea de extremo a extremo en la parte de atrás del plato petri con PDA, luego se colocó un cilindro de 5mm de agar con el hongo patogénico en el extremo del plato y en el otro extremo un cilindro del hongo antagonista. Debido a que algunas cepas de hongos se subcultivaban (salen más colonias de una sola; ejemplo: *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp.) se dividieron en 2 categorías: Clase 1 y Clase 2. **Clase 1** consistía de 23 hongos que no se subcultivan (incluyendo los controles de los patógenos). La **Clase 2** consistía de 8 hongos que se subcultivan (incluyendo los controles del patógeno). En la **Tabla 3.1** se observan los hongos utilizados para determinar el potencial antagónico contra los patógenos. Se monitorearon los cultivos durante siete días y se midió el crecimiento radial (mm) del hongo patógeno en el día siete.

Los hongos más exitosos en inhibir el crecimiento de los patógenos se estudiaron para seleccionar dos para las pruebas de control posteriores. Se estudiaron las interacciones patógeno- antagonista en placa y si estos antagonistas no son patógenos en la yautía Nazareno. Esta última información se corroboró con las pruebas de patogenicidad realizadas en discos de cormos in vitro.

**Tabla 3.1.** Hongos asociados a la yautía Nazareno utilizados en las pruebas de antagonismo.

| Clase 1                       |              | Clase 2                    |              |
|-------------------------------|--------------|----------------------------|--------------|
| Antagonista                   | Abreviatura  | Antagonista                | Abreviatura  |
| <i>Alternaria alternata</i>   | <i>Alt</i>   | <i>Aspergillus niger</i>   | <i>An</i>    |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | <i>Afla</i>  | <i>Aspergillus</i> spp. 1  | <i>Asp 1</i> |
| <i>Cladobotryum</i> spp.      | <i>Clad</i>  | <i>Aspergillus terreus</i> | <i>Ater</i>  |
| Control*                      | -            | Control*                   | -            |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | <i>Cbra</i>  | <i>Penicillium</i> spp. 1  | <i>Pen 1</i> |
| <i>Curvularia lunata</i>      | <i>Clun</i>  | <i>Penicillium</i> spp. 2  | <i>Pen 2</i> |
| Desconocido                   | <i>Des</i>   | <i>Penicillium</i> spp. 3  | <i>Pen 3</i> |
| <i>Diplodia</i> spp.          | <i>Dip</i>   | <i>Penicillium</i> spp. 4  | <i>Pen 4</i> |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | <i>Fox</i>   |                            |              |
| <i>Fusarium solani</i> 2      | <i>Fs 2</i>  |                            |              |
| <i>Fusarium</i> spp.          | <i>Fus</i>   |                            |              |
| <i>Geotrichum</i> spp.        | <i>Geo</i>   |                            |              |
| Morfotipo 1                   | M 1          |                            |              |
| Morfotipo 2                   | M 2          |                            |              |
| Morfotipo 3                   | M 3          |                            |              |
| <i>Penicillium</i> spp. 5     | <i>Pen 5</i> |                            |              |
| <i>Pythium</i> spp.           | <i>Py</i>    |                            |              |
| <i>Rhizoctonia solani</i>     | <i>Rs</i>    |                            |              |
| <i>Sclerotium rolfsii</i>     | <i>Sr</i>    |                            |              |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.   | <i>Scol</i>  |                            |              |
| <i>Trichoderma harzianum</i>  | <i>Thar</i>  |                            |              |
| <i>Trichoderma</i> spp.       | <i>Tri</i>   |                            |              |
| <i>Verticillium</i> spp.      | <i>Ver</i>   |                            |              |

\*Control puede ser cualquiera de los patógenos: *Fusarium solani* 1 (*Fs 1*), *Pythium* spp., *Rhizoctonia solani* o *Sclerotium rolfsii*. En la tabla ejemplar de la Clase 1, el Control es *Fs 1*.

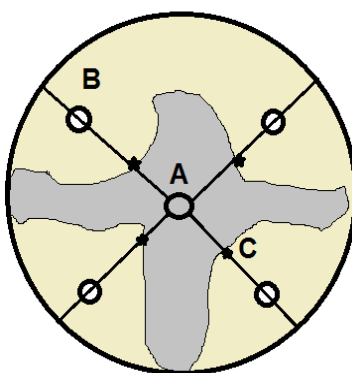
### 3.2.3 Pruebas de control en medio PDA

En este experimento se probaron los hongos asociados al mal seco y de los más virulentos en las pruebas de patogenicidad in vitro con discos de cormos. Los hongos fueron: *Sr*, *Rs*, *Py*, *Fs 1*, *Fs 2* y *Aspergillus niger* (*An*). Se probaron 6 tratamientos (**Ts**) incluyendo un Control +, que es el patógeno. Los mismos fueron: CuOH (Kocide 3000®), Serenade®, Bioplex®, *Trichoderma harzianum* (**Thar**) y *Scolecobasidium*

spp. (*Scol*). Se realizaron dos ensayos: uno con los Ts comerciales y otro con los Ts biológicos, representados por los dos hongos aislados y determinados en esta investigación.

### 3.2.3.1 Ensayo con tratamientos comerciales

Se realizó un diseño factorial 6 x 4, donde el factor A eran los patógenos (*Sr*, *Rs*, *Py*, *Fs* 1, *Fs* 2 y *An*) y el factor B eran los Ts (CuOH (Kocide 3000®), Serenade®, Bioplex® y Control +). Se realizaron 3 repeticiones por combinación. Se utilizó el procedimiento de Kirby-Bauer de la siguiente forma: en el centro de la placa Petri con PDA se colocó un cilindro de 5mm del micelio del patógeno con agar y, a aproximadamente 2 cm del cilindro, se colocaron 4 discos de papel de filtro impregnados con el T. La variable medida fue el largo de inhibición (mm). Para medir el largo de inhibición se hace una línea recta empezando desde la pared de la placa, atravesando el centro de los discos hasta llegar al cilindro con el micelio en el centro de la placa. Luego se mide el espacio hasta llegar al micelio en crecimiento. La medida se hizo para cada uno de los cuatro discos y se sacó la media uniendo las cuatro (Fig. 3.1). En las suspensiones para los tratamientos se mezcló el producto con agua destilada estéril en las siguientes porciones: 0.08g/ 20ml de CuOH (Kocide 3000®), 0.25ml/ 20ml de Serenade®, 6.67 mg/ 20ml de Bioplex® y Control +, agua destilada estéril solamente.



**Figura 3.1.** Representación de pruebas de control con tratamientos comerciales bajo condiciones in vitro en PDA. A) El objeto parecido a una cruz dentro del círculo es el micelio del patógeno. B) Los discos con los tratamientos son los cuatro círculos alrededor del micelio. C) Las líneas representan la medida del largo de inhibición, éstas vienen desde el extremo de la placa, atraviesan los discos y llegan hasta donde termina el micelio representado en una estrella. Las líneas deben hacer una línea recta hasta llegar al cilindro del patógeno en el centro.

### 3.2.3.2 Ensayos con tratamientos biológicos no comerciales

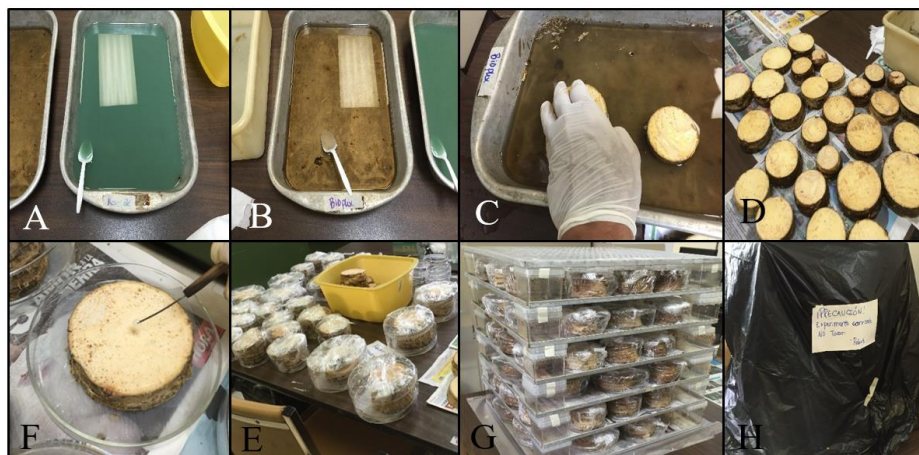
Se realizó un diseño factorial 6 x 3, donde el factor A eran los patógenos (*Sr*, *Rs*, *Py*, *Fs 1*, *Fs 2* y *An*) y el factor B eran los Ts (*Thar*, *Scol* y Control +). Se realizaron 3 repeticiones por combinación. Se realizó el mismo procedimiento de las pruebas de antagonismo donde se puso en un extremo el cilindro del patógeno y en el otro, el antagonista. Se midió el crecimiento radial (mm) del patógeno a los siete días.

### 3.2.4 Pruebas de control en discos de cormos en condiciones in vitro

Se probaron los Ts de las pruebas de control en tejido de yautía Nazareno bajo condiciones in vitro. Se realizaron dos ensayos según modo y tiempo de aplicación (MTA): **pre-tratamiento** y **pos-tratamiento**. En pre-tratamiento se trató el tejido antes de inocular con el patógeno y pos-tratamiento se trató el tejido después de inocular. En ambos ensayos se utilizó un diseño factorial 6 x 6, donde el factor A son los patógenos (*Sr*, *Rs*, *Py*, *Fs 1*, *Fs 2* y *An*), el factor B son los Ts (Kocide 3000®, Serenade®, Bioplex®, *Thar*, *Scol* y Control +). Se prepararon los discos de cormos al igual que en las pruebas de patogenicidad en discos de cormos (ver Fase 2). En resumen, se lavaron los cormos dos veces, se pasaron por hipoclorito de sodio al 20% y tres enjuagues de agua estéril. Se trozaron en discos de aproximadamente 2.5 cm de grosor. En el pre-tratamiento se sumergieron en ambas caras de los discos en el T y se esperó a que se secaran a temperatura ambiente (Fig. 3.2). En el pos-tratamiento se aplicaron 4 ml de las suspensiones de los Ts por atomizador en toda la superficie del haz y envés de los discos (Fig. 3.3). Para ambos ensayos, los discos inoculados se colocaron en cámaras húmedas, como los de las pruebas de patogenicidad in vitro, se envolvieron en papel plástico de alimentos y se colocaron a temperatura ambiente en (24-25 C) en oscuridad. Después de 7 días se tomaron los datos del tamaño de lesión (mm) sacando el promedio con la medida del largo y del ancho. Las suspensiones para los Ts se hicieron utilizando agua destilada estéril y las porciones fueron las siguientes: 8g/ 2L de CuOH (Kocide 3000®), 25ml/ 2L de Serenade® y 2g/ 6L de Bioplex®. Para *Thar* y *Scol* se utilizó el mismo procedimiento de las pruebas de patogenicidad in vivo,



osea, se raspó el micelio de un cultivo de 7 días, se depositó en 300ml de agua destilada estéril y se licuó por 30s. Las suspensiones se utilizaron según el modo de aplicación.



**Figura 3.3.** Procedimiento utilizado en el ensayo pre-tratamiento para pruebas de control en discos de cormos de yautía Nazareno. A-C) Se prepararon las suspensiones en fosas donde se sumergieron los discos de cormos en el haz y el dorso. D) Se dejaron secar por ambos lados sobre papel periódico. E) Se inocularon con un cilindro de agar con micelio del patógeno. F) El disco inoculado se tapó con otro de igual tamaño y se colocó en una placa Petri con la cámara húmeda y se envolvió con papel plástico para alimentos. G) Se colocaron las placas dentro de una estructura que no permitía que se aplastaran entre sí y se puso papel periódico húmedo en los pisos de esta estructura. H) Luego de poner las placas, se tapó con una bolsa negra y se dejó a temperatura ambiente (24-25 C) durante siete días.



**Figura 3.2.** Procedimiento utilizado en el ensayo pos-tratamiento para pruebas de control en discos de cormos de yautía Nazareno. A) Se prepararon los discos a utilizarse en cada tratamiento. B) Se inocularon con los hongos patógenos. C) Se prepararon las suspensiones de los tratamientos en atomizadores; D) se asperjaron el haz y el dorso de los discos inoculados con los patógenos y los discos que se colocaron encima (tapas) para hacer el 'sándwich'. E) El 'sándwich' se puso en una cámara húmeda con placa Petri y se envolvió con papel plástico. F) Se colocaron las placas con el 'sándwich' en una estructura con múltiples pisos (como en el procedimiento pre-tratamiento), se tapó con una bolsa negra y se dejó a temperatura ambiente (24-25 C) durante siete días.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Pruebas de antagonismo

El crecimiento radial de todos los patógenos fue significativamente diferente en todos los antagonistas probados para ambas clases (Tabla 3.2). Se observa excelente  $R^2$  para los datos de todos los patógenos excepto en *Py* ( $R^2= 0.58$ ) de la clase 2. La variabilidad también fue una que no se excedió excepto en la Clase 2 para *Fs* 1, *Py* y *Rs*.

**Tabla 3.2.** Análisis de varianza para pruebas de antagonismo en ambas clases.

| Patógeno                  | Clase 1 (n=69) |                |      | Clase 2 (n=24) |                |       |
|---------------------------|----------------|----------------|------|----------------|----------------|-------|
|                           | Trat*          | R <sup>2</sup> | CV   | Trat*          | R <sup>2</sup> | CV    |
| <i>Fusarium solani</i> 1  | <0.0001        | 0.97           | 4.91 | 0.0005         | 0.77           | 24.11 |
| <i>Pythium</i> spp.       | <0.0001        | 0.98           | 4.30 | 0.0259         | 0.58           | 18.78 |
| <i>Rhizoctonia solani</i> | <0.0001        | 0.96           | 7.73 | 0.0002         | 0.79           | 27.57 |
| <i>Sclerotium rolfsii</i> | <0.0001        | 0.99           | 2.54 | <0.0001        | 0.99           | 2.86  |

\*Valores p para fuentes de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

##### 3.3.1.1.1 Clase 1

##### 3.3.1.1.2 *Fusarium solani* 1

En la Tabla 3.3 se observan las medias de crecimiento radial de los antagonistas utilizados en contra de *Fs* 1 en la Clase 1. *Trichoderma harzianum* (**Thar**= 17.33mm) y *Trichoderma* spp. (**Tri**= 18mm) inhibieron significativamente el crecimiento de *Fs* 1 más que los demás hongos antagonistas si se comparan las medias de menor a mayor (DMS=2.88084). *Sr* (21.67mm) y *Scolecobasidium* spp. (**Scol**= 23mm) inhibieron significativamente a *Fs* 1 más que el grupo que va desde *Rs* (26.67mm) al control (44.67mm). Esto significa que *Sr* compite más por nutrientes que *Rs*.

### 3.3.1.1.3 *Pythium* spp.

En la Tabla 3.4 se observan las medias de crecimiento radial de los antagonistas utilizados en contra de *Py* en la Clase 1. *Sr* (20.67mm) inhibió significativamente más que el grupo que va desde *Scol* (24mm) hasta el Control (58.67mm) si se compararan las medias de menor a mayor (DMS=2.93469). Esto quiere decir que *Sr* compite mas eficientemente por nutrientes que *Py*. *Thar* (22mm) inhibió significativamente más que el grupo que va desde *Tri* (28.33mm) hasta el Control. *Scol* (24mm) inhibió significativamente más que el grupo que va desde *Tri* hasta el Control. *Tri* inhibió significativamente más que el grupo que va desde *Diplodia* spp. (*Dip*= 33.33mm) hasta el Control.

### 3.3.1.1.4 *Rhizoctonia solani*

En la Tabla 3.5 se observan las medias de crecimiento radial de los antagonistas utilizados en contra de *Rs* en la Clase 1. *Thar* (21.33mm), *Tri* (22mm) y *Sr* (27.33mm) inhibieron significativamente más a *Rs* que el grupo que va desde *Dip* (32mm) hasta el Control (74mm) si se compararan las medias de menor a mayor (DMS=6.58599). *Sr* (27.33mm) inhibió significativamente más que el grupo que va desde *Py* (35.67) hasta el Control. *Sr* es más agresivo que *Rs* en competir por nutrientes.

### 3.3.1.1.5 *Sclerotium rolfsii*

En la Tabla 3.6 se observan las medias de crecimiento radial de los antagonistas utilizados en contra de *Sr* en la Clase 1. *Thar* (23mm) inhibió significativamente más a *Sr* que el grupo que va desde *Tri* (37.33mm) hasta el Control (74mm) si se compararan las medias de menor a mayor (DMS=2.89440). *Tri* tambien inhibió más que los demas hongos, ya que estos no inhibieron significativamente.

**Tabla 3.3.** Crecimiento radial de *Fusarium solani* 1 en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo

| Hongo Clase 1                      | Crecimiento radial de <i>F. solani</i> 1 (mm) |     |
|------------------------------------|---|-----|
| <i>Trichoderma harzianum</i>       | 17.33   | a*  |
| <i>Trichoderma</i> spp.            | 18.00   | a   |
| <i>Sclerotium rolfsii</i>          | 21.67   | b   |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.        | 23.00   | b   |
| <i>Rhizoctonia solani</i>          | 26.67   | c   |
| <i>Diplodia</i> spp.               | 30.00   | d   |
| <i>Pythium</i> spp.                | 34.33   | e   |
| <i>Curvularia brachyspora</i>      | 34.67   | ef  |
| <i>Fusarium solani</i> 2           | 36.00   | efg |
| <i>Curvularia lunata</i>           | 37.33   | fgh |
| Desconocido                        | 38.67   | ghi |
| <i>Fusarium oxysporum</i>          | 39.67   | hij |
| <i>Geotrichum</i> spp.             | 40.67   | ijk |
| <i>Cladobotryum</i> spp.           | 41.00   | ijk |
| <i>Aspergillus flavus</i>          | 41.00   | ijk |
| Morfotipo 2                        | 41.67   | jk  |
| <i>Penicillium</i> spp. 5          | 41.67   | jk  |
| <i>Verticillium</i> spp.           | 42.00   | jkl |
| <i>Fusarium</i> spp.               | 42.00   | jkl |
| <i>Alternaria alternata</i>        | 42.67   | kl  |
| Morfotipo 1                        | 43.00   | kl  |
| Morfotipo 3                        | 43.33   | kl  |
| <i>Fusarium solani</i> 1 (Control) | 44.67   | l   |

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
DMS=2.88084

**Tabla 3.4.** Crecimiento radial de *Pythium* spp. en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo

| Hongo Clase 1                 | Crecimiento radial de <i>Pythium</i> spp. (mm) |     |
|-------------------------------|--|-----|
| <i>Sclerotium rolfsii</i>     | 20.67  | a*  |
| <i>Trichoderma harzianum</i>  | 22.00  | ab  |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.   | 24.00  | b   |
| <i>Trichoderma</i> spp.       | 28.33  | c   |
| <i>Diplodia</i> spp.          | 33.33  | d   |
| <i>Rhizoctonia solani</i>     | 34.67  | de  |
| <i>Curvularia brachyspora</i> | 36.67  | e   |
| <i>Curvularia lunata</i>      | 41.00  | f   |
| <i>Fusarium solani</i> 1      | 41.67  | f   |
| <i>Alternaria alternata</i>   | 43.33  | fg  |
| <i>Fusarium oxysporum</i>     | 44.67  | gh  |
| <i>Fusarium solani</i> 2      | 45.00  | ghi |
| <i>Cladobotryum</i> spp.      | 45.00  | ghi |
| <i>Geotrichum</i> spp.        | 45.33  | ghi |
| <i>Fusarium</i> spp.          | 46.00  | ghi |
| Desconocido                   | 47.00  | hi  |
| <i>Aspergillus flavus</i>     | 47.00  | hi  |
| Morfotipo 2                   | 47.33  | hij |
| <i>Verticillium</i> spp.      | 47.67  | ij  |
| Morfotipo 3                   | 50.00  | j   |
| Morfotipo 1                   | 50.00  | j   |
| <i>Penicillium</i> spp. 5     | 55.67  | k   |
| <i>Pythium</i> spp. (Control) | 58.67  | l   |

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
DMS=2.93469

**Tabla 3.5.** Crecimiento radial de *Rhizoctonia solani* en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo

| Hongo Clase 1                       | Crecimiento radial de <i>R. solani</i> (mm) |      |
|-------------------------------------|---|------|
| <i>Trichoderma harzianum</i>        | 21.33                                       | a*   |
| <i>Trichoderma</i> spp.             | 22.00                                       | a    |
| <i>Sclerotium rolfisii</i>          | 27.33                                       | ab   |
| <i>Diplodia</i> spp.                | 32.00                                       | bc   |
| <i>Pythium</i> spp.                 | 35.67                                       | c    |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.         | 36.67                                       | c    |
| <i>Fusarium</i> spp.                | 46.67                                       | d    |
| <i>Fusarium solani</i> 1            | 49.00                                       | de   |
| <i>Curvularia brachyspora</i>       | 54.00                                       | ef   |
| <i>Fusarium solani</i> 2            | 54.67                                       | efg  |
| <i>Aspergillus flavus</i>           | 55.67                                       | fg   |
| Morfotipo 3                         | 56.00                                       | fg   |
| Morfotipo 1                         | 56.67                                       | fgh  |
| <i>Fusarium oxysporum</i>           | 57.67                                       | fghi |
| Morfotipo 2                         | 60.67                                       | ghij |
| Desconocido                         | 60.67                                       | ghij |
| <i>Verticillium</i> spp.            | 62.67                                       | hij  |
| <i>Curvularia lunata</i>            | 62.67                                       | hij  |
| <i>Penicillium</i> spp. 5           | 63.00                                       | hij  |
| <i>Alternaria alternata</i>         | 63.67                                       | ij   |
| <i>Cladobotryum</i> spp.            | 66.33                                       | jk   |
| <i>Geotrichum</i> spp.              | 72.67                                       | kl   |
| <i>Rhizoctonia solani</i> (Control) | 74.00                                       | l    |

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
DMS=6.58599

**Tabla 3.6.** Crecimiento radial de *Sclerotium rolfisii* en confrontación con los hongos de la Clase 1 en las pruebas de antagonismo

| Hongo Clase 1                        | Crecimiento radial de <i>S. rolfisii</i> (mm) |    |
|--------------------------------------|---|----|
| <i>Trichoderma harzianum</i>         | 23.00   | a* |
| <i>Trichoderma</i> spp.              | 37.33   | b  |
| <i>Pythium</i> spp.                  | 71.67   | c  |
| <i>Rhizoctonia solani</i>            | 72.00   | c  |
| <i>Scolecobasidium</i> spp.          | 72.33   | c  |
| Desconocido                          | 72.67   | c  |
| <i>Fusarium solani</i> 1             | 73.00   | c  |
| Morfotipo 1                          | 73.00   | c  |
| Morfotipo 3                          | 73.00   | c  |
| <i>Geotrichum</i> spp.               | 73.00   | c  |
| Morfotipo 2                          | 73.33   | c  |
| <i>Penicillium</i> spp. 5            | 73.33   | c  |
| <i>Curvularia brachyspora</i>        | 73.33   | c  |
| <i>Curvularia lunata</i>             | 73.33   | c  |
| <i>Fusarium oxysporum</i>            | 73.33   | c  |
| <i>Fusarium</i> spp.                 | 73.33   | c  |
| <i>Fusarium solani</i> 2             | 73.33   | c  |
| <i>Cladobotryum</i> spp.             | 73.67   | c  |
| <i>Alternaria alternata</i>          | 73.67   | c  |
| <i>Verticillium</i> spp.             | 74.00   | c  |
| <i>Aspergillus flavus</i>            | 74.00   | c  |
| <i>Diplodia</i> spp.                 | 74.00   | c  |
| <i>Sclerotium rolfisii</i> (Control) | 74.00   | c  |

\*Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )  
DMS=2.89440

### 3.3.1.2 Clase 2 (Tabla 3.7)

#### 3.3.1.2.1 *Fusarium solani* 1

*Aspergillus niger* (**An**= 11.33mm) inhibió significativamente el crecimiento de *Fs* 1 más que *Penicillium* spp. 1 (**Pen** 1= 28.33mm), *Pen* 3 (29.67mm), *Pen* 2 (37.67mm), *A. terreus* (**Ater**= 37.67mm) y el control (44.67mm) si se observan las medias de menor a mayor (DMS=12.04911). *Pen* 4 (20.33mm) y *Aspergillus* spp. 1 (**Asp** 1= 21.33mm) inhibieron significativamente el crecimiento de *Fs* 1 más que *Pen* 2 y *Ater*. *Pen* 1 inhibió solamente más que el Control.

### 3.3.1.2.2 *Pythium* spp.

*Asp* 1 (21.33mm) inhibió significativamente el crecimiento de *Py* más *Pen* 4 (35.67mm), *Pen* 3 (36.67mm), *Pen* 2 (37.67mm), *Ater* (39mm) y *An* (42.67mm), que en este ensayo quedó de último lugar antes que el control (DMS=11.69155).

### 3.3.1.2.3 *Rhizoctonia solani*

*Asp* 1 (13.67mm) y *An* (14mm) inhibieron significativamente el crecimiento de *Rs* más que el grupo que va desde *Pen* 4 (43mm) hasta el Control (74mm) si se observan las medias de menor a mayor (DMS=20.81876). *Pen* 4, *Pen* 1 (45.67mm), *Pen* 2 (52.33mm), *Ater* (53mm) inhibieron significativamente el crecimiento de *Rs* más que el Control.

### 3.3.1.2.4 *Sclerotium rolfsii*

*An* (29.67mm) fue el unico hongo de la Clase 2 que inhibió significativamente el crecimiento de *Sr* (DMS=3.35186).

**Tabla 3.7.** Crecimiento radial de los patógenos confrontando los hongos de la Clase 2 en pruebas de antagonismo

| Hongo                      | <i>Fs</i> 1   |    | <i>Py</i>    |    | <i>Rs</i>    |    | <i>Sr</i>   |   |
|----------------------------|---------------|----|--------------|----|--------------|----|-------------|---|
|                            | Crec.         |    | Crec.        |    | Crec.        |    | Crec.       |   |
|                            | (mm)          |    | (mm)         |    | (mm)         |    | (mm)        |   |
| <i>Aspergillus niger</i>   | 11.33         | a* | 42.67        | b  | 14.00        | a  | 29.67       | a |
| <i>Aspergillus</i> spp. 1  | 21.33         | ab | 21.33        | a  | 13.67        | a  | 73.67       | b |
| <i>Aspergillus terreus</i> | 37.67         | cd | 39.00        | b  | 53.00        | b  | 73.00       | b |
| Control <sup>a</sup>       | 44.67         | d  | 43.00        | b  | 74.00        | c  | 74.00       | b |
| <i>Penicillium</i> spp. 1  | 28.33         | bc | 31.67        | ab | 45.67        | b  | 73.33       | b |
| <i>Penicillium</i> spp. 2  | 37.67         | cd | 37.67        | b  | 52.33        | b  | 72.67       | b |
| <i>Penicillium</i> spp. 3  | 29.67         | bc | 36.67        | b  | 53.33        | bc | 72.33       | b |
| <i>Penicillium</i> spp. 4  | 20.33         | ab | 35.67        | b  | 43.00        | b  | 73.33       | b |
|                            | DMS=12.04911* |    | DMS=11.69155 |    | DMS=20.81876 |    | DMS=3.35186 |   |

\*Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $\alpha = 0.05$ )

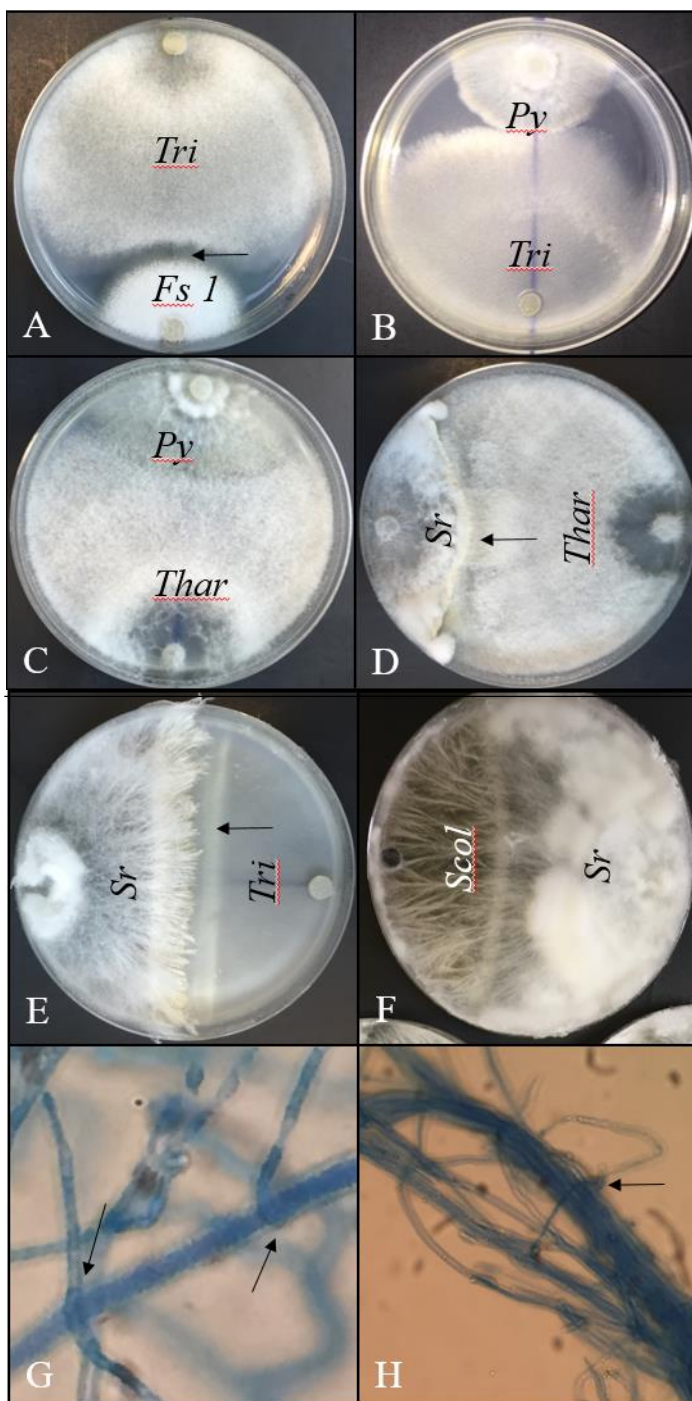
<sup>a</sup>Hongo patógeno solamente (*Fs* 1, *Py*, *Rs* o *Sr*)

### 3.3.1.3 Selección de hongos biocontroladores

Examinando los resultados anteriores podemos observar que hay tres hongos potenciales biocontroladores. En muchos casos se pudo observar en la zona donde tuvieron contacto los hongos que el micelio se tornaba color amarillo o anaranjado, lo que significa que probablemente hubo liberación de antibióticos. También se pudo observar el antagonista cubriendo por completo al patógeno, como, por ejemplo, *Thar* cubriendo a *Py*, y patógenos agresivos en crecimiento, como *Sr*, cubriendo al antagonista. Se observó enroscamiento muy leve en dos especímenes. Esto ocurrió en *Thar* contra *Sr* y *Thar* contra *Fs* 1 (Fig.3.4). Al parecer las cepas de *Trichoderma* recuperadas tenían ese rasgo de micoparasitismo poco pronunciado, mas sin embargo fueron altamente competitivos in vitro.

Los hongos biocontroladores más competitivos fueron *Thar*, *Tri* y *Scol*. En la Figura 3.5 se puede observar que *Thar* es el hongo que más detuvo el crecimiento de los hongos patógenos en comparación con *Tri* y *Scol*, que también fueron buenos para inhibir el crecimiento. En segundo lugar está *Tri*, que fue mejor que *Scol* excepto en *Py*. *Scol* detuvo el crecimiento de los patógenos significativamente (excepto a *Sr*) en comparación con los controles. Esta ilustración sólo se puede analizar a nivel de ensayo ya que no fueron corridos en un mismo ensayo todos los patógenos.

Los hongos seleccionados fueron *Thar* y *Scol*. *Tri* no fue seleccionado ya que en las pruebas de patogenicidad en discos de la Fase 2 hizo una lesión significativa en los tejidos (13.83mm). Los hongos de la Clase 2 que inhibieron el crecimiento significativamente de los patógenos fueron *An* y *Asp* 1, sin embargo *An* también resultó bastante nocivo en tejido de cormos (20.83mm) al igual que *Asp* 1 (13.33mm).



**Figura 3.4.** Características favorables de antagonistas y patógenos en pruebas de antagonismo realizadas con hongos asociados a la yautia selección Nazareno. A) Espacio de inhibición entre *Fusarium solani* 1 (*Fs 1*) y *Trichoderma* spp. (*Tri*). B) Crecimiento acelerado de *Tri* en comparación con *Pythium* spp. (*Py*). C) *T. harzianum* (*Thar*) colonizando toda la placa incluyendo el micelio de *Py*. D) Barrera creada por *Sclerotium rolfii* (*Sr*) para evitar la colonización completa de *Thar*. E) Barrera color amarillo-crema que sugiere la liberación de antibióticos por ambos bandos, tanto *Sr* como *Tri*. F) Colonia de *Sr* creciendo sobre colonia antagonista de *Scoleobasidium* spp. (*Scol*). G) Hifas de *Thar* enroscando levemente las hifas de *Sr* (marcado por flechas) teñidas con azul de algodón (40X). H) Hifas de *Thar* enroscando levemente micelio de *Fs 1* (marcado por flecha) teñido con azul de algodón (40X).





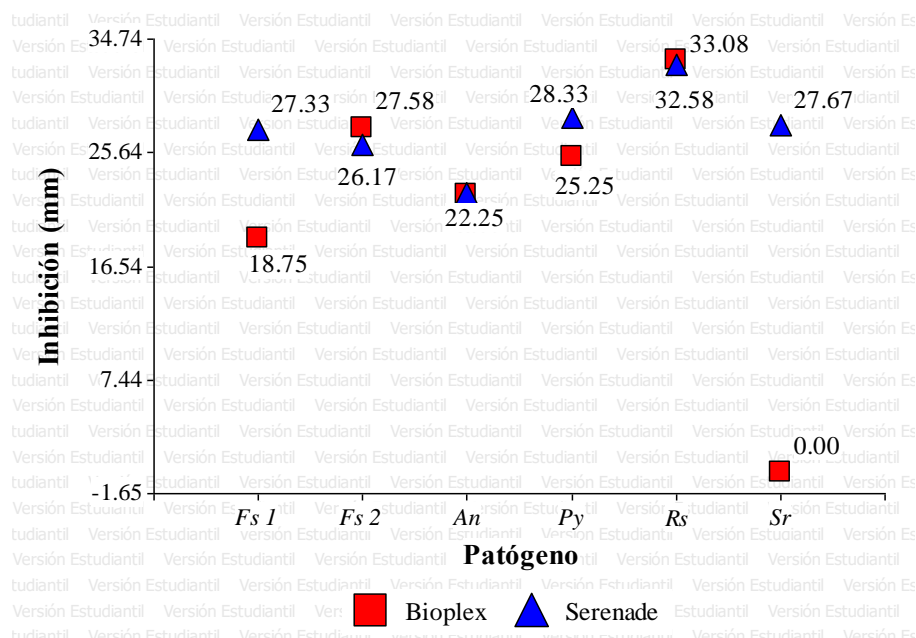
Hubo interacción significativa entre los patógenos y tratamientos, lo que significa que en presencia de los Ts el crecimiento de los patógenos fue inhibido. Además hubo diferencias significativas para los efectos de patógenos y Ts (Tabla 3.8). Hubo poca variación entre los datos (CV= 11.44) y R<sup>2</sup> alto (0.93).

**Tabla 3.8.** Análisis de varianza para pruebas de control en PDA con tratamientos comerciales

| Fuente de variación*     |         |          |       |                |
|--------------------------|---------|----------|-------|----------------|
| Interacción <sup>a</sup> | Trat    | Patógeno | CV    | R <sup>2</sup> |
| <0.0001                  | <0.0001 | <0.0001  | 11.44 | 0.93           |

\*Valores p para fuentes de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas  
<sup>a</sup>Patógeno\*Trat

*Sr* tuvo interacciones significativas: el radio de inhibición fue mucho mayor en presencia de Serenade® (27.67mm) que de Bioplex®, el cual no detuvo el crecimiento de *Sr* (DMS=4.68078). En los efectos de *Fs* 1, Serenade® (27.33mm) inhibió significativamente el crecimiento de *Fs* 1 más que Bioplex® (18.75mm). En los efectos de *Py*, Serenade® tuvo mayor inhibición del micelio que Bioplex®, aunque no significativamente. En los efectos de *Fs* 2, *An* y *Rs*, Bioplex® inhibió el crecimiento del micelio aunque no significativamente. Si se observan los efectos de Serenade® en cada patógeno, se observa que en *Fs* 1, *Py* (28.33mm) y *Sr* la inhibición fue significativamente mayor que en *An* (22.25mm). Bioplex® inhibió el crecimiento de *Rs* (33.08mm) más que en los demás patógenos. Bioplex® inhibió significativamente el crecimiento de *Py* (25.25mm) y *Fs* 2 (27.58mm) más que *Fs* 1 y *Sr*. Además, inhibió el crecimiento de *An* (22.25mm) y *Fs* 1, excepto el de *Sr* (Fig. 3.6).



**Figura 3.6.** Radio de inhibición de los patógenos de yautía Nazareno en presencia de Bioplex® o Serenade®.  
\*DMS=4.68078

### 3.3.2.2 Ensayos con tratamientos biológicos no comerciales

El diseño fue un factorial 4 x 3 donde el factor A eran los patógenos *Fs 1*, *Fs 2*, *Py* y *Rs* y el factor B eran los Ts *Thar*, *Scol* y Control +. Se evaluaron *An* y *Sr* en DCA apartes con los mismos Ts. Para el factorial hubo interacciones significativas y diferencias significativas entre los efectos principales de los Ts y los patógenos (valor-p=0.0001). El diseño tuvo CV= 9.41, con datos reflejando alta R<sup>2</sup> (0.99). En el DCA de *Sr* hubo diferencias significativas entre los Ts (valor-p=0.0001), un excelente CV= 1.13 y R<sup>2</sup> perfecto (1.00) (Tabla 3.9).

**Tabla 3.9.** Análisis de varianza para pruebas de control con tratamientos biológicos no comerciales. A) Diseño factorial 4 x 3: Factor A son *Fusarium solani* (*Fs*) 1, *Fs* 2 y *Rhizoctonia solani* y Factor B son los tratamientos. B) Diseño DCA para *Aspergillus niger*. C) Diseño DCA para *Sclerotium rolfsii*.

A)

| Fuentes de variación*    |         |          |      |                |                 |
|--------------------------|---------|----------|------|----------------|-----------------|
| Interacción <sup>a</sup> | Trat    | Patógeno | CV   | R <sup>2</sup> | SW <sup>b</sup> |
| <0.0001                  | <0.0001 | <0.0001  | 9.41 | 0.99           | 0.2059          |

\*Valores p para fuentes de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

<sup>a</sup>Patógeno\*Trat

<sup>b</sup>Valor p para prueba de Shapiro-Wilks. Si valor-p > 0.05, hay normalidad de residuos.

B)

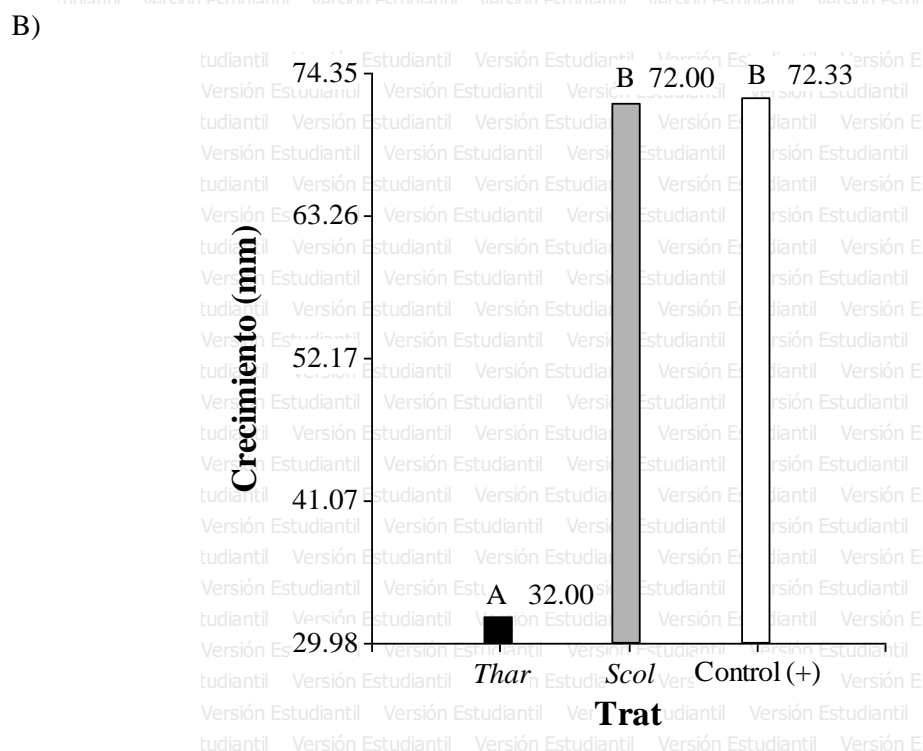
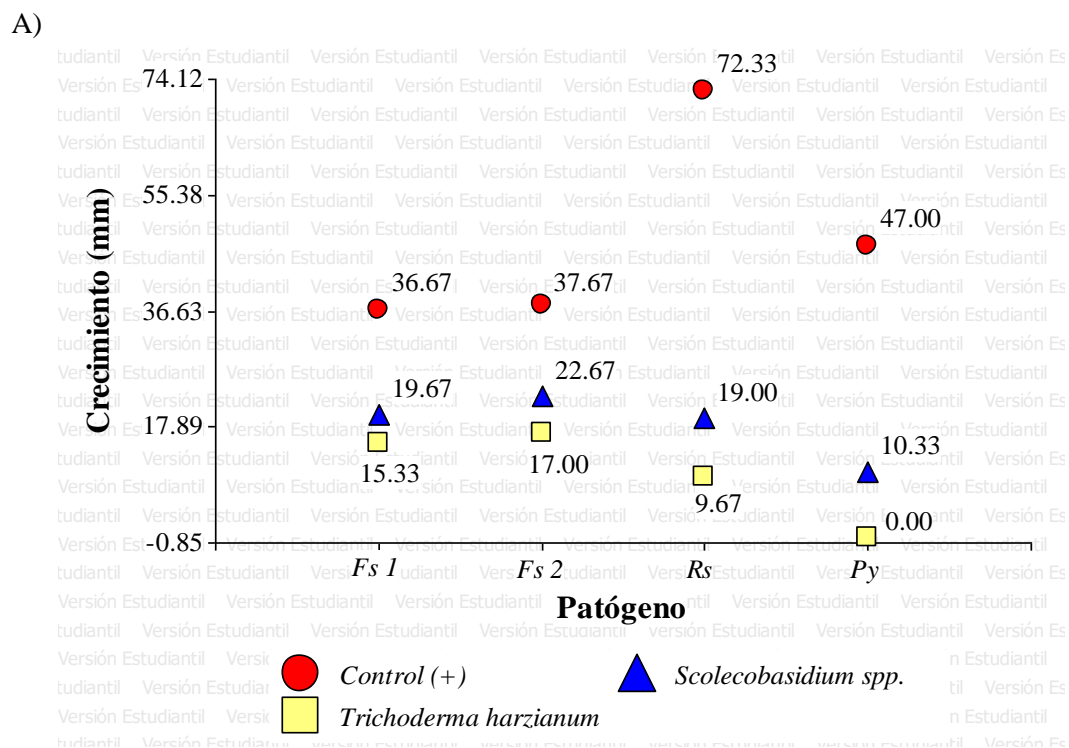
| Trat*  | CV    | R <sup>2</sup> |
|--------|-------|----------------|
| 0.9802 | 52.77 | 0.01           |

C)

| Trat*   | CV   | R <sup>2</sup> |
|---------|------|----------------|
| <0.0001 | 1.13 | 1.00           |

\*Valor p para fuente de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

En las interacciones observadas en el diseño factorial, se puede observar que el crecimiento de los patógenos fue significativamente mayor en los controles que en presencia de cualquiera de los Ts (DMS= 4.06036). Se puede observar que *Thar* inhibió significativamente más el crecimiento de los patógenos que *Scol*. *Thar* inhibió significativamente el crecimiento de *Py* (0mm) más que los demás patógenos. *Thar* también inhibió significativamente el crecimiento de *Rs* (9.67mm) más que *Fs* 1 (15.33mm) y *Fs* 2 (17mm). *Scol* inhibió significativamente el crecimiento de *Py* (10.33mm) más que los demás patógenos. En ausencia de los Ts (Control +), se observa que el crecimiento de *Rs* (72.33mm) es significativamente mayor que los demás patógenos. Le sigue *Py* (47mm) que tiene crecimiento significativamente mayor al de *Fs* 1 (36.67mm) y *Fs* 2 (37.67mm) (Fig. 3.7A). En el DCA de *Sr*, *Thar* (32mm) inhibió significativamente el crecimiento de *Sr* más que *Scol* (72mm) y el control (72.33mm) (DMS=1.33193), como se había previsto en las pruebas de antagonismo (Fig. 3.7B).



\*DMS= 4.06036 (Fig. 3.7A); DMS=1.33193 (Fig. 3.7B)

**Figura 3.7.** Crecimiento radial de patógenos de la yautia Nazareno en PDA bajo los efectos de hongos biocontroladores. A) Crecimiento radial de *Fusarium solani* (Fs) 1, Fs 2, *Pythium spp.* (Py) y *Rhizoctonia solani* (Rs) en presencia y ausencia de *Trichoderma harzianum* (Thar) y *Scolecobasidium spp.* (Scol). B) Crecimiento radial de *Sclerotium rolfsii* (Sr) en presencia y ausencia de hongos biocontroladores.

### 3.3.3 Pruebas de control en discos de cormos en condiciones in vitro

#### 3.3.3.1 Ensayo Pre-Tratamiento

Hubo interacciones significativas entre los patógenos y Ts, además hubo diferencias significativas entre los Ts y entre los patógenos. No se utilizaron los datos de *Py* ya que no afectó prácticamente a los tejidos, esto es coherente con los resultados vistos en las pruebas de patogenicidad en discos de corno in vitro. Se transformaron los datos a  $\log_{10}$  para obtener normalidad. El diseño tuvo datos con buen CV= 9.93 y con  $R^2$  alto (0.94) (Tabla 3.10).

**Tabla 3.10.** Análisis de varianza para pruebas de control en discos de cormos de yautía Nazareno en ensayo pre-tratamiento

| Fuentes de variación*    |        |          |      |                |                 |
|--------------------------|--------|----------|------|----------------|-----------------|
| Interacción <sup>a</sup> | Trat   | Patógeno | CV   | R <sup>2</sup> | SW <sup>b</sup> |
| <0.0001                  | 0.0138 | <0.0001  | 9.93 | 0.94           | 0.0587          |

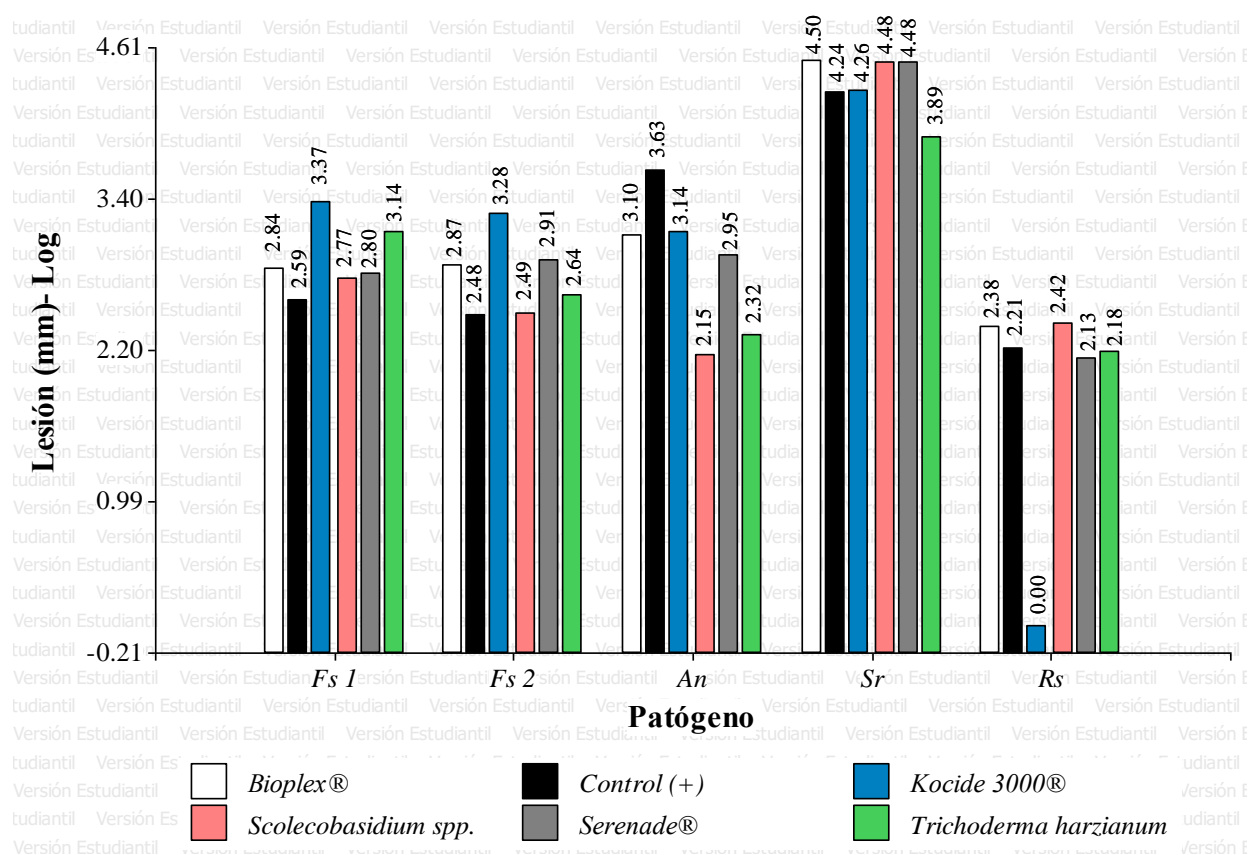
\*Valor p para fuente de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

<sup>a</sup>Patógeno\*Trat

<sup>b</sup>Valor p para prueba de Shapiro-Wilks. Si valor-p > 0.05, hay normalidad de residuos.

En las interacciones, se observa que, a veces, el tamaño de la lesión para el control fue más bajo que el de los Ts. Entre menor sea el tamaño de lesión mejor el T. En los efectos de *Rs*, Kocide 3000® (0mm) no permitió que el patógeno provocara lesión y fue significativamente diferente a los demás Ts (DMS= 0.48350), incluyendo el Control (2.21mm). Para los demás Ts no hubo diferencias significativas en tamaño de lesión. En los efectos de *Fs* 2, el tamaño de lesión fue menor en el Control (2.48mm) que los demás Ts. *Scol* (2.49mm) fue el segundo T con menor tamaño de lesión. *Scol* y el control tuvieron tamaño de lesión significativamente menor al obtenido por Kocide 3000® (3.28mm). El tamaño de lesión en *Fs* 1, fue menor en el control (2.59mm) y significativamente mayor en Kocide 3000® (3.37mm) y en *Thar* (3.14mm). El tamaño de lesión en *An*, fue mayor en el control y menor en *Scol*. *Scol* (2.15mm) y *Thar* (2.32mm) tienen tamaño de lesión significativamente menor al de Bioplex® (3.10mm), Kocide 3000® (3.14mm), Serenade® (2.95mm) y el control (3.63mm). Bioplex®, Kocide 3000® y Serenade® tienen tamaño de

lesión significativamente menor al control. Para *An*, los Ts fueron efectivos en controlar el progreso de la infección, especialmente *Scol* y *Thar*. Para los efectos de *Sr*, el tamaño de lesión fue menor con *Thar* y mayor con Bioplex®. *Thar* (3.89mm) tuvo un tamaño de lesión significativamente menor a *Scol*, Serenade® (4.48mm ambos) y Bioplex® (4.50mm). El control (4.24mm) y Kocide 3000® (4.26mm) tuvieron tamaño de lesión menor a *Scol*, Serenade® y Bioplex® pero no fue significativamente. Como el control fue el segundo en tener tamaño de lesión mas pequeño, *Thar* es el único T efectivo para inhibir el crecimiento de *Sr* en el tejido de corno (Fig. 3.8).



**Figura 3.8.** Tamaño de lesión (log) en discos de cornos de yautía Nazareno pre-tratados antes de ser inoculados con los hongos patógenos.

\*DMS= 0.48350

### 3.3.3.2 Ensayo Pos-Tratamiento

Al igual que en el ensayo Pre Tratamiento, *Py* no creció muy bien en los tejidos por lo tanto no se utilizaron los datos. Los datos tuvieron que ser transformados a  $\log_{10}$  como en pre-tratamiento para obtener normalidad. No hubo interacciones significativas, pero sí hubo diferencias significativas entre los Ts y entre los patógenos. Los datos reflejaron una variación un poco más alta que los de pre-tratamiento y un  $R^2$  moderadamente alto (Tabla 3.11).

**Tabla 3.11.** Análisis de varianza para pruebas de control en discos de cormos de selección Nazareno en ensayo pos-tratamiento.

| Fuente de variación*     |        |          |       |                |                 |
|--------------------------|--------|----------|-------|----------------|-----------------|
| Interacción <sup>a</sup> | Trat   | Patógeno | CV    | R <sup>2</sup> | SW <sup>b</sup> |
| 0.0520                   | 0.0049 | <0.0001  | 19.81 | 0.86           | 0.0742          |

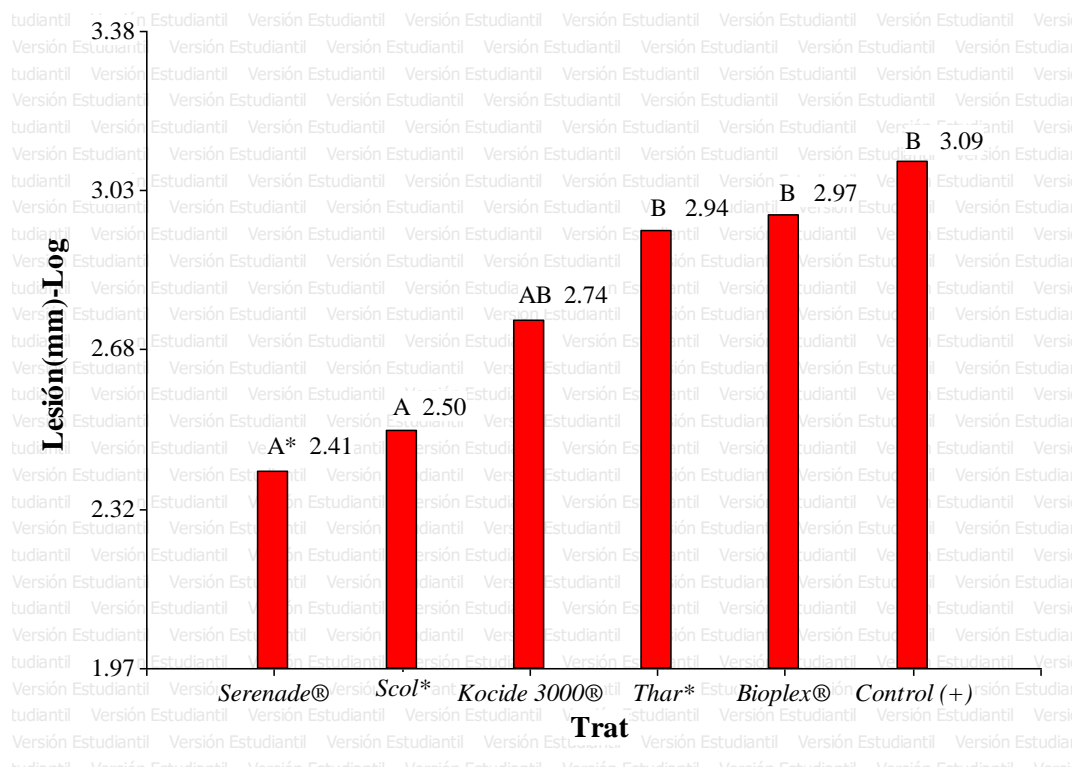
\*Valor p para fuentes de variación. Si valor-p > 0.05, no hay diferencias significativas

<sup>a</sup>Patógeno\*Trat

<sup>b</sup>Valor p para prueba de Shapiro-Wilks. Si valor-p > 0.05, hay normalidad de residuos.

Debido a que no hubo interacciones significativas (valor-p=0.052) se analizaron por prueba Fisher las diferencias significativas entre Ts (DMS = 0.40137). Serenade® fue el T que dio tamaño de lesión más pequeño y los controles fueron los más altos. Serenade® (2.41mm) y *Scol* (2.50mm) tuvieron un tamaño de lesión significativamente más bajo que *Thar* (2.94mm), Bioplex® (2.97mm) y los controles (3.09mm). Kocide 3000® (2.74mm) no tuvo lesión significativamente menor al *Thar*, Bioplex® y los controles. En general, Serenade® y *Scol* inhibieron mejor el crecimiento de los patógenos que los otros Ts (Fig. 3.9).

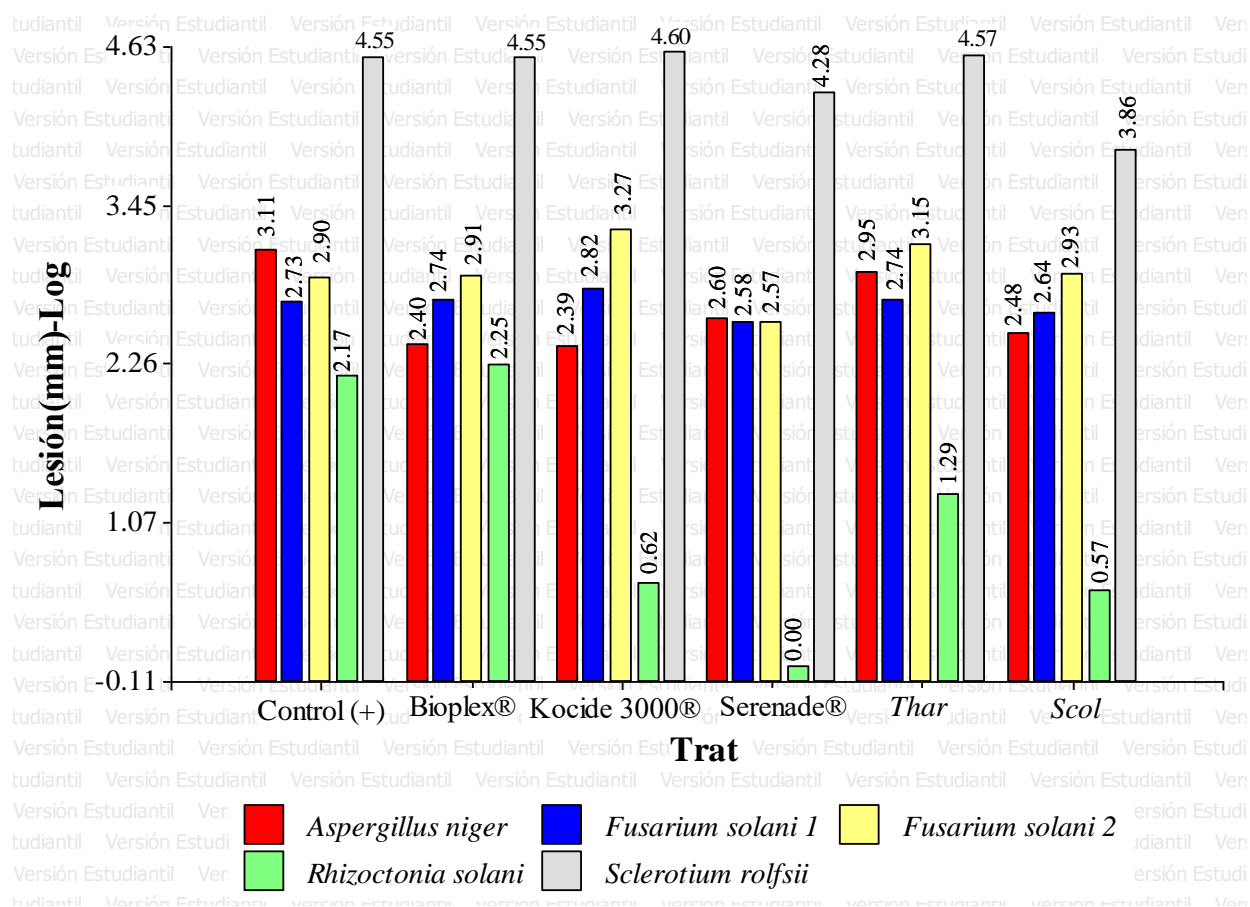




**Figura 3.9.** Tamaño de lesión (log) en discos de cormos según efectos de tratamientos para el ensayo pos-tratamiento en pruebas de control in vitro.

\*DMS=0.40137; Scol= *Scolecobasidium* spp y Thar= *Trichoderma harzianum*

Estudiando un poco donde los Ts ayudaron a reducir las lesiones provocadas por los patógenos, vemos que algunos fueron más favorables que otros. En los efectos simples, vemos que *Scol* disminuyó la lesión de *Sr* (3.86mm) mejor que los demás Ts en comparación con el Control (4.55mm). Serenade® fue el segundo mejor T en disminuir la lesión de *Sr* (4.28mm), sin embargo, disminuyó completamente la lesión de *Rs* (0mm) en comparación con el Control (2.17mm) y los otros Ts. Además, fue el mejor T en reducir la lesión de *Fs* 1 (2.58mm) y *Fs* 2 (2.57mm) en comparación con el Control (2.73mm y 2.90mm, respectivamente) y los demás Ts. Kocide 3000® y Bioplex® redujeron la lesión de *An* (2.39mm y 2.40mm) mejor que los demás Ts en comparación con el Control (3.11mm) (Fig. 3.10).



**Figura 3.10.** Tamaño de lesión (log) (mm) en discos de corno de yautía Nazareno inoculados con hongos patógenos antes de ser tratados (pos tratamiento).

## 3.4 DISCUSIÓN

### 3.4.1 Pruebas de antagonismo

Los ensayos indican que los hongos con mayor capacidad de inhibición de crecimiento de los patógenos asociados al mal seco son *Thar*, *Tri* y *Scol*. *Thar* fue el que mejor inhibió el crecimiento de los patógenos, seguido por *Tri* y, por último, *Scol*. Existen numerosos estudios sobre lo exitoso que es *Trichoderma* spp. inhibiendo el crecimiento de patógenos como *S. rolfsii* y *R. solani*. Corrêa y

colaboradores (2007) encontraron 20 cepas de *Trichoderma* spp. de las cuales cinco eran excelentes biocontroladores de *S. rolfsii* en pruebas de antagonismo. Encontraron además que para obtener micoparasitismo los patógenos y antagonistas debían tener unos genes de especificidad los cuales no necesariamente afectan cualquier patógeno de una especie. En el presente estudio no se observaron ejemplos claros de micoparasitismo; solo se pudo ver un comportamiento similar pero muy leve entre *Thar* y *Sr* y *Thar* y *Fs* 1. En otro estudio se utilizaron 8 cepas de *Trichoderma* spp. las cuales inhibieron más del 90% de los patógenos *S. rolfsii* y *R. solani* (Hoyos-Carvajal et al, 2008). Suárez-Meza y colaboradores (2008) utilizaron 4 cepas nativas de suelos en Colombia y otros 3 de origen comercial de *T. harzianum* contra *F. solani*, patógeno de la parcha. Encontraron de cada muestra excelentes biocontroladores, más competitivos por nutrientes que el patógeno. Encontraron también uno de cada muestra que resultaban tener alto grado de micoparasitismo. En cuanto a *Scol*, es la primera vez que este hongo se reporta como un buen inhibidor de crecimiento de los patógenos asociados al mal seco. A pesar de que no fue efectivo controlando *Sr* en estas pruebas, fue mejor que *Tri* controlando a *Fs* 1, *Rs* y *Py*. Una cepa de *Scolecobasidium* spp., *S. humicola*, ha sido descubierta como hongo endófito de las raíces de tomate, el cual ha resultado en mejor desarrollo de la planta gracias a que le provee una fuente de nitrógeno orgánico (Mahmoud y Narisawa, 2013).

### **3.4.2 Pruebas de control en medio PDA con productos comerciales y biológicos no comerciales**

En el ensayo con productos comerciales, el CuOH (Kocide 3000®) no fue efectivo inhibiendo el crecimiento de los hongos patógenos. La dosis de CuOH en los discos impregnados debió ser más alta. Lo más probable es que el método para emplear el T debió ser enmendando en el medio PDA con una dosis más concentrada del producto. Otra posible explicación es que el medio PDA es altamente nutritivo y recompensa para la toxicidad que pueda provocar en el hongo. Las indicaciones de Kocide 3000® no dicen que se pueda aplicar para controlar hongos en yautía u otro aroide, pero sí en hongos del mismo género el

*Rhizoctonia* que provoca el tizón en el eneldo y *Fusarium* que provoca el tizón en la corona y afecta el trigo, la cebada y la avena (DuPont, 2009). No dice que se utilice en *Pythium* spp. y *S. rolfsii*. Los otros productos, Serenade® y Bioplex®, sí causaron inhibición en el micelio de los patógenos especialmente en *Rs*. Sin embargo, en *Sr* Bioplex® no causó daño debido al crecimiento agresivo del mismo. Bioplex® es un producto con muchos organismos beneficiosos desde cepas de *Trichoderma* spp., *Bacillus* spp. y micorrizas como *Glomus* spp. Sin embargo, para probar la efectividad de estos organismos en medio de cultivo habría que extraerlos por dilución seriada. Como se cultivó directamente el producto en medio de cultivo PDA hubo competencia entre los microorganismos por los nutrientes. Esto dio una ventaja a *Sr* para crecer y dominar en las placas. Por el contrario, Serenade®, inhibió a *Sr*. El ingrediente activo de Serenade® es *Bacillus subtilis*, una bacteria Gram positiva que produce antibióticos, lipopéptidos y metabolitos que funcionan como supresores de especies de hongos como *Rhizoctonia* spp., *Sclerotinia* spp., *Verticillium* spp., *Pythium* spp. y *Fusarium* spp. (Ariza y Sánchez, 2012). Entre los péptidos antifúngicos se encuentran fungistatinas, micobacilinas, micosubtilinas y surfantinas. Algunos metabolitos son quitinasas y otras enzimas que destruyen la pared celular de los hongos (Islam et al, 2012). Islam y colaboradores (2012) citan a El-Banna (2006) que dice que la producción de sustancias antimicrobianas por *B. subtilis* está influenciada grandemente por fuente de Carbono, además de factores como temperatura y pH, que pueden afectar la producción de antibióticos. Es posible que el PDA proveyera una buena fuente de Carbono a *B. subtilis*, ingrediente activo de Serenade® y le permitió ser más efectiva inhibiendo a *Sr*.

En el ensayo con los hongos biocontroladores no comerciales, se encontró que *Thar* y *Scol* inhibieron el crecimiento de los patógenos significativamente más que los controles. Sin embargo, para *Sr* *Scol* no fue efectivo, algo que se confirma de nuevo tras observar los mismos resultados en las pruebas de antagonismo. *Thar*, por lo contrario, sí inhibió el crecimiento de *Sr* en medio de cultivo. En la Fig. 3.7A se observa como *Thar* fue mejor que *Scol* inhibiendo el crecimiento de los patógenos. Por otro lado, los hongos

biocontroladores no resultaron efectivos contra *An*, el cual es un hongo que esporula demasiado y crea muchas sub-colonias, adaptación que le permite ocupar más rápido el espacio en un medio de cultivo.

### 3.4.3 Pruebas de control en discos de cormos en condiciones in vitro

En el ensayo pre-tratamiento, hay muchas diferencias en el efecto de los Ts para cada patógeno. Kocide 3000® fue mejor controlando a *Rs* que los demás Ts, sin embargo, para ambas cepas de *Fs* tuvo un tamaño de lesión mayor que los demás Ts incluyendo el Control. Este descubrimiento nos lleva a las frecuencias de *Fs* para las muestras de suelo y raíces de la Fase 2. En las muestras tratadas con Kocide 3000® había alta incidencia de *Fs* en ambos manejos de suelo. La evidencia encontrada en este ensayo nos señala que las cepas recogidas para este experimento tienen resistencia al fungicida a base de cobre, de otra manera el crecimiento de *Fs* no fuera tan alto para estas cepas, especialmente para *Fs* 1. Se han hallado cepas de *Fusarium* spp. que pueden disolver compuestos metálicos con Cobre y Plomo, siendo especímenes potenciales para prácticas de biorremediación en suelos contaminados con metales pesados (Kumari et al, 2015). Ezzouhri y colaboradores (2009) encontraron cepas de *Fusarium* spp. que tenían índice de resistencia de hasta 99% para crecer en medios enmendados con 1mM de cationes de Cobre. Aunque no se trata de fungicidas a base de cobre, estos ejemplos son lo más cercano en cuanto a cepas de *Fusarium* spp. con resistencia a cobre. *Thar* tuvo también un tamaño de lesión grande en ambas cepas de *Fs*, especialmente en *Fs* 1. La cepa de *Thar* escogida en las pruebas de antagonismo es, lo más probable saprófita facultativa. Aunque en las pruebas de patogenicidad en discos de cormos hizo poco daño al tejido hay que recordar que el hongo estaba en un cilindro de PDA que proveía en poco tiempo la cantidad de nutrientes que necesitaba. En las pruebas de control donde se sumergieron los discos de cormo en una suspensión de *Thar*, el microorganismo no tenía ninguna fuente de alimentación más que el tejido de la yautía y el patógeno cuando este micelio creciera sobre su huésped. Otra teoría es que *Fs* aumentó sus defensas al tener a *Thar* en el tejido y la única fuente de ATP era el huésped, lo que provocó que hiciera más daño al tejido. Por otro lado, los Ts tuvieron efecto en *An*, especialmente *Scol* y *Thar*. Estos últimos ayudaron a que la lesión por el

patógeno fuera menor que Bioplex®, Kocide 3000® y Serenade®, aunque estos últimos tres Ts también fueron efectivos inhibiendo el daño de *An*. Kocide 3000® fue un buen T disminuyendo el daño por *An*. Sin embargo, no tuvo efecto inhibiendo el crecimiento de *An* en medio nutritivo, lo que quiere decir que el medio PDA le ofreció suficientes nutrientes para crecer y multiplicarse, a pesar de tener un agente tóxico en su ambiente. En los discos de corno, como se trataron antes con Kocide 3000®, el patógeno *An* no tenía mucha oportunidad de crecer ya que Kocide 3000® estaba en toda la superficie y también iba a tener que utilizar más energía para digerir el tejido de yautía. Lo mismo ocurrió con Bioplex® y Serenade®. En los ensayos en medio de cultivo, estos no fueron efectivos contra *An* ya que es un hongo saprófito y en un medio altamente nutritivo podía alimentarse y crecer más rápido que en tejido de yautía. Para *Sr*, *Thar* no permitió que el patógeno creciera exitosamente como en los demás Ts. Sin embargo, se necesita analizar bien los datos ya que hubo mucha variabilidad que pudo ser provocada porque los tamaños de discos de corno no fueron homogéneos y el patógeno crece agresivamente e invade toda la superficie de la pulpa provocando que la medida sea igual al diámetro del disco de corno.

En el ensayo pos-tratamiento (aplicación por atomizador), se observan diferencias entre los Ts. No se observaron interacciones significativas (valor- $p=0.0520$ ) y los Ts que mejor protegieron el tejido fueron Serenade® y *Scol*, siendo Serenade® uno de los que menos protegieron el tejido para el ensayo pre-tratamiento. Al estudiar los efectos simples, se observó que Serenade® inhibió mejor el crecimiento de *Fs* 1, *Fs* 2, *Rs* y *Sr* cuando en el ensayo pre-tratamiento ningún T fue efectivo contra las cepas de *F. solani*. Serenade® fue un poco efectivo contra *Rs*, pero no contra *Sr* en el ensayo pre-tratamiento. Es posible que la aplicación por atomizador permitiera un contacto más directo de los agentes de estos Ts. A pesar de que se prepararon bien las suspensiones de hongos, la cantidad de micelio que tenía *Thar* pudo ser muy densa y esto pudo obstaculizar un poco el tránsito de esporas por el atomizador para que pudiera colonizar el tejido de yautía y tener contacto directo con el patógeno. La suspensión con Serenade® es la más fácil de preparar y está tiene una concentración estándar donde solo hay que diluirla en agua y aplicar.

Increiblemente, *Scol* fue también más efectivo en controlar el daño de *Sr* que *Thar* en el ensayo pos tratamiento, pero esto no se puede explicar con claridad por la falta de homogeneidad en los discos usados, ya que *Sr* crece agresivamente y cubre completamente el tejido de yautía.

### 3.5 CONCLUSIÓN

Los hongos obtenidos en las pruebas de antagonismo, *Thar* y *Scol*, tienen potencial biocontrolador de los hongos patógenos asociados al mal seco. De los dos, *Thar* resultó ser más efectivo en controlar hongos como *Sr*, que se ha reportado como el más agresivo en el cultivo de la yautía (Bejarano-Mendoza, 1998). Sin embargo, la efectividad de estos Ts se realizó a nivel de laboratorio y es necesario adaptarla al campo. La aplicación de *Thar* puede ser difícil para el agricultor ya que requiere muchas veces que se crezca en algún tipo de sustrato como lo es el arroz cocido. Kocide 3000® fue efectivo controlando *Rs* en tejido de cormo. Serenade® es también un producto a recomendar ya que fue efectivo en la prueba de control pos-tratamiento en tejido in vitro y en medio de cultivo. Podría ser efectivo un T asperjado en los cormos antes de la siembra o pos cosecha para que proteja contra patógenos del mal seco. Según Bosques (2016) en la EEA de Isabela se utiliza Bioplex® el cual ha dado buenos resultados en los rendimientos de yautía. Se necesita seguir trabajando con la innovación de productos de control biológico que sean compatibles a las condiciones de la yautía para ayudar a controlar efectivamente la enfermedad del mal seco y fortalecer la industria de yautía, la cual ayudará al crecimiento de la economía local.

### 3.6 BIBLIOGRAFÍA

- Ariza, Y., and L. Sánchez,** 2012. Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova* 10 (18): 149–155.
- Baker, K., & R.J. Cook,** 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco: Freeman, pp. 433.
- Bejarano-Mendoza, C. A., M. Zapata, A. Bosques, E. Rivera-Amador y L.J. Liu,** 1998. *Sclerotium rolfsii* como componente del complejo patológico causante del mal seco de la yautía (*Xanthosoma sagittifolium*) en Puerto Rico. *J. Agric. Univ. PR* 82 (1-2): 85-95.
- Bosques, A.** (2016). Comunicado personal sobre el uso de Bioplex® en siembras de yautía.

- Corrêa, S., M. Mello, Z.R. Ávila, L. Minaré-Braúna, R.R. Pádua, y D. Gomes**, 2007. Cepas de *Trichoderma* spp. para el control biológico de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Fitosanidad 11 (1): 3-9.
- DuPont**, 2009. Kocide 3000®. Wilmington, DE: DuPont Canada Company Agricultural Products, 17 pp. PDF.
- EL-Banna, N.M.**, 2006. Effect of carbon source on the antimicrobial activity of *Corynebacterium kutscheri* and *Corynebacterium xecroris*. Afr J Biotechnol 5: 833-5.
- Ezzouhri, L., E. Castro, M. Moya, F. Espinola, & K. Lairini**, 2009. Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier, Morocco. African Journal of Microbiology Research 3(2): 35-48.
- Hoyos-Carvajal, L., P. Chaparro, M. Abramsky, I. Chet, y S. Orduz**, 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. Agronomía Colombiana 26(3): 451-458.
- Islam, M.R., Y.T. Jeong, Y.S. Lee, & C.H. Song**, 2012. Isolation and Identification of Antifungal Compounds from *Bacillus subtilis* C9 Inhibiting the Growth of Plant Pathogenic Fungi. *Mycobiology* 40(1): 59-66.
- Kotasthane, A., T. Agrawal, R. Kushwah, & O. V. Rahatkar**, 2014. In-vitro antagonism of *Trichoderma* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* and their response towards growth of cucumber, bottle gourd and bitter gourd. European Journal of Plant Pathology 141(3): 523-543.
- Kumari, D., X. Pan, V. Achal, D. Zhang, F. A. Al-Misned, and M. Golam Mortuza**, 2015. Multiple metal-resistant bacteria and fungi from acidic copper mine tailings of Xinjiang, China. Environmental Earth Sciences 74: 3113-3121.
- Mahmoud, R.S., K. Narisawa**, 2013. A New Fungal Endophyte, *Scolecobasidium humicola*, Promotes Tomato Growth under Organic Nitrogen Conditions. PLoS ONE 8(11): e78746.
- Pal, K.K. and B. McSpadden Gardener**, 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor, 25 pp. PDF.
- Plaza Delestre, J. A.**, 1994. La etiología del mal seco de la yautía (*Xanthosoma* sp. (L.) Schott) en Puerto Rico. Tesis de maestría, Recinto Universitario de Mayagüez de la Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico.
- Suárez Meza, C.L., R.J. Fernández Barbosa, N. Osvaldo Valero, R.M. Gámez Carrillo, y A.R. Páez Redondo**, 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. Rev. Colomb. Biotecnol. 10(2): 35-43.



## 4 CONCLUSIONES GENERALES

El peso de cormos, raíces y follaje resultó mayor en el suelo en descanso (SD) que en el suelo de uso continuo (SC) bajo condiciones de invernadero. Estos resultados concuerdan con los resultados de campo obtenidos por Bosques (1990) y por Zapata y Bosques (2015), donde los rendimientos disminuyeron drásticamente cuando se sembró yautia por segunda vez en la misma parcela. La incidencia de la enfermedad del mal seco aumentó en suelos de uso continuo y se relacionó a rendimientos menores.

Se aislaron hongos de muestras de raíces y suelo y se utilizaron en pruebas de patogenicidad bajo condiciones de invernadero y laboratorio. Por primera vez, se describen por origen, descripción de la colonia, morfología y relación patológica de treinta hongos asociados a la yautia selección Nazareno. *Fusarium solani* fue el hongo asociado a la enfermedad del mal seco de mayor abundancia en las muestras mientras que *Sclerotium rolfsii* resultó el hongo más virulento. Éstos resultados concuerdan con los hallazgos de Bejarano-Mendoza y asociados (1998) donde encontraron a *S. rolfsii* como el hongo más agresivo del complejo del mal seco. Los hongos *Trichoderma harzianum* (*Thar*) y *Scolecobasidium* spp. (*Scol*) resultaron con potencial biocontrolador de los hongos asociados al mal seco. *Thar* controló a *S. rolfsii* y a *Aspergillus niger* mejor que los otros tratamientos; Kocide 3000® controló significativamente a *Rhizoctonia solani* en tejidos pre-tratados con el producto. En el ensayo pos-tratamiento *Scol* fue el más efectivo en el control de *S. rolfsii*, mientras que el producto Serenade® fue mas efectivo en el control de *R. solani* y de las cepas de *F. solani*, y Kocide 3000® en el control de *A. niger*. Dichos tratamientos tienen potencial de uso en los cormos antes de la siembra a nivel de campo y durante el periodo de almacenamiento.