

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS
FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A CUATRO CULTIVARES DE
ARROZ (*Oryza sativa*) DE PANAMÁ**

ANGÉLICA A. PALMA A.
4-785-2101

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2020

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS
FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A CUATRO CULTIVARES DE
ARROZ (*Oryza sativa*) DE PANAMÁ**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN SOMETIDO PARA OPTAR POR EL
TÍTULO DE INGENIERO AGRÓNOMO EN CULTIVOS
TROPICALES**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS**

**PERMISO PARA SU PUBLICACIÓN, REPRODUCCIÓN TOTAL O
PARCIAL DEBE SER OBTENIDA DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS**

APROBADO:

PROF. ING. JOSÉ C. URETA

DIRECTOR

DRA. DÉLFIDA RODRÍGUEZ J.

ASESOR

PROF. ING. SIMÓN VÁSQUEZ

ASESOR

DAVID, CHIRIQUÍ

REPÚBLICA DE PANAMÁ

2020

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la **Dra. Délfida Rodríguez Justavino** por brindarme la oportunidad de formar parte del proyecto de arroz codificado como 501.B.01.08., el cual pertenece al Programa Nacional de Investigación e Innovación en Recursos Genéticos y Biodiversidad (PIIRGEB) del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP). Además, agradecer al Sistema Nacional de Investigación (SNI), SENACYT, quienes a través del Proyecto titulado “Fortalecimiento de equipamiento e instrumentación para afrontar desafíos de investigación en la agricultura de Panamá” codificado como EIE 17-011 proporcionaron el equipo utilizado en esta investigación.

Es importante resaltar mi agradecimiento a los docentes de la carrera de Ingeniería Agrónoma en Cultivos Tropicales, quienes contribuyeron en mi formación académica y me impartieron sus conocimientos además de instruirme en valores, en especial a los profesores **José Carlos Ureta, Simón Vásquez y Javier Almillátegui**, por su atinado asesoramiento durante mi vida universitaria y el desarrollo de mi trabajo de graduación.

Angélica Alejandra Palma Araúz

DEDICATORIA

El presente trabajo investigativo lo dedico a mi padre **Quintín Palma Quiel** quien fue mi fuente de inspiración, despertando en mí la pasión y el amor por la agricultura.

También a mi madre **Argely A. Araúz de Palma**, por su apoyo incondicional y palabras de motivación que día tras día me brindaron el impulso para seguir adelante con este proyecto.

Angélica Alejandra Palma Araúz

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A CUATRO CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*) DE PANAMÁ

Angélica Alejandra Palma Araúz. 2020. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS A CUATRO CULTIVARES DE ARROZ (*Oryza sativa*) DE PANAMÁ. Tesis. Ingeniería Agronómica en Cultivos Tropicales. Chiriquí, Panamá. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Panamá.

RESUMEN

El presente estudio se desarrolló en el laboratorio de Protección Vegetal del Subcentro de Alanje, del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP); en el periodo comprendido desde el 7 de enero de 2019 hasta el 13 de diciembre de 2019, sobre cuatro cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) del país. Tres de ellos cultivares codificados: 1) rendimiento 1, parcela 12, localidad Berbá, Barú, provincia de Chiriquí; 2) rendimiento 1, parcela 20, localidad Berbá, Barú, provincia de Chiriquí; 3) rendimiento 1, parcela 2, localidad Canta Gallo, provincia de Chiriquí y uno corresponde a la siguiente variedad: 4) cultivar Estrella 71, localidad Guánico Abajo, Agrícola DELI, provincia de Los Santos. El objetivo de esta investigación fue la identificación a nivel taxonómico de especies de hongos fitopatógenos asociados a cuatro cultivares de arroz de Panamá. Se realizaron aislamientos en cámaras húmedas e incubación en medios de cultivo PDA, CLA y Agar Agua, para la obtención de cultivos puros y posterior caracterización de estructuras macroscópicas y microscópicas. Se emplearon las claves taxonómicas Ou (1985), Sivanesan (1992) y Seifert (1996). Los resultados indicaron la presencia de las siguientes especies de hongos: *Curvularia cf. lunata*, *Curvularia cf. geniculata*, *Curvularia cf. verruculosa*, *Fusarium sp.*, *Nigrospora oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Bipolaris sorokiniana*, confirmando la existencia de interacción entre las especies de hongos fitopatógenos antes mencionadas y el cultivo del arroz.

PALABRAS CLAVES: *Oryza sativa* L., hongos fitopatógenos, aislamiento, incubación, cultivos puros, taxonomía, cultivares codificados, Estrella 71.

MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI ASSOCIATED WITH FOUR RICE (*Oryza sativa*) CULTIVARS FROM PANAMA.

Angelica Alejandra Palma Arauz. 2020. MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI ASSOCIATED WITH FOUR RICE (*Oryza sativa*) CULTIVARS FROM PANAMA. Thesis. Agronomic Engineering in Tropical Crops. Chiriqui, Panama. University of Panama. Faculty of Agricultural Sciences.

ABSTRACT

The present study was developed in the Plant Protection Laboratory of Alanje Sub-center, of the Agricultural Research Institute of Panama (IDIAP), in the period between January 7, 2019 and December 13, 2019; on four rice cultivars (*Oryza sativa* L.) of the country. Three of them coded cultivars: 1) yield 1, plot 12, locality Berba, Baru, Chiriqui province; 2) yield 1, plot 20, locality Berba, Baru, Chiriqui province; 3) yield 1, plot 2, Canta Gallo locality, Chiriqui province, and one corresponds to the following variety: 4) cultivar Estrella 71, Guánico Abajo locality, Agrícola DELI, Los Santos province. The objective of this investigation was the identification at a taxonomic level of phytopathogenic fungal species associated with four rice cultivars in Panama. Isolations were made in humid chambers and incubation in PDA, CLA and Water Agar culture media, to obtain pure cultures and subsequent characterization of macroscopic and microscopic structures. The taxonomic keys Ou (1985), Sivanesan (1992) and (Seifert, 1996) were used. The results indicated the presence of the following species of fungi: *Curvularia cf. Lunata*, *Curvularia cf. geniculata*, *Curvularia cf. verruculosa*, *Fusarium sp.*, *Nigrospora oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Bipolaris sorokiniana*, confirming the existence of interaction between the aforementioned phytopathogenic fungal species and rice cultivation.

KEY WORDS: *Oryza sativa* L, phytopathogenic fungi, isolation, incubation, pure cultures, taxonomy, encoded cultivars, Estrella 71.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA.....	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
INDICE DE ANEXOS	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Problema o Tema de Estudio	3
1.2 Antecedentes	4
1.3 Justificación.....	5
1.4 Objetivos	7
1.4.1 General	7
1.4.2 Específicos.....	7
1.5 Hipótesis	8
1.6 Alcances y Limitaciones	9
II. REVISIÓN DE LITERATURA	10
2.1 El cultivo del arroz.....	10
2.2 Clasificación taxonómica	10
2.3 Descripción de los principales hongos fitopatógenos que afectan el arroz	11
2.4 Hongos fitopatógenos	15
2.4.1 Características generales.....	16
2.4.1.1 División de los hongos	16
2.4.1.2 Hongos Ascomycetes	18
2.4.1.3 Fases reproductivas de los hongos Ascomycetes.....	19
2.4.2 Hongos como patógenos de las plantas	19
2.5 Aislamiento de hongos fitopatógenos.....	20
2.5.1 Calidad de la muestra	21
2.5.2 Observación directa	21

2.5.3 Incubación en papel secante (cámara húmeda)	22
2.5.4 Incubación en medio de cultivo	23
2.5.4.1 Medios de cultivo	23
2.6 Identificación del hongo fitopatógeno	24
2.7 Clasificación taxonómica de hongos fitopatógenos	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1 Ubicación y descripción del área de estudio.....	27
3.2 Metodología	29
3.2.1 Recolección de muestras en campo	29
3.2.2 Procesamiento de muestras en el laboratorio	29
3.2.3 Preparación de medios de cultivo para el aislamiento de hongos fitopatógenos	29
3.2.4 Aislamiento	30
3.2.5 Purificación	31
3.2.6 Inoculación.....	33
3.2.7 Incubación.....	35
3.2.8 Identificación	35
3.2.9 Descripción	36
3.3 PARÁMETROS A EVALUAR	37
IV. RESULTADOS.....	38
V. DISCUSIÓN	57
VI. CONCLUSIONES	61
VII. RECOMENDACIONES	62
VIII. REFERENCIAS CITADAS	63
ANEXOS	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.: **A – B.** Cámaras húmedas de granos en papel filtro. **C – D.** Lesiones en tejido foliar seleccionadas para asilamiento en cámara húmeda. Fuente: Angélica Palma. **30**

Figura 2.: Siembra de grano directo en medio de cultivo PDA con antibiótico, vista dorsal y ventral del plato respectivamente. Fuente: Angélica Palma. **31**

Figura 3.: Medio de cultivo PDA con antibiótico mostrando crecimiento de dos hongos fitopatógenos simultáneamente (*Curvularia sp.* en la parte superior y *Fusarium sp.* en la parte inferior), vista dorsal y ventral del plato respectivamente. Fuente: Angélica Palma. **32**

Figura 4.: **A – B.** Rayado en medio de cultivo Agar Agua, para cultivo monospórico, vista dorsal y ventral del plato respectivamente. **C – D.** Cultivo monospórico desarrollado a partir de una espora de *Bipolaris sp.* Fuente: Angélica Palma. **33**

Figura 5.: **A – B.** *Fusarium* en medio de cultivo CLA, vista ventral y dorsal del plato respectivamente. **C.** Micelio extraído creciendo en grano de cámara húmeda para siembra en CLA. **D.** Crecimiento de *Fusarium sp.* en hoja de clavel. Fuente: Angélica Palma. **34**

Figura 6.: Morfología de *Curvularia cf. lunata*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del plato respectivamente. **C.** Conidios mostrando tres septos. **D.** Conidióforo subtendiendo los conidios en la parte apical. **E – F.** Conidios con germinación polar. Fuente: Angélica Palma. **40**

Figura 7.: Morfología de *Curvularia cf. verruculosa*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del plato respectivamente. **C.** Conidios mostrando hilum no protuberante. **D.** Conidióforo mostrando la cicatriz de inserción del conidio. **E.** Conidios mostrando tres septos. **F.** Conidióforo erecto, flexuoso en la parte apical, subtendiendo los conidios. Fuente: Angélica Palma. **42**

Figura 8.: Morfología de *Curvularia cf. geniculata*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del plato respectivamente. **C.** Conidióforo flexuoso y curvado en la parte apical. **D.**

Conidios mostrando cuatro septos e hilum protuberante. **E.** Conidióforo erecto subtendiendo los conidios en la parte apical. Fuente: Angélica Palma. **44**

Figura 9: Morfología de *Nigrospora cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo. **C – D.** Células conidiógenas subtendiendo a los conidios. **E.** Conidióforo y vesícula. Fuente: Angélica Palma..... **46**

Figura 10.: Morfología de *Nigrospora cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo. **C.** Conidios. **D.** Células conidiógenas dando lugar a conidios. **E.** Hifa que produce célula conidiógena, subtendiendo conidios. Fuente: Angélica Palma..... **48**

Figura 11.: Morfología de *Fusarium sp.* **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo a los 6 días de crecimiento. **C – D.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo a los 30 días de crecimiento. **E.** Conidio desarrollado con cinco septos. **F.** Conidios en diferentes estadios de desarrollo. **G – I.** Clamidosporas en posición intercalar, catenuladas, terminales, solitarias y en pares. Fuente: Angélica Palma. **50**

Figura 12.: Morfología de *Bipolaris cf. sorokiniana*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del del plato. **C – D.** Conidióforo flexuoso en la parte apical subtendiendo los conidios. **E.** Conidios con 8 pseudoseptos. **F.** Conidio con hilum protuberante. **G – H.** Conidio atípico bifurcado. Fuente: Angélica Palma. **52**

Figura 13.: Morfología de *Bipolaris cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del plato. **C.** Conidio mostrando germinación bipolar. **D.** Conidio unido al conidióforo. **E.** Conidio con hilum poco protuberante, 10 pseudoseptos. **F.** Conidióforo, mostrando punto de inserción del conidio. Fuente: Angélica Palma. **54**

Figura 14.: Morfología de *Bipolaris cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo. **C.** Conidios jóvenes mostrando hilum poco protuberante. **D.** Conidio con 10 pseudoseptos. **E.** Conidio con germinación bipolar. **F.** Conidióforo subtendiendo los conidios, mostrando punto de inserción del conidio. Fuente: Angélica Palma. **56**

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Glosario de términos.....	72
Anexo 2. Procedimiento para la preparación de medio de cultivo Papa, Dextrosa, Agar (PDA).....	77
Anexo 3. Procedimiento para la preparación de medio de cultivo Agar Agua. ..	78
Anexo 4. Procedimiento para la preparación de medio de cultivo Hojas de Clavel, 9Agar, Agua (CLA). ..	79
Anexo 5. Procedimiento para la elaboración de Polyvinilalcohol.....	80

I. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) pertenece a la familia Poaceae, orden de los Poales. Es una gramínea anual, de tallos redondos y huecos compuesto de nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina y su inflorescencia es en panícula. El arroz es una de las plantas más adaptables a diversas condiciones ambientales, se cultiva en casi todas las partes del mundo, tanto en pequeñas parcelas como en grandes extensiones (CENTA, 2018).

Desde el punto de vista de la producción mundial de cereales, el arroz ocupa el segundo lugar en importancia, después del trigo. Es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Muchos lo consideran el cultivo más importante del mundo, principalmente si se toma en cuenta la extensión cultivada y la cantidad de gente que depende de su cosecha. Más del 40% de la población mundial depende del arroz para el 80% de su dieta y proporciona el 20% del consumo de calorías *per cápita* en todo el mundo (Benavides *et al.*, 2005).

Panamá es uno de los países del área centroamericana con mayor consumo *per cápita* de arroz, uno de los alimentos indispensables en la dieta del panameño. En consecuencia, su producción tiene una gran importancia a nivel social, político, económico y, sobre todo, en lo relacionado a la seguridad alimentaria (IICA, 2009).

Debido a las condiciones ambientales de nuestro país, principalmente el régimen de lluvias existe una gran incidencia de enfermedades causadas principalmente por hongos fitopatógenos, entre ellos resaltan: *Fusarium* Link, *Nigrospora oryzae*

(Berk. & Broome) Petch, *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn, *Curvularia geniculata* (Tracy & Earle) Boedijn, *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker. En el caso de enfermedades fúngicas el adecuado diagnóstico y la exclusión de síntomas similares de menor importancia, son factores decisivos en la toma de decisiones en cuanto al manejo del cultivo.

Un adecuado diagnóstico se basa principalmente en la observación de síntomas y el estudio de los organismos asociados en comparación con registros existentes. En el caso de los hongos, donde la complejidad de los sistemas reproductivos permite apreciar una alta diversidad de estructuras tanto asexuales como sexuales, esta información debe ser complementada con la obtención de cultivos puros del patógeno por técnicas microbiológicas de aislamiento, además del empleo de la microscopía y estudios taxonómicos (Gaitán, 2003). La taxonomía desempeña un papel importante ya que resulta una herramienta útil para la identificación no sólo del género sino también de la especie del organismo agresor, apoyada principalmente en la recolección de datos cualitativos, caracterizaciones, y el empleo de claves taxonómicas.

Todas las clasificaciones de organismos, tanto a nivel de especie como de grandes grupos taxonómicos, se han basado en el uso de análisis anatómicos y/o morfológicos, producto de la enorme variabilidad de estos organismos en el entorno en el que se desarrollan, como resultado de la correlación entre forma y evolución. (Universidad Complutense de Madrid, 2005).

1.1 Problema o Tema de Estudio

Las enfermedades en el cultivo de arroz constituyen uno de los principales dilemas a afrontar en la producción de este rubro, su impacto trae consigo efectos a nivel social y económico, como lo son, aumento de los costos de producción, disminución de la producción agrícola, menor calidad de los productos, cambios en los precios de los productos y productos inadecuados para el consumo humano o animal (MIDA, 2014).

Pérdidas significativas son causadas por varios fitopatógenos agentes causales de enfermedades, dentro de los cuales resaltan, el nemátodo de la punta blanca (*Aphelenchoides besseyi* Christie); el añublo bacterial de la hoja [*Xanthomonas campestris pv. oryzae* (Ishiyama) Dye]; el escaldado de la hoja [*Microdochium oryzae* (Hashioka & Yokogi) Samuels & I. C. Hallett (teleomorfo: *Griphosphaerella albescens* (Thüm.) Arx)]; la mancha parda de la hoja [*Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker] y el quemado o añublo [*Pyricularia oryzae* Cavara (teleomorfo: *Magnaporthe oryzae* B.C. Couch)] (CIAT, 1985).

Según Juárez *et al.* (2010), a nivel mundial los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y daño que pueden causar, esto debido a su capacidad de adaptarse a diferentes agroecosistemas y afectar los cultivos en zonas templadas, tropicales y bajo cualquier sistema de cultivo, bien sea seco, seco favorecido o irrigado (Prado, 2016).

El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica. Estos microorganismos constituyen un grupo de mucha importancia en la agricultura debido a su gran número y su enorme capacidad de reproducción (Juárez *et al.*, 2010). Un diagnóstico oportuno que detecte el agente causal de un evento patológico es fundamental para el manejo del problema, y ello contribuye a: generar medidas de control efectivas, permite la optimización de los recursos, la reducción de los efectos negativos en el medio ambiente y a la vez origina información respecto a la interacción patógeno hospedante (Rivas *et al.*, 2008).

1.2 Antecedentes

En Panamá existen registros de estudios donde se emplea el aislamiento e identificación de hongos utilizando claves taxonómicas, caracterizaciones y comparaciones con especímenes de diferentes herbarios.

En el análisis de: “Dos nuevas especies de *Appendiculella* (Meliolaceae) de Panamá (Rodríguez y Piepenbring, 2007)”, se llevó a cabo mediciones de ascosporas y estructuras celulares, además de la preparación de placas semipermanentes para su posterior análisis, datos comparados con Hansford (1961, 1963) donde se presentan descripciones e ilustraciones de todas las especies conocidas de Meliolales.

Por otra parte, en la investigación de “Nuevas especies y nuevos registros de Meliolaceae de Panamá (Rodríguez et al., 2015)”, se colectaron plantas con hongos (Melilales), de donde se extrajeron hifas y peritecios visualizadas en placas semipermanentes. Estas nuevas colecciones fueron añadidas al Herbario Nacional de la Universidad de Panamá (PMA). Las especies de Meliolaceae fueron identificadas utilizando Hansford (1961, 1963) y a través de comparaciones con especímenes prestados del herbario BPI (Beltsville: U. S. National Fungus Collections, U. S. A.), DAR (Plant Pathology Herbarium, New South Wales, Australia), K (Royal Botanic Gardens, Kew, England, U. K.), M (Botanische Staatssammlung, München, Deutschland), PMA (Herbario de la Universidad de Panamá), y S (Herbarium, Botany Departments Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Schweden).

1.3 Justificación

En Panamá el cultivo del arroz es el rubro de mayor importancia a nivel nacional, por lo tanto, resulta fundamental centrar la investigación en la línea de taxonomía con el fin de obtener información referente a la biodiversidad de los microorganismos y generar una base de datos de hongos asociados a los cultivares de arroz Estrella 71 y cultivares codificados del IDIAP.

El arroz es uno de los productos agrícolas cuya producción y consumo han experimentado un gran auge en los últimos años (Franquet, 2004). Es el alimento básico en la dieta del panameño con un consumo per cápita anual de 154.32 libras

(70 kilogramos), lo que nos sitúa como uno de los países de mayor consumo en América Latina (Lasso, 2017). La siembra de arroz como actividad comercial es un importante generador de empleo durante todo el año; además, contribuye con un 2,5% del producto interno bruto del país (MEF, 2017).

El arroz en Panamá forma parte importante de la problemática agropecuaria, por ser uno de los componentes básicos de la dieta de los panameños, gran parte de este problema se da como resultado del cambio climático, incrementos considerables en los costos de producción y una notable disminución en el promedio de producción por hectárea (MIDA, 2014). Como medida atenuante a la situación antes planteada, en los últimos años los cultivares de arroz han ido variando, mediante una gradual renovación de los más antiguos, en función de las mejores características, de forma que los nuevos cultivares ofrezcan mejores rendimientos, mayor resistencia al “encamado”, mejor calidad de grano o bien una mayor producción (Franquet, 2004). El reto en la producción de arroz se centra en el desarrollo de cultivares con resistencia a factores adversos asociados al cambio climático como son la sequía y altas temperaturas, pero los mismos deben llevar un componente esencial de resistencia a las principales plagas y enfermedades (Prado, 2016).

Los hongos han sido descritos como los principales causantes de diferentes enfermedades del arroz. Este fenómeno se ve grandemente influenciado por las condiciones ambientales de nuestro país, principalmente la elevada pluviosidad, que propicia un ambiente perfecto para el desarrollo y proliferación de gran cantidad de hongos fitopatógenos de relevancia en este rubro (Almaguer, 2008).

Es por ello que la correcta evaluación de las enfermedades se convierte en un medio útil para la toma de decisiones en cuanto al manejo del cultivo, donde adquiere gran relevancia la exposición de un diagnóstico adecuado de la enfermedad que nos facilite la identificación del patógeno. El conocimiento fiable sobre las causas de cualquier evento patológico es de singular valor, pues de ello dependerá, en gran medida, la eficacia de las prácticas de regulación que se apliquen y la sostenibilidad económica, social y ambiental de las mismas. En el desarrollo de un sistema de manejo de enfermedades funcional el diagnóstico de casos y la evaluación de riesgos de enfermedades juegan un peso fundamental (Rivas *et al.*, 2008).

1.4 Objetivos

1.4.1 General

Observar, diagnosticar, identificar y documentar las características morfológicas de hongos fitopatógenos en los cultivares de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP.

1.4.2 Específicos

- Observar y analizar lesiones presentes en hojas y granos correspondientes a los cultivares de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP, implementando estereoscopio y microscopio de luz.
- Diagnosticar la presencia de hongos fitopatógenos en los cultivares de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP, a través del aislamiento de

hojas y granos en cámaras húmedas y medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Hojas de Clavel-Agar-Agua (CLA) y Agar Agua, para la posterior purificación del hongo.

- Identificar la presencia de hongos fitopatógenos en el cultivar de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP, a través del análisis de descripciones morfológicas y comparación de caracteres empleando claves taxonómicas.
- Documentar hongos fitopatógenos en el cultivar de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP, mediante la recolección y registro de datos cualitativos, morfométricos y morfológicos, empleando microscopio de luz y cámaras fotográficas.

1.5 Hipótesis

Hipótesis de Investigación

Hi: El aislamiento y posterior caracterización morfológica de hongos fitopatógenos permiten la identificación de estos organismos a nivel taxonómico en el cultivo del arroz.

Hipótesis Nula

H₀: El aislamiento y posterior caracterización morfológica de hongos fitopatógenos no permiten la identificación de estos organismos a nivel taxonómico en el cultivo del arroz.

1.6 Alcances y Limitaciones

Alcances

Esta investigación permitió la identificación a nivel taxonómico de hongos fitopatógenos asociados a cuatro cultivares de arroz de Panamá, proporcionando información relacionada a la morfología y características principales de estos organismos. Esto posibilita sentar las bases en un futuro para la elaboración de una base de datos de hongos fitopatógenos asociados al cultivo del arroz en Panamá.

Limitaciones

La principal limitante en el desarrollo de esta investigación fue la disposición de infraestructuras que no contaban con los estándares necesarios para el procesamiento y análisis de muestras.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El cultivo del arroz

De acuerdo a Hung-Chun *et al.* (2016), el arroz es un alimento básico importante y un pilar para la población mundial y su seguridad alimentaria. Es el segundo cereal más cultivado en todo el mundo. Pertenece a la familia Poaceae y tiene dos subespecies principales, Japonica e Indica.

Según Beighley (2010), el arroz se cultiva como planta anual, pero en los trópicos se puede cultivar como planta perenne. El arroz prefiere un clima tropical o cálido, con mucha lluvia. Pero si hay agua de riego disponible, el arroz también se puede cultivar en áreas más secas o durante la estación seca. El arroz suele ser una planta autopolinizante, pero es posible la polinización cruzada por el viento. Dependiendo de la variedad y el suelo, las plantas de arroz suelen tener entre 1 y 1,8 metros de altura. El arroz generalmente se cultiva en suelos más pesados que tienen una buena capacidad de retención de agua.

2.2 Clasificación taxonómica

De acuerdo a Rodríguez (2017), la clasificación taxonómica del arroz es la siguiente:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Subdivisión:	Magnoliophytina
Clase:	Liliopsida
Subclase:	Liliidae
Superorden:	Commelinanae
Orden:	Poales
Familia:	Poaceae
Subfamilia:	Oryzoideae
Tribu:	Oryzeae
Género:	Oryza
Especie:	<i>Oryza sativa</i> L.

2.3 Descripción de los principales hongos fitopatógenos que afectan el arroz

El arroz es un cultivo que se ve gravemente afectado durante todo su ciclo de producción por enfermedades, dentro de ellas las de mayor relevancia son aquellas causadas por hongos fitopatógenos, los cuales provocan un gran número de pérdidas económicas en todo el mundo en cualquier sistema de producción. A continuación, una breve descripción de los principales hongos fitopatógenos causantes de patologías importantes en el arroz:

Bipolaris oryzae (Breda de Haan) Shoemaker, Canadian Journal of Botany 37 (5): 883 (1959)

Pertenece a la familia Pleosporaceae, orden Pleosporales, corresponde al estado anamorfo del hongo; presenta manchas foliares ovales u ovoides, marrones, a veces púrpuras, con borde rojo marrón a marrón oscuro y centro blanco a gris o gris a marrón pálido, a menudo rodeado de halo amarillo. Morfología Asexual en PDA se caracteriza por presentar hifas hialinas a café pálido, ramificadas, septadas. Los conidióforos surgen solos o en grupos, septados, rectos o flexibles, a veces geniculados en la parte superior, el tamaño de las células no disminuye hacia el ápice, a veces ramificado, las paredes de las células son más gruesas que las hifas vegetativas, mononematosas, semi a macronematosas, de color marrón pálido a marrón a negro, más pálido hacia el ápice, a veces hinchado en la base. Conidias de paredes lisas, mayormente curvas, naviculares, fusiformes, obclavadas o cilíndricas, de color marrón pálido a marrones, células apicales y basales a veces ligeramente más pálidas que las células medias, (4–) 6–10 (–12) distoseptos, hilum ligeramente sobresaliente, oscurecido, engrosado. Esporulación secundaria en algunos conidios. Características culturales: abundante micelio aéreo que da una apariencia algodonosa, esponjosa; reverso oliváceo a oliváceo oscuro; superficie grisácea a olivácea (Marin, 2011).

Fusarium sp. Link, Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin 3 (1): 10 (1809)

Fusarium es un hongo de la familia Nectriaceae, orden Hypocreales, representa el estado imperfecto. Los géneros que representan a *Fusarium* como teleomorfo son *Albonectria*, *Gibberella* y *Haematonectria* (Arbeláez, 2000).

Gaviria (2013), explica que la fiálide es generalmente fina, con forma de botella, simple o ramificada, cortas o largas, monofialídica (que emergen esporas de un poro de la fiálide) o polifialídica (de varios poros); los macroconidios presentan forma de medialuna, hialinos y septados; los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovals, clavadas, entre otras), agrupaciones (estructuras mucoides llamadas "falsas cabezas"), en cadenas largas o cortas; clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo. Mientras que las características macroscópicas propias de las colonias del hongo incluyen textura algodonosa, rara vez levaduriforme, con pigmentos salmón, morado, rosado, café claro, amarillo o gris.

Curvularia sp. Boedijn, Bulletin du Jardin Botanique de Buitenzorg 13 (1): 123 (1933)

Pertenece a la familia Pleosporaceae, orden Pleosporales; sus colonias son de crecimiento rápido de apariencia afieltrada con anillos concéntricos, de verde oliváceo oscuro a negro; conidióforos rectos o flexuosos, solitarios o en grupos, ocasionalmente geniculados hacia el ápice, septados, de pardo a pardo oscuro, más claros en el extremo apical; conidios generalmente curvos, elipsoidales o fusiformes, con cuatro o tres septos mayoritariamente, lisos, las células de los

extremos de subhialinas a pardo claro, las intermedias pardo medianamente oscuro, con la central notablemente más oscura y abultada (Pérez et al., 2009).

Nigrospora sp. Zimmermann, A., Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde 8: 220 (1902)

Según Wang et al., (2017), su clasificación corresponde a: *Apiosporaceae*, *Xylariales*, *Sordariomycetes*. Las colonias en PDA al principio son blancas con pequeños conidios negros brillantes fácilmente visibles bajo un microscopio de disección de baja potencia debido a su gran tamaño, que luego se vuelven marrones o negras cuando la esporulación es abundante. Micelios sumergidos o parcialmente superficiales.

Conidióforos ramificados, ondulados, hialinos a marrones, lisos, generalmente reducidos a células conidiógenas. Células conidiógenas monoblásticas, discretas, solitarias, determinadas, subesféricas, doliformes, ampuliformes, subcilíndricas a clavadas, hialinas. Conidias solitarias, con una línea hialina ecuatorial o una hendidura germinal en algunas especies, simple, esférica o ampliamente elipsoidal o piriforme, comprimida dorsiventralmente, negra, brillante, lisa, aseptada, rara vez con un mecanismo de descarga violento (Wang et al., 2017).

De acuerdo a Mason (1927), los conidióforos de la mayoría de las especies de *Nigrospora* se reducen a células conidiógenas, cada una de las cuales normalmente produce un solo conidio. Los conidios de *Nigrospora* están profundamente pigmentados, con hendiduras germinales presentes en algunas especies. Numerosas especies de *Nigrospora* aparentemente solo difieren en el

tamaño de las esporas, y hasta ahora la clasificación tradicional se ha basado principalmente en dimensiones conidiales.

2.4 Hongos fitopatógenos

Los hongos forman un grupo eucariota grande y heterogéneo de organismos vivos caracterizado por su falta de pigmento fotosintético y su pared celular quitinosa (Lastres, 2009). De acuerdo a Gaitán (2003), los hongos comprenden un grupo de organismos tanto macroscópicos como microscópicos que se encuentran distribuidos prácticamente en la totalidad del hábitat del planeta. Los hongos pueden ser unicelulares o multicelulares, presentando sus células uno o varios núcleos definidos.

En la gran mayoría de los hongos sus células crecen apicalmente y forman filamentos denominados hifas, las cuales en conjunto constituyen el micelio el cual se puede apreciar macroscópicamente como diminutas motas de algodón de diversos colores, dependiendo de la capacidad del hongo para producir pigmentos (Gaitán, 2003).

La mayor parte de los hongos fitopatógenos pasan la mayoría de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped (como parásitos) y otra parte en el suelo, en los residuos vegetales que se encuentran ahí (como saprófitos). Generalmente, los cuerpos reproductores del hongo se forman en la superficie de los tejidos de la planta huésped (o muy cerca de ella), lo cual causa que las esporas se dispersen rápida y fácilmente (Juárez et al., 2010).

2.4.1 Características generales

Los hongos presentan diversas fases del ciclo de vida caracterizadas por sus mecanismos de reproducción que pueden ser sexuales, asexuales y parasexuales. Cuando una fase sexual es conocida, se denomina a este estado del hongo como el Teleomorfo; si se trata de la fase asexual se le llama el Anamorfo, y cuando se reconocen las dos se denomina el Holomorfo (Gaitán, 2003).

Gaitán (2003), indica que los mecanismos asexuales de reproducción comprenden la producción de células llamadas conidias que le permiten una dispersión efectiva y una colonización rápida al organismo. Además, con el fin de sobrevivir a condiciones adversas, los hongos producen células de resistencia conocidas como clamidosporas, o estructuras celulares complejas denominadas esclerocios. En los teleomorfos se pueden identificar diferentes estructuras reproductivas que son la base para la clasificación taxonómica de los hongos.

2.4.1.1 División de los hongos

De acuerdo a Gaitán (2003), los hongos se clasifican de la siguiente manera Oomycetes, Zigomycetes, Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes, divisiones que poseen las características descritas a continuación:

Los Oomycetes comprende un grupo particular de hongos, entre los que se encuentran *Phytophthora* y *Pythium*, cuyas paredes celulares contienen celulosa,

sin quitina, como es lo usual. A cambio de conidias, producen células biflageladas llamadas zoosporas, y el producto de la unión sexual es una espora de paredes gruesas u oospora.

Los Zigomicetos son un grupo de hongos que al fusionar sus hifas producen una estructura denominada zigospora. Aquí se encuentra el moho del pan (*Rhizopus* spp.) y la mayoría de endomicorizas.

Los Ascomycetes agrupan a los hongos que producen ascas, especies de vainas que contienen ocho ascosporas. Las ascas pueden estar libres (gimnotecios) u organizadas en cuerpos fructíferos o ascocarpos, conformados por las células productoras de ascas y unas células de recubrimiento que le dan una forma de botella al conjunto. Estos cuerpos fructíferos pueden ser de tres tipos: apotecio, si la botella tiene una abertura ancha; peritecio, si la abertura es estrecha, y cleistotecio, si no existe la abertura.

Los Basidiomycetes comprenden aquellos hongos que producen basidios, estructuras en forma de mazo o bate que en su extremo más grueso generan cuatro basidiosporas. Los basidios pueden estar organizados en agallas las cuales se observan como láminas en la parte inferior de las “sombrillas” que crecen en el campo. Este grupo también comprende algunas levaduras y las royas, muy importantes en las enfermedades de plantas.

Finalmente, los Deuteromycetes corresponden a las fases anamórficas de muchos hongos, algunos de los cuales no tienen una fase sexual conocida.

2.4.1.2 Hongos Ascomycetes

Los ascomicetos ocupan una gran cantidad de hábitats y poseen muchos nichos ecológicos, pues los hay fitoparásitos, formadores de líquenes y micorrizas, endófitos, saprótrofos, coprófilos, micoparásitos, acuáticos e incluso algunos son hipógeos durante toda su vida (Taylor *et al.*, 2004).

De acuerdo a Agrios (2005), los ascomicetos forman un micelio haploide que posee septas, conidios en conidióforos o cuerpos fructíferos y ocasionan enfermedades en las plantas, que pueden aparecer como tizones, antracnosis, marchitamientos vasculares, manchas foliares y del fruto, pudriciones del fruto, tallo y raíz, así como pudriciones blandas. Producen, esporas sexuales (ascosporas), sin embargo, en la mayoría de los ascomicetos, las ascosporas rara vez se observan en la naturaleza y al parecer tienen poca o ninguna importancia en la supervivencia del hongo y en su capacidad de causar enfermedad en las plantas. Así, los ascomicetos se reproducen, propagan, producen enfermedad e invernan como micelio y/o conidios.

2.4.1.3 Fases reproductivas de los hongos Ascomycetes

Los ascomicetos (u hongos en forma de saco) producen un micelio que posee septos, esporas sexuales (ascosporas), dentro de un saco (asca), esporas asexuales (conidios). Al asca o etapa sexual de los ascomicetos se le denomina con frecuencia la fase perfecta o teleomorfa, mientras que la fase asexual o conidial (donde también se da la formación de clamidosporas) es la etapa imperfecta o anamorfa. En la mayoría de los ascomicetos fitopatógenos, el hongo sobrevive durante la estación de crecimiento en forma de micelio; se reproduce y ocasiona la mayoría de las infecciones en su fase conidial o asexual. La etapa sexual o perfecta se forma en hojas infectadas, frutos o tallos sólo al final de la estación de crecimiento o bien cuando ha disminuido el suministro alimenticio de la planta (Agrios, 2005).

Las conidias están conformadas por hifas septadas o tabicadas y pueden ser uninucleadas o plurinucleadas. Las clamidosporas (estructuras de sobrevivencia) por otra parte, se desarrollan por la formación y engrosamiento de septos que dan lugar a una célula melanizada y más grande que el resto de la hifa en la que se forma (Taylor *et al.*, 2004).

2.4.2 Hongos como patógenos de las plantas

Para colonizar las plantas, los microorganismos fúngicos han desarrollado estrategias para invadir el tejido vegetal, optimizar el crecimiento en la planta y propagarse (Von-Linné-Weg, 1996).

Después de la penetración, el siguiente paso en una estrategia fúngica para colonizar una especie de planta es a menudo la secreción de toxinas o compuestos similares a fitohormonas que manipulan la fisiología de la planta en beneficio del patógeno. Esta interferencia puede consistir simplemente matar células vegetales con el propósito de absorber nutrientes (Von-Linné-Weg, 1996).

Después de la infección, cuando el patógeno se ha establecido en el huésped, dependerá en gran medida del metabolismo del huésped y, como consecuencia, el metabolismo del patógeno y el huésped se entrelazarán estrechamente. (Duan et al., 2013).

2.5 Aislamiento de hongos fitopatógenos

Muchos patógenos pueden identificarse directamente en el tejido enfermo. Sin embargo, a veces, este no es el caso y debe aislarse el patógeno para obtener cultivos puros que faciliten su identificación. El procedimiento típico para el aislamiento de hongos involucra seleccionar tejidos adecuados, lavarlos, cortar trozos de la zona de avance de la lesión, desinfectarlos superficialmente, enjuagarlos con agua estéril y colocarlos sobre una superficie de medio de cultivo sólido, previamente acidificado para evitar el crecimiento de bacterias y esperar que crezca el hongo (Araúz, 1998).

2.5.1 Calidad de la muestra

Este aspecto es de suma importancia puesto que con frecuencia las muestras tomadas no llegan al lugar de destino con la calidad requerida para poder realizar una labor investigativa eficiente. Al tomar la muestra de la planta enferma no se deben seleccionar las partes u órganos que manifiestan estado avanzado de desarrollo de la enfermedad tales como: sistema radicular o tallo en avanzado estado de descomposición, hojas totalmente necrosadas, sino aquellas partes que manifiesten aun un proceso de desarrollo intermedio de la enfermedad, en las que el agente parasitario permanece activo y su observación se facilita. (Tandazo, 2015).

Igualmente, en casos de avanzado desarrollo de los síntomas, la presencia de organismos secundarios entorpece gravemente el proceso de diagnóstico (Tandazo, 2015).

2.5.2 Observación directa

Para la observación microscópica de patógenos y tejidos enfermos se emplea el estereoscopio para observar en vista tridimensional pequeñas anomalías en el tejido y determinar la presencia de estructuras fructíferas de los hongos fitopatógenos de interés. También es útil en discernir los tejidos más adecuados para la observación al microscopio de luz. La observación al microscopio de luz permite identificar la morfología de diferentes tipos de estructuras como lo son las esporas. La microscopía de luz para fines de diagnóstico requiere de la

preparación de fragmentos de tejido y su colocación sobre portaobjetos, así como el empleo de preservantes para su posterior observación (Araúz, 1998).

2.5.3 Incubación en papel secante (cámara húmeda)

Gilchrist *et al.*, (2005) indica que, las cámaras húmedas son un medio rápido y directo para obtener esporulación y ayudar a identificar los agentes causales de algunas enfermedades. Son de especial utilidad con microorganismos que crecen rápidamente sobre el hospedero y compiten bien con los saprófitos dentro de la cámara húmeda.

La preparación consiste en: cortar las hojas, tallos, etc., en pedazos pequeños y, con la ayuda de una pinza previamente esterilizada, acomodarlos sobre un portaobjeto estéril. Esterilizar los pedazos con hipoclorito al 5% durante 30 a 60 segundos, o alcohol al 65% por 5 a 10 segundos; pasar las muestras por agua estéril para eliminar el exceso de hipoclorito o alcohol y secar el material vegetal. Algunos patógenos son muy sensibles a la esterilización y, por esta razón, se dejan trozos sin tratar (Zillinsky, 1984).

Según Gilchrist *et al.*, (2005), se recomienda escoger tejido que no esté demasiado dañado o con lesiones muy avanzadas para evitar la presencia de saprófitos. En una caja Petri, colocar papel filtro humedeciéndolo con agua estéril, colocar el tejido previamente esterilizado y sellar la caja con cinta o parafilm para mantener la humedad. Incubar la caja a 18-22 °C y exponerla a luz y oscuridad en forma alternada (sin esta alternancia muchos hongos no desarrollan la fase reproductiva). Al completar 24, 48 y 72 horas de incubación, abrir la caja y

observar en el estereoscopio las estructuras formadas en la lesión, de ser necesario realizar placas semipermanentes para observar bajo el microscopio micelio, conidióforos y conidios o cualquier otra estructura desarrollada por el hongo.

2.5.4 Incubación en medio de cultivo

Al identificar las enfermedades de plantas, es recomendable aislar los microorganismos que son posibles agentes patógenos. Para lograr este objetivo, los microorganismos (principalmente hongos y bacterias) se aíslan en medios de cultivo artificiales, con el fin de poder purificarlos y estimular su esporulación para la producción de inóculo (SAGARPA, 2018).

La incubación sobre medios de cultivo ricos en nutrientes permite un adecuado desarrollo de los hongos patógenos que se encuentran dentro o sobre tejido ya sea hojas, tallos, semillas, etc. No obstante, también favorece el desarrollo de hongos saprófitos, los cuales llegan a tener un crecimiento excesivo que impide el desarrollo y detección de los hongos de interés (Gilchrist et al., 2005).

2.5.4.1 Medios de cultivo

Agar-agua (AA). Suele utilizarse para aislar y hacer germinar esporas, obtener cultivos monospóricos y verificar la viabilidad del inóculo.

Componentes: Agar 15-20 g Agua destilada 1000 ml (Cañedo, V. et al., 2004).

Papa-dextrosa-agar (PDA). Este medio es el más utilizado para el aislamiento, crecimiento y almacenamiento de hongos, pues es apropiado para numerosas especies.

Componentes: Papas partidas 250 g Dextrosa 10 g Agar 20 g Agua destilada 1000 ml (Cañedo, V. et al., 2004).

2.6 Identificación del hongo fitopatógeno

Según Agrios (2005), La determinación de si el hongo observado es un organismo patógeno o saprofito se logra mediante el estudio microscópico de la morfología de su micelio, de sus estructuras fructíferas y de sus esporas. Con base en esto, el hongo puede ser identificado y verificado en las obras de micología o fitopatología adecuadas, con el fin de saber si se ha reportado como patógeno o no, especialmente sobre el tipo de planta en que se encontró.

La forma, color, tamaño y manera en que se disponen las esporas sobre los esporóforos o cuerpos fructíferos, son características suficientes para sugerir (con una cierta experiencia en taxonomía de hongos), la clase, orden, familia y género al cual pertenece un determinado hongo, y esto se logra a su vez mediante la consulta de claves analíticas que se han publicado para la identificación de las especies de hongos (Agrios, 2005).

Muchos de los factores de diagnóstico en la identificación de diferentes hongos fitopatógenos son muy sutiles y sin un equipo de laboratorio adecuado y la habilidad es difícil de identificar a nivel de especie. Si podemos identificar el tipo de cuerpo fructífero y / o esporas que están asociados con un filo en particular, podemos reducir nuestra búsqueda considerablemente. Muy a menudo, confiamos en los signos y síntomas visuales para el diagnóstico de enfermedades fúngicas (Cooper, 2007).

2.7 Clasificación taxonómica de hongos fitopatógenos

La taxonomía ha sido definida como una forma de organizar información biológica, permitiendo identificar, denominar y describir reinos, filos, clases, ordenes, géneros y especies, cada uno de los cuales tienen sus características morfológicas y bioquímicas distintivas (Crous, W. et al., 2015).

Para facilitar la identificación de los organismos se utilizan frecuentemente esquemas diseñados para tal fin conocidos como claves taxonómicas, estas consisten en una expresión tabular que sigue una secuencia ordenada de opciones o dilemas alternativos, en los cuales se expresan los caracteres diagnósticos o discriminatorios de los taxones para los cuales ha sido construida. Las claves taxonómicas son de gran utilidad ya que permiten comparar los caracteres con precisión, los cuales están definidos para ser fácilmente reconocibles y relativamente constantes en los taxones para los cuales ha sido diseñada (Fernández *et al.*, 2013).

En la clasificación de hongos fitopatógenos la recolección de datos precisos y detalles descriptivos es crucial, ya que una caracterización imprecisa puede conducir a la identificación errónea de una especie y subsecuentemente a medidas de control innecesarias y restricciones aplicadas o, lo que es más importante, a que no se tomen medidas para controlar patógenos potencialmente devastadores (Crous, W. et al., 2015).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación y descripción del área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Protección Vegetal del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), Sub-centro de Alanje. Se trabajaron con cuatro muestras provenientes de diferentes regiones del país, descritas a continuación:

CUADRO I. DATOS CORRESPONDIENTES A LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN EL LABORATORIO.

N°	Número de muestra	Cultivar	Fecha de colecta	Localidad	Provincia	Coordenadas	Altitud
1)	Muestra N°4	Codificado: Rendimiento 1 Parcela 12	03/02/2019	Berbá, Barú	Chiriquí	17p 0299435 UTM 0928335	26 m. s. n. m.
2)	Muestra N°7	Codificado: Rendimiento 1 Parcela 20	03/02/2019	Berbá, Barú	Chiriquí	17p 0299433 UTM 0928313	26 m. s. n. m.
3)	Muestra N°12	Estrella 71	12/10/2018	Guánico Abajo, Agrícola DELI	Los Santos	x 563294 y 806838	25 m. s. n. m.
4)	Muestra	Codificado: Rendimiento 1 Parcela 2	06/05/2016	Canta Gallo	Chiriquí	-	-

3.2 Metodología

La metodología empleada para llevar a cabo la investigación contempló dos fases; una en campo y otra en el laboratorio.

3.2.1 Recolección de muestras en campo

Se colectó en campo tejido foliar y granos infectados con lesiones de *M. oryzae* de cuatro cultivares de arroz de Panamá. Cada muestra llevaba la siguiente información: la fecha de colecta, nombre del cultivar, localidad, estado fenológico de la planta, nombre del productor, coordenadas geográficas y algún otro detalle pertinente. Este material fue proporcionado por el proyecto 501.B.01.08. del IDIAP.

3.2.2 Procesamiento de muestras en el laboratorio

Se observaron las lesiones en hojas y granos utilizando un estereoscopio marca Motic modelo K Series y se prepararon placas para ser observadas al microscopio de luz marca Nikon modelo Eclipse 50I, con el objetivo de verificar la presencia o ausencia de estructuras fúngicas, de *M. oryzae* y de otros hongos asociados a las lesiones.

3.2.3 Preparación de medios de cultivo para el aislamiento de hongos fitopatógenos

Observar ANEXO 3, ANEXO 4 y ANEXO 5.

3.2.4 Aislamiento

Del material vegetal observado en el estereoscopio se prepararon cámaras húmedas colocando papel filtro en platos Petri esterilizados. El material vegetal previamente seleccionado se esterilizó en una solución de alcohol al 65% por un periodo de 5 segundos, posteriormente se enjuagó en agua esterilizada y se dispuso a secar el material en papel filtro.

En el caso de granos, se distribuyeron 20 granos de cada muestra en cada plato Petri, mientras que con las lesiones de tejidos foliar se cortaron 1 o 2 secciones de la hoja y se colocaron en el centro del plato Petri. Posteriormente se llevaron los platos Petri a la incubadora a 28 °C hasta observar el crecimiento de micelio.

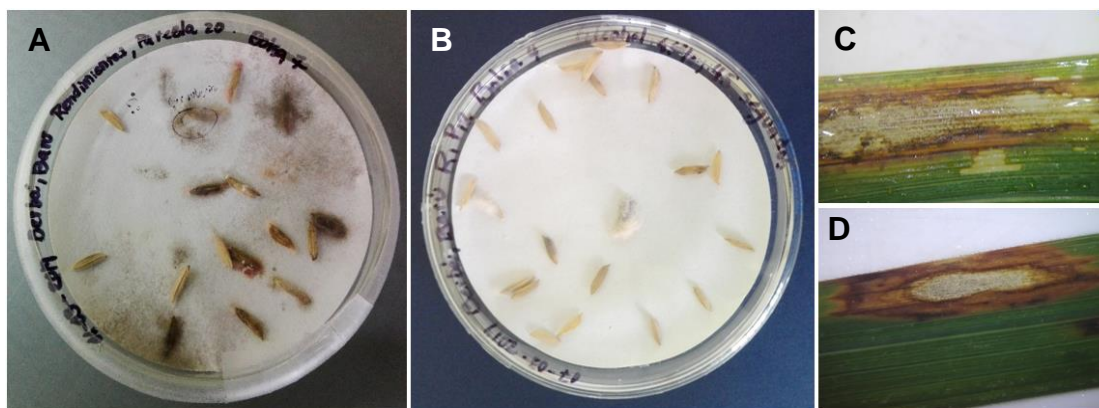


Figura 1.: A – B. Cámaras húmedas de granos en papel filtro. C – D. Lesiones en tejido foliar seleccionadas para aislamiento en cámara húmeda. Fuente: Angélica Palma.

Además, se realizaron siembras de tejido foliar y granos en medio de cultivo PDA. Se cortaron pequeñas secciones de tejido foliar mostrando lesiones de *M. oryzae*, se desinfectó con alcohol y posteriormente se sembró en PDA con antibióticos. Por otra parte, con los granos, se seleccionó material que mostrara crecimiento de micelio, se desinfectaba y se realizaba siembra directa en el medio de cultivo.

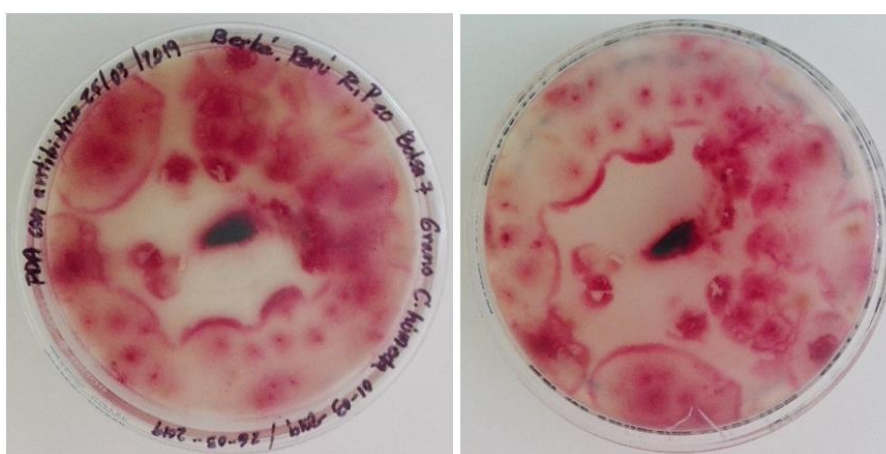


Figura 2.: Siembra de grano directo en medio de cultivo PDA con antibiótico, vista dorsal y ventral del plato respectivamente. Fuente: Angélica Palma.

3.2.5 Purificación

Se cortó pequeñas secciones del borde de la colonia en crecimiento, implementando agujas de disección y bisturí flameados. Estas pequeñas porciones de micelio o bien agar y micelio se depositaron en platos Petri con medio de cultivo estéril para obtener cultivos puros del hongo de interés.

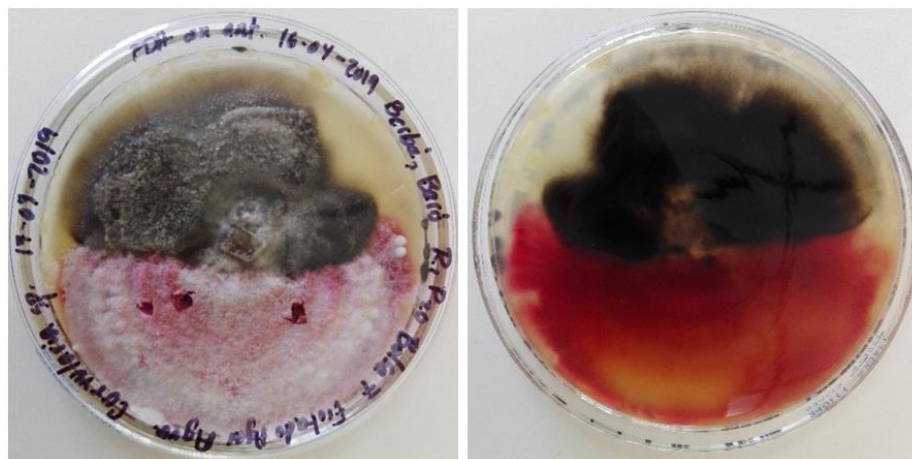


Figura 3.: Medio de cultivo PDA con antibiótico mostrando crecimiento de dos hongos fitopatógenos simultáneamente (*Curvularia sp.* en la parte superior y *Fusarium sp.* en la parte inferior), vista dorsal y ventral del plato respectivamente.

Fuente: Angélica Palma.

Para establecer un cultivo confiable, fue necesario llevar a cabo aislamientos monospóricos que garantizaran la autenticidad y pureza de los mismos y de los datos obtenidos. Este proceso consistió en realizar un frotado en zigzag con un haza esterilizada en medio de cultivo AGAR AGUA, transcurridas 24 horas se seleccionó una espора que se encontraba aislada y se sembró en medio de cultivo PDA con antibiótico.

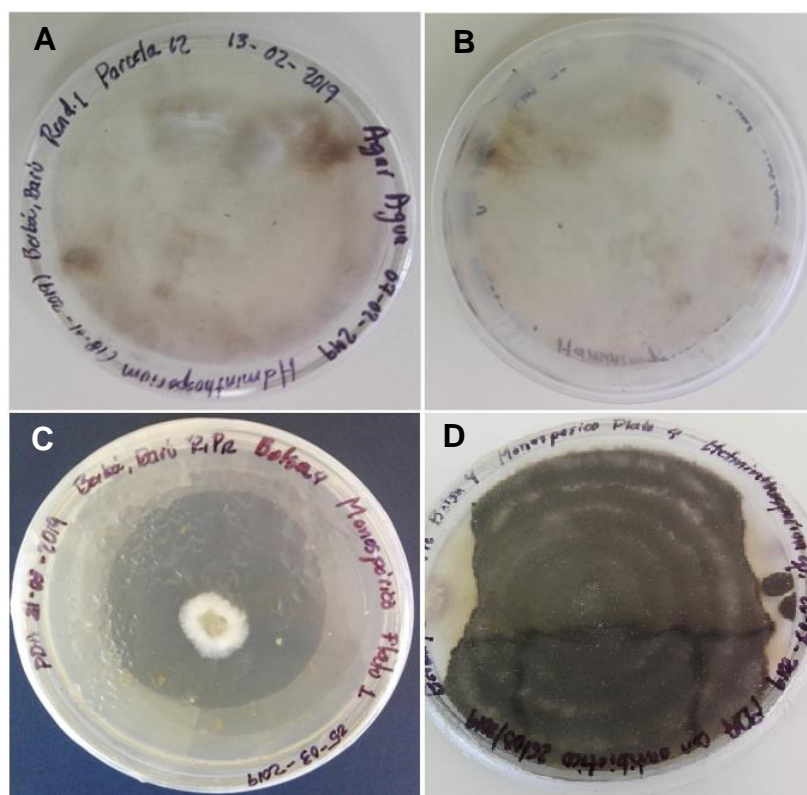


Figura 4.: **A – B.** Rayado en medio de cultivo Agar Agua, para cultivo monospórico, vista dorsal y ventral del plato respectivamente. **C – D.** Cultivo monospórico desarrollándose a partir de una espore de *Bipolaris* sp. Fuente: Angélica Palma.

3.2.6 Inoculación

Se procedió a inocular el hongo fitopatógeno de interés en medio de cultivo, bajo condiciones controladas de esterilidad y asepsia. Los instrumentos utilizados fueron previamente esterilizados bajo luz ultravioleta en una cámara de flujo laminar por un periodo de 1 hora.

Para este proceso se realizó un raspado del medio de cultivo, luego se llevó a cabo la siembra de las esporas o micelio del hongo de interés en un nuevo plato Petri con medio de cultivo PDA con antibiótico y se procedió a cerrar herméticamente el plato Petri con Parafilm.

Se utilizó el medio de cultivo Agar, Agua, Hojas de Clavel (CLA), para la inoculación del hongo fitopatógeno *Fusarium*, este medio de cultivo propicia el desarrollo de estructuras propias de este hongo. Se colocó pequeñas secciones de micelio sobre las hojas de clavel y se procedió a cerrar herméticamente el plato Petri con Parafilm.

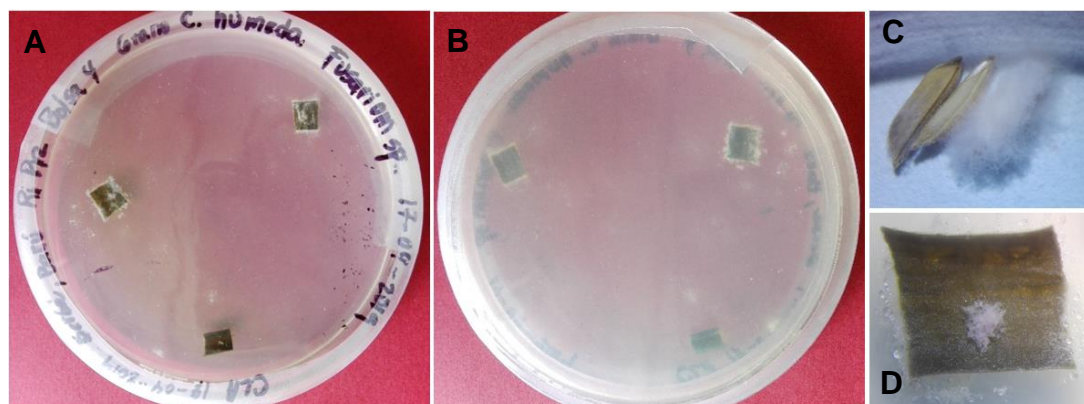


Figura 5.: **A – B.** *Fusarium* en medio de cultivo CLA, vista ventral y dorsal del plato respectivamente. **C.** Micelio extraído creciendo en grano de cámara húmeda para siembra en CLA. **D.** Crecimiento de *Fusarium* sp. en hoja de clavel. Fuente: Angélica Palma.

3.2.7 Incubación

Para la incubación el plato Petri se colocó en una incubadora refrigerada Heratherm Thermo Scientific a 28 °C, durante 5 – 7 días aproximadamente de acuerdo al desarrollo que presente el micelio del hongo de estudio.

3.2.8 Identificación

Luego de observar y verificar que el crecimiento de micelio correspondiera a hongos fitopatógenos de interés en el cultivo del arroz, se prepararon placas semipermanentes utilizando Poliviny lalcohol (Ver ANEXO 2).

Para la elaboración de placas semipermanente utilizando el polyvinyl acohol, se colocó una gota en un portaobjetos, se agregó una sección de la muestra a analizar y se colocó el cubre objetos sobre la muestra dejándolo caer con suavidad, también se implementaba cinta adhesiva, donde se cortaba una sección de cinta y con una pinza previamente esterilizada se tomaba material con un pequeño toque en la superficie de la colonia.

Una vez esparcido correctamente el polyvinyl alcohol sobre la placa se observó al microscopio con aumento de 4x, 10x y 40 x, luego utilizando un marcador permanente de punta fina, se anotaron datos como, fecha de preparación de la placa, nombre del cultivar, nombre del hongo, nombre de la finca, del productor y algún otro detalle que se considere pertinente escribir en la placa portaobjeto.

3.2.9 Descripción

Para este proceso se implementó un método comparativo a través de fotografías de estructuras microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas.

Se llevó a cabo observaciones macroscópicas tales como: forma de la colonia, coloración característica en el medio de cultivo, presencia de halos de crecimiento, apariencia.

Se procedió a realizar análisis de las placas semipermanentes utilizando un microscopio de luz con los aumentos 40 x y 100 x utilizando aceite de inmersión, donde se observaban con detalle las estructuras presentes. Las mismas eran fotografiadas con un Huawei Y6II CAM-L23 con una cámara de 13 megapíxeles y dibujadas, con el objetivo de recolectar todas las características que estas presentaban, por ejemplo, color, forma, septación. Se realizaron 20 mediciones de los conidios de largo y ancho, del ancho de conidióforos empleando una rejilla de medición, la cual estaba previamente calibrada e incorporada al microscopio de luz.

Culminada la etapa de descripción, se procedió a pasar estos datos por las claves taxonómicas (Ou, 1985), (Sivanesan, 1992) y (Seifert, 1996), permitiéndonos la identificación de especies.

3.3 PARÁMETROS A EVALUAR

La presencia de estructuras fúngicas en tejido fresco. Diagnóstico de crecimiento de estructuras fúngicas en medio de cultivo PDA. Toma de datos morfométricos para la posterior utilización de las claves taxonómicas e identificación a nivel de género de los organismos.

IV. RESULTADOS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Se procesaron un total de 4 muestras, correspondientes a granos y hojas afectadas con lesiones, de las cuales se aislaron 9 hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Curvularia*, *Nigrospora*, *Fusarium* y *Bipolaris*. De ellos 3 corresponden al género *Curvularia*, 2 a *Nigrospora*, 3 a *Bipolaris* y uno a *Fusarium*.

De los hongos fitopatógenos identificados; 5 fueron aislados de granos, los géneros *Curvularia* y *Fusarium*. Y el género *Nigrospora* y *Bipolaris* se aisló tanto en hoja como en grano.

Siete de los hongos fitopatógenos fueron identificados en la región de Chiriquí, sobre cultivares codificados y uno en la región de Los Santos, sobre el cultivar Estrella 71. Las especies identificadas se encuentran distribuidas de la siguiente manera: *Curvularia* cf. *lunata*, *Curvularia* cf. *geniculata*, *Bipolaris* cf. *oryzae*, *Nigrospora* cf. *oryzae* y *Fusarium* sp. en la localidad de Berbá, Barú; provincia de Chiriquí. *Nigrospora* cf. *oryzae* y *Bipolaris* cf. *sorokiniana* localidad de Canta Gallo, Alanje; provincia de Chiriquí. Por otra parte, en la provincia de Los Santos se identificó la especie *Curvularia* cf. *verruculosa*, en la localidad de Guánico Abajo.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Las observaciones de las estructuras microscópicas se realizaron bajo aumentos de 40x y 100x en un microscopio y en el caso de estructuras hialinas se empleó azul de lactofenol como colorante. Se consideraron únicamente los hongos fitopatógenos de interés en el cultivo de arroz en Panamá.

Mediante la observación y apoyados en las claves taxonómicas (Ou, 1985), (Sivanesan, 1992) y (Seifert, 1996), se llevó a cabo la identificación de las especies descritas a continuación.

Curvularia cf. lunata (Wakker) Boedijn

(Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae)

Sinónimo: *Acrotecium lunatum* Wakker

Procedencia de material: R1 P12; Berbá, Barú, Chiriquí; IDIAP; Bolsa N°4; c: 03-02-2019 – grano; Coordenadas P-17-02-99-43-5, UTM 0928335, 26 m. s. n. m.

Descripción macroscópica:

Micelio esponjoso de color café oscuro a negro con bordes color marrón claro a naranja tanto en el lado dorsal como el lado ventral del plato, a los 6 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28°C.

Descripción microscópica:

Conidióforos erectos, de color café oscuro, septados 2 – 4 μm de ancho, subtendiendo los conidios en la parte apical, mostrando la cicatriz de inserción del

conidio; conidios de color café oscuro, $18 - 25 \times 10 - 13 \mu\text{m}$, presentando paredes lisas, 3 septos, 4 células, la segunda célula más grande y más pigmentada que el resto de las células, cicatriz o hilum prominente.

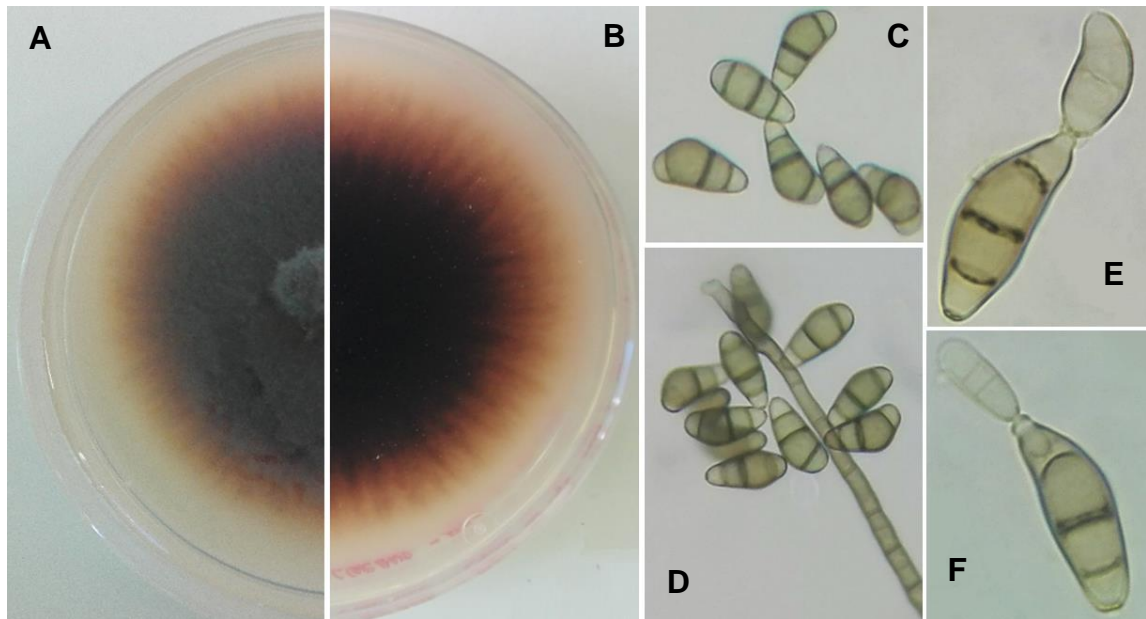


Figura 6.: Morfología de *Curvularia cf. lunata*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del palto respectivamente. **C.** Conidios mostrando tres septos. **D.** Conidióforo subtendiendo los conidios en la parte apical. **E – F.** Conidios con germinación polar. Fuente: Angélica Palma.

Curvularia cf. verruculosa Tandon & Bilgrami ex M.B. Ellis

(Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae)

Procedencia del material: Estrella 71; Guánico Abajo, Los Santos; Agrícola DELI; Bolsa N°12; c: 12-10-2018 – grano; Coordenadas x: 563294, y:806838, 25 m. s. n. m.

Descripción macroscópica:

Micelio esponjoso de color café oscuro a negro en el lado dorsal del plato, el lado ventral del plato de color negro donde se observan ligeramente la formación de anillos concéntricos, a los 6 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28 ° C.

Descripción microscópica:

Conidióforos erectos, flexuoso en la región del ápice, de color café oscuro, septados 3 – 5 μm de ancho, mostrando la cicatriz de inserción del conidio; conidios de color café claro a hialinos, 20 – 26 x 9 – 11 μm , ligeramente curvados, presentando ornamentaciones en la pared tanto en los estadios jóvenes como en los maduros, 3 septos, 4 células, la segunda célula más grande, las dos células centrales ligeramente más pigmentadas que el resto de las células, células terminales pálidas, cicatriz o hilum prominente.

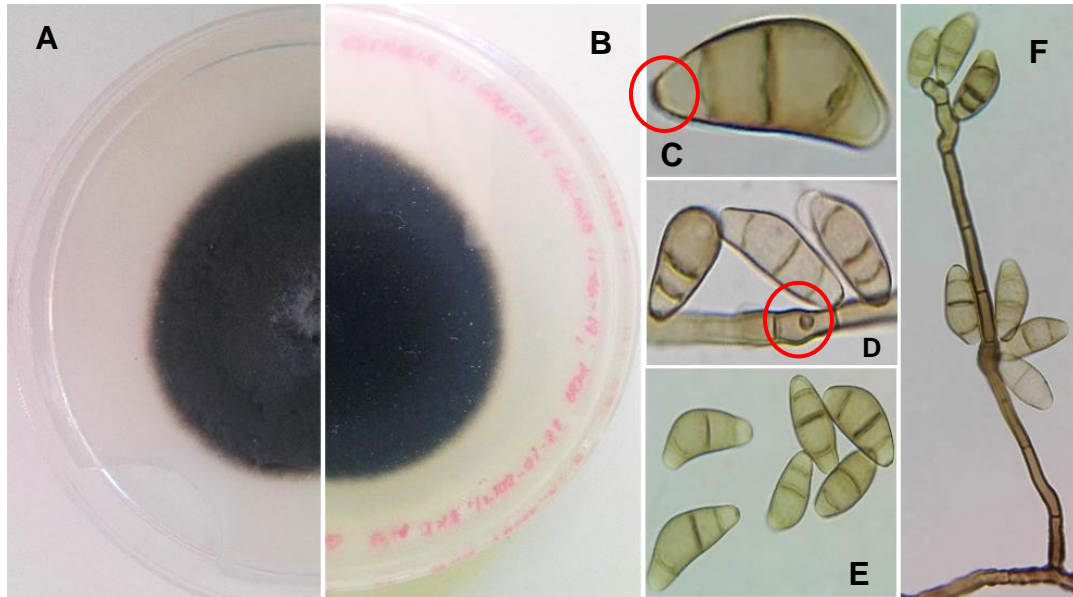


Figura 7.: Morfología de *Curvularia cf. verruculosa*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del plato respectivamente. **C.** Conidios mostrando hilum no protuberante. **D.** Conidióforo mostrando la cicatriz de inserción del conidio. **E.** Conidios mostrando tres septos. **F.** Conidióforo erecto, flexuoso en la parte apical, subtendiendo los conidios. Fuente: Angélica Palma.

Curvularia cf. geniculata (Tracy & Earle) Boedijn

(Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae)

Sinónimo: *Helminthosporium geniculatum* Tracy & Earle

Procedencia de material: R1 P20; Berbá, Barú, Chiriquí; IDIAP; Bolsa N°7; c: 03-02-2019 – grano; Coordenadas P-17-02-99-43-3, UTM 0928313, 26 m. s. n. m.

Descripción macroscópica:

Micelio de apariencia lanosa, de color café oscuro a negro formando círculos concéntricos tanto en el lado ventral como en el lado dorsal del plato, a los 6 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28 ° C.

Descripción microscópica:

Conidióforos erectos, de color café oscuro, curvados, septados 4 – 7 μm de ancho, subtendiendo los conidios en la parte apical, mostrando la cicatriz de inserción del conidio; conidios de color café oscuro, 28 – 33 x 11 – 14 μm , geniculados, de paredes lisas, 4 septos, 5 células, la segunda célula más grande y más pigmentada que el resto de las células, cicatriz o hilum prominente.

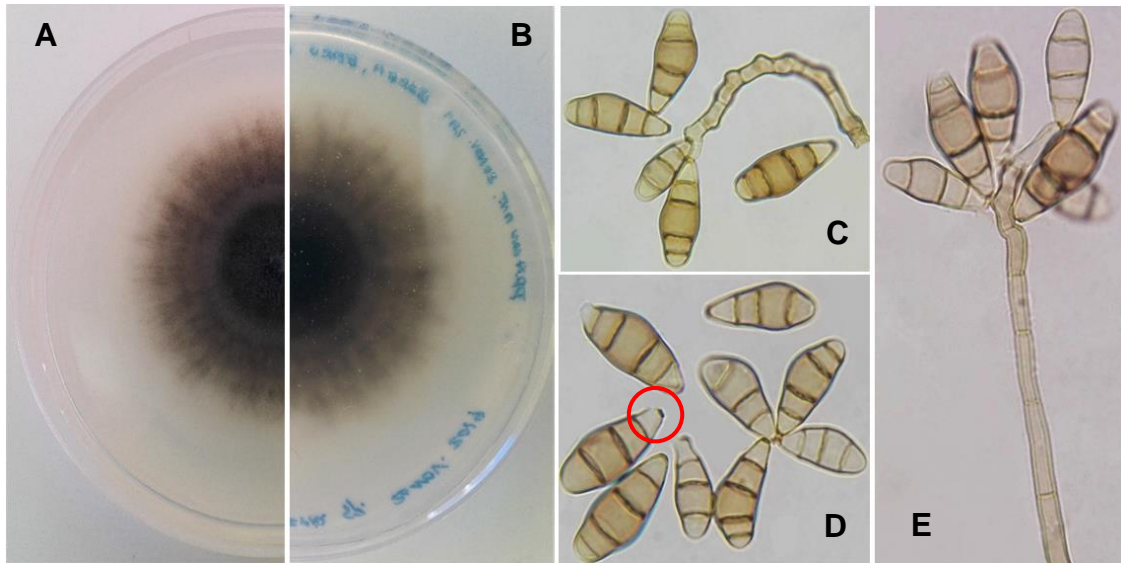


Figura 8.: Morfología de *Curvularia cf. geniculata*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del plato respectivamente. **C.** Conidióforo flexuoso y curvado en la parte apical. **D.** Conidios mostrando cuatro septos e hilum protuberante. **E.** Conidióforo erecto subtendiendo los conidios en la parte apical. Fuente: Angélica Palma.

Nigrospora cf. oryzae (Berk. & Broome) Petch

(Ascomycota, Sordariomycetes, Trichosphaeriales, Trichosphaeriaceae)

Sinónimo: *Monotospora oryzae* Berk. & Broome

Procedencia de material: R1 P20; Berbá, Barú, Chiriquí; IDIAP; Bolsa N°7; c: 03-02-2019 – grano; Coordenadas P-17-02-99-43-3, UTM 0928313.

Descripción macroscópica:

Micelio de color transparente, de apariencia esponjosa, con regiones negras y grises en la superficie del lado dorsal del plato, el lado ventral del plato de color crema con un anillo de 11, 7 cm de radio al punto central y otro anillo de 3,3 cm de radio del punto central, a los 11 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28 ° C.

Descripción microscópica:

Conidióforos cortos y simples, hialinos, 6 – 8 µm de ancho, subtendiendo una espora en la parte apical, presenta una vesícula hialina y aplanada al final del conidióforo; esporas de color negro, unicelulares, de forma globosa a subglobosa, 9 – 12 x 13 – 15 µm.

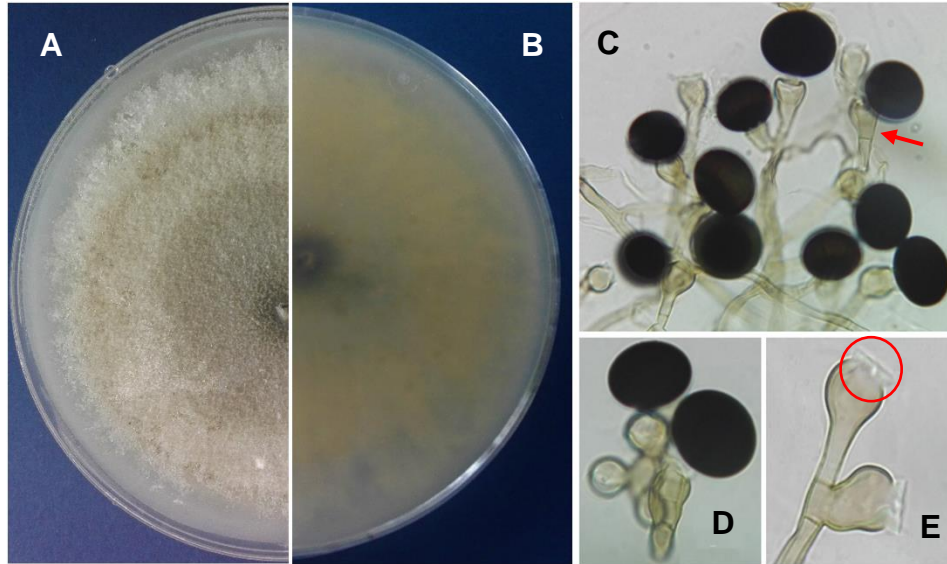


Figura 9: Morfología de *Nigrospora cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo. **C – D.** Células conidiógenas subtendiendo a los conidios. **E.** Conidióforo y vesícula. Fuente: Angélica Palma.

Nigrospora cf. oryzae (Berk. & Broome) Petch

(Ascomycota, Sordariomycetes, Trichosphaeriales, Trichosphaeriaceae)

Sinónimo: *Monotospora oryzae* Berk. & Broome

Procedencia del material: R1 P2; Canta Gallo, Alanje, Chiriquí; IDIAP; c: 06-05-2016 – hoja.

Descripción macroscópica:

Micelio de color transparente, de apariencia esponjosa, con regiones negras y grises en la superficie del lado dorsal del plato, el lado ventral del plato de color crema con un anillo de 3,7 cm de radio al punto central y otro anillo de 2,6 cm de radio del punto central, a los 9 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28 °C.

Descripción microscópica:

Conidióforos cortos y simples, hialinos, 7 – 9 µm de ancho, subtendiendo una espora en la parte apical, presenta una vesícula hialina y aplanada al final del conidióforo; esporas de color negro, unicelulares, de forma globosa a subglobosa, 10 – 23 x 13 – 24 µm.

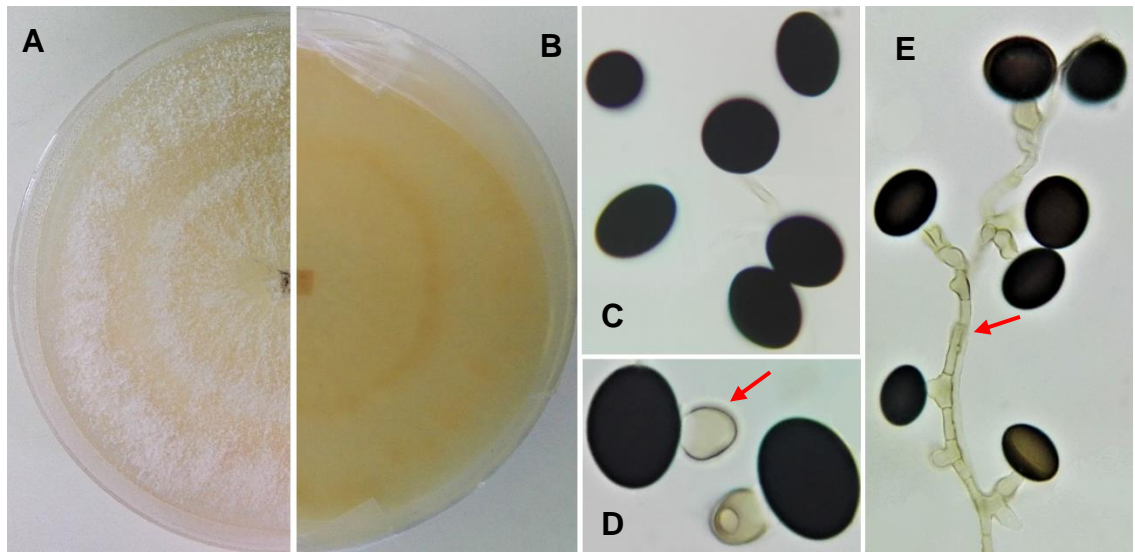


Figura 10.: Morfología de *Nigrospora cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo. **C.** Conidios. **D.** Células conidiógenas dando lugar a conidios. **E.** Hifa que produce célula conidiógena, subtendiendo conidios. Fuente: Angélica Palma.

Fusarium sp.

(Ascomycota, Sordariomycetes, Hypocrales, Nectriaceae)

Sinónimo:

Procedencia de material: R1 P12; Berbá, Barú, Chiriquí; IDIAP; Bolsa N°4; c: 03-02-2019 – grano; Coordenadas P-17-02-99-43-5, UTM 0928335, 26 m. s. n. m.

Descripción macroscópica:

Micelio de color naranja pálido, esponjoso, con círculos concéntricos de color rosado en el lado dorsal del plato; en el lado ventral micelio de color naranja intenso en el centro y de color naranja-amarillo en los bordes de los círculos concéntricos, a los 6 días de crecimiento en PDA con antibiótico. A los 30 días de crecimiento en PDA con antibiótico micelio ligeramente algodonoso, de color marrón-grisáceo, en los bordes de color rojo vino-rosado en el lado dorsal del plato; micelio de color café oscuro en el centro, con bordes presentando una tonalidad de rojo vino a rosado en el lado ventral del plato.

Descripción microscópica:

Macroconidios de color hialinos, ligeramente curvados, 5 septos, 6 células, 40 – 54 x 3 – 4 μm . Célula basal en forma de pies, 3 – 5 μm de largo, célula apical delgada, en forma de gancho. No se observan microconidios. Clamidosporas de color amarillo-verdoso, de paredes lisas, de globosa-subglobosa, terminales e intercalares, solitarias, en pares y catenuladas (5 – 6), 9 – 13 x 8 – 13 μm .

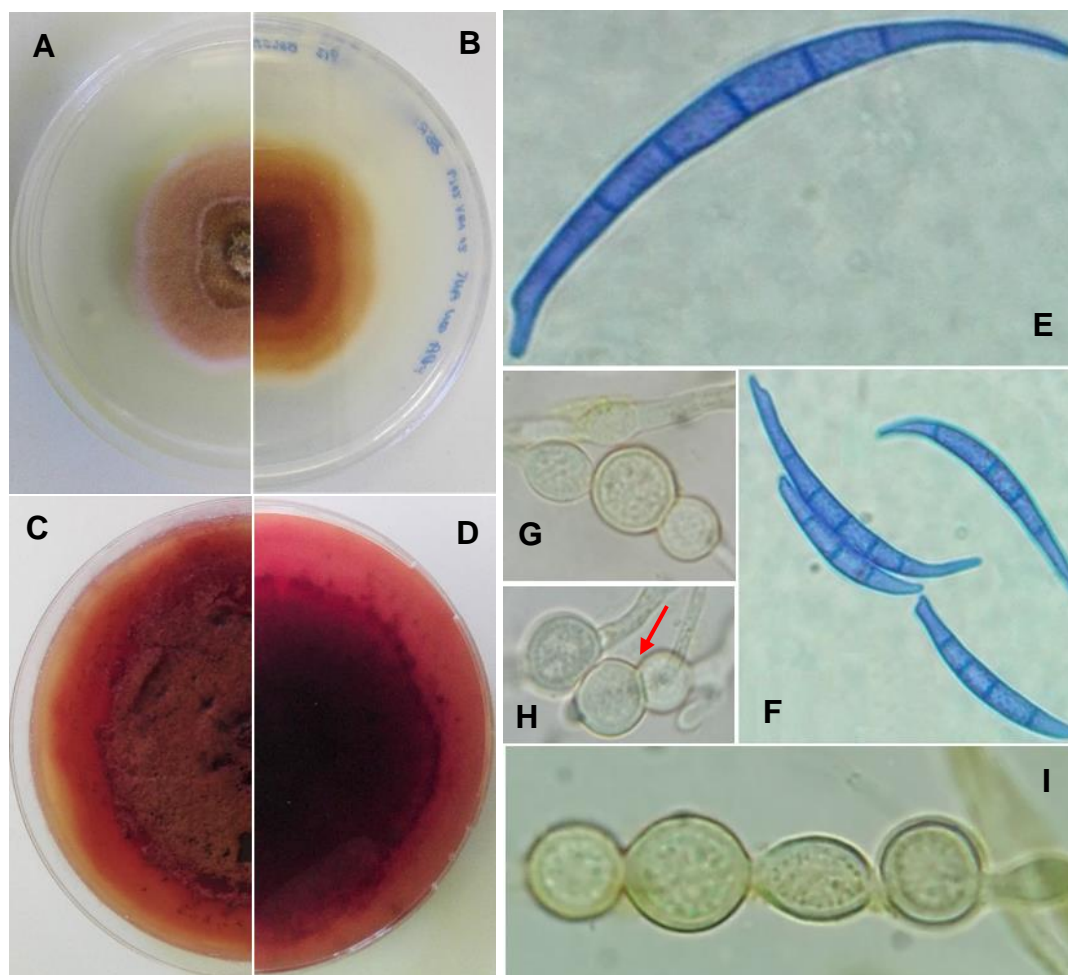


Figura 11.: Morfología de *Fusarium* sp. **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo a los 6 días de crecimiento. **C – D.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo a los 30 días de crecimiento. **E.** Conidio desarrollado con cinco septos. **F.** Conidios en diferentes estadios de desarrollo. **G – I.** Clamidosporas en posición intercalar, catenuladas, terminales, solitarias y en pares. Fuente: Angélica Palma.

Bipolaris cf. sorokiniana Shoemaker

(Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae)

Sinónimo: *Helminthosporium sorokinianum* Sacc.

Procedencia del material: R1 P2; Canta Gallo, Alanje, Chiriquí; IDIAP; c: 06-05-2016 – hoja.

Descripción macroscópica:

Micelio de apariencia poco esponjosa, de color café oscuro a negro formando círculos concéntricos, en el lado ventral del plato con un anillo de 2,7 cm de radio al punto central y otro anillo de 2,0 cm de radio del punto central, a los 11 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28 ° C.

Descripción microscópica:

Conidióforos erectos, flexuoso o geniculado en el área apical, de color café oscuro, septados 4 – 6 µm de ancho, subtendiendo los conidios en la parte apical, mostrando la cicatriz de inserción del conidio; conidios de color café oscuro, 67 – 94 x 16 – 20 µm, con extremos más claros, 8 pseudoseptos, 7 células, cicatriz o hilum prominente.

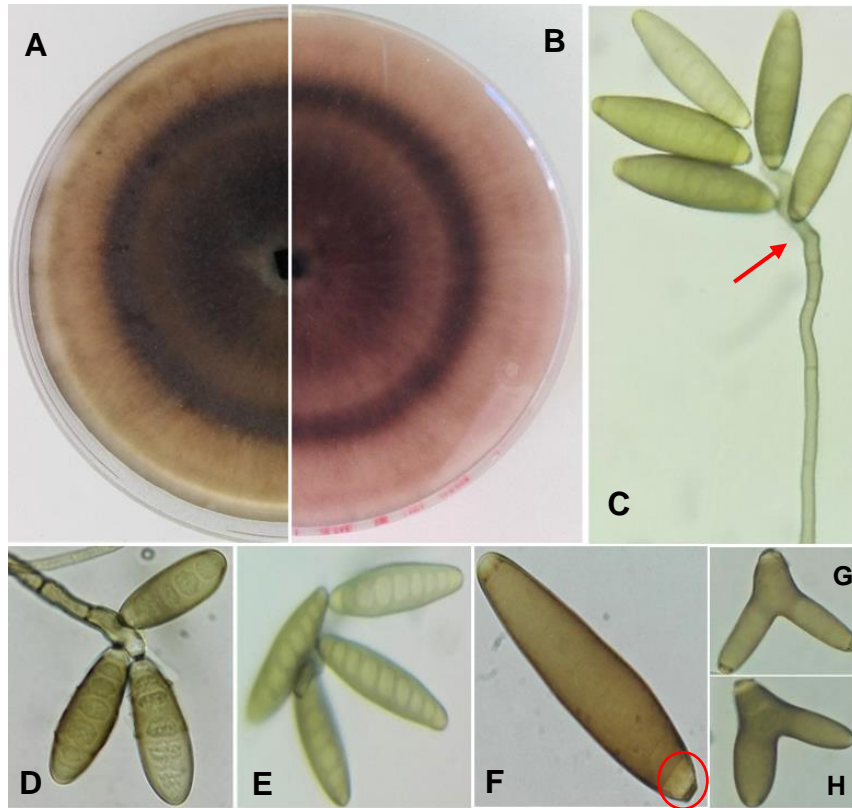


Figura 12.: Morfología de *Bipolaris cf. sorokiniana*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del del plato. **C – D.** Conidióforo flexuoso en la parte apical subtendiendo los conidios. **E.** Conidios con 8 pseudoseptos. **F.** Conidio con hilum protuberante. **G – H.** Conidio atípico bifurcado. Fuente: Angélica Palma.

Bipolaris cf. oryzae (Breda de Haan) Shoemaker

(Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae)

Sinónimo: *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram. & BL Jain

Procedencia de material: R1 P12; Berbá, Barú, Chiriquí; IDIAP; Bolsa N°4; c: 03-02-2019 – hoja; Coordenadas P-17-02-99-43-5, UTM 0928335, 26 m. s. n. m.

Descripción macroscópica:

Micelio de apariencia esponjosa, de color grisáceo oscuro a negro mostrando en los bordes una coloración verde-azulosa en el lado dorsal del plato; en el lado ventral del plato se observa micelio de color café oscuro a negro con bordes ligeramente oliváceos, a los 5 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28 ° C.

Descripción microscópica:

Conidióforos erectos, de color café oscuro, generalmente geniculados en la región cercana al ápice, septados 5 – 7 μm de ancho, subtendiendo los conidios en la parte apical, mostrando la cicatriz de inserción del conidio; conidios de color café claro, curvados, 76 – 102 x 14 – 17 μm , de paredes lisas, mostrando germinación bipolar, 6 – 11 pseudoseptos, 7 – 12 células, cicatriz o hilum poco prominente.

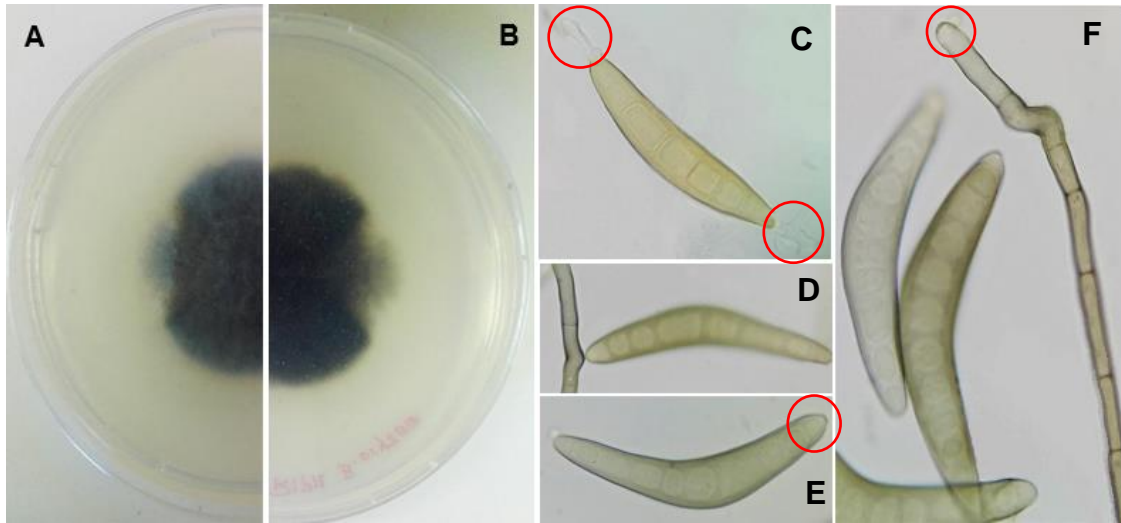


Figura 13.: Morfología de *Bipolaris cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del plato. **C.** Conidio mostrando germinación bipolar. **D.** Conidio unido al conidióforo. **E.** Conidio con hilum poco protuberante, 10 pseudoseptos. **F.** Conidióforo, mostrando punto de inserción del conidio. Fuente: Angélica Palma.

Bipolaris cf. oryzae (Breda de Haan) Shoemaker

(Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae)

Sinónimo: *Drechslera oryzae* (Breda de Haan) Subram. & BL Jain

Procedencia de material: R1 P20; Berbá, Barú, Chiriquí; IDIAP; Bolsa N°7; c: 03-02-2019 – grano; Coordenadas P-17-02-99-43-3, UTM 0928313, 26 m. s. n. m.

Descripción macroscópica:

Micelio de apariencia esponjosa, de gris oscuro a negro mostrando en los bordes una coloración verde-azulosa en el lado dorsal del plato; en el lado ventral del plato se observa micelio de color café oscuro a negro con bordes ligeramente oliváceos, a los 5 días de crecimiento en PDA con antibiótico a 28 ° C.

Descripción microscópica:

Conidióforos erectos, de color café oscuro, generalmente geniculados en la región cercana al ápice, septados 5 – 7 μm de ancho, subtendiendo los conidios en la parte apical, mostrando la cicatriz de inserción del conidio; conidios de color café claro, curvados, 83 – 105 x 14 – 17 μm , de paredes lisas, mostrando germinación bipolar, 8 – 11 pseudoseptos, 9 – 12 células, cicatriz o hilum poco prominente.

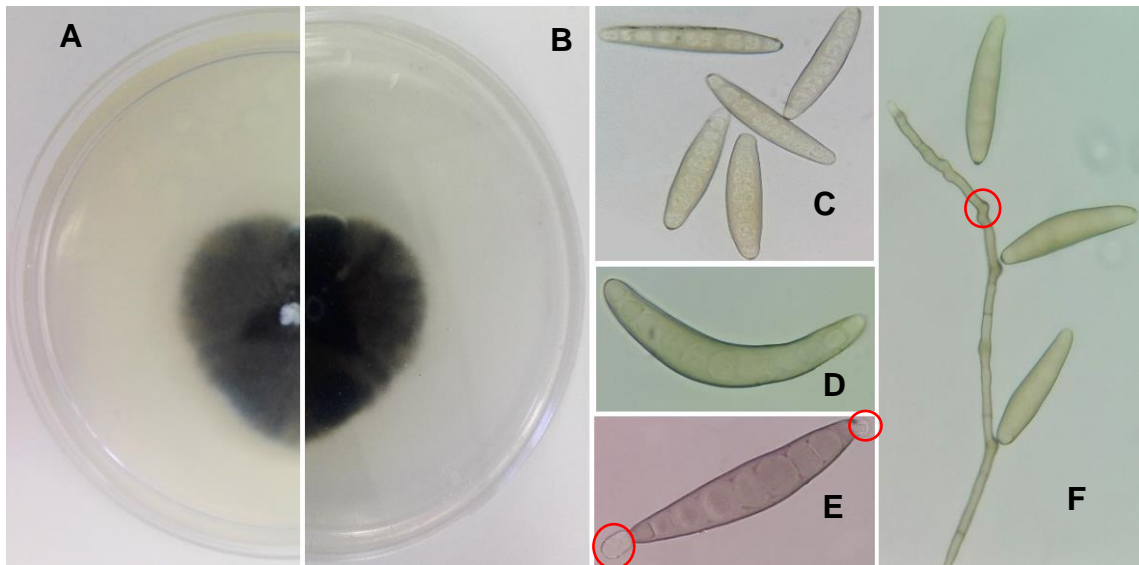


Figura 14.: Morfología de *Bipolaris cf. oryzae*. **A – B.** Vista dorsal y ventral del medio de cultivo. **C.** Conidios jóvenes mostrando hilum poco protuberante. **D.** Conidio con 10 pseudoseptos. **E.** Conidio con germinación bipolar. **F.** Conidióforo subtendiendo los conidios, mostrando punto de inserción del conidio. Fuente: Angélica Palma.

V. DISCUSIÓN

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Los hongos aislados de los cultivares codificados y el cultivar Estrella 71 se identificaron como hongos de los géneros *Curvularia*, *Nigrospora*, *Fusarium* y *Bipolaris*, basados en la caracterización morfológica macroscópica y microscópica. Se logró identificar las especies *Curvularia* cf. *lunata*, *Curvularia* cf. *geniculata*, *Curvularia* cf. *verruculosa*, *Nigrospora* cf. *oryzae*, *Fusarium* spp, *Bipolaris* cf. *sorokiniana* y *Bipolaris* cf. *oryzae*. los resultados obtenidos permiten confirmar la existencia de interacción entre las especies de hongos fitopatógenos antes mencionadas y el cultivo del arroz.

Como menciona Azizah *et al.* (2015), las especies de *Curvularia* y *Bipolaris* son fitopatógenos importantes reportados en todo el mundo y corresponden a los principales patógenos destructivos principalmente para plantas de cereales, incluido el arroz (*Oryza sativa*). Se reportan aislamientos de *Curvularia* de muestras de granos, y *Bipolaris* tanto en muestras de granos como de hojas (Azizah *et al.*, 2015).

Estos dos géneros se encuentran estrechamente relacionados, sin embargo, de acuerdo a Azizah *et al.* (2015), pueden diferenciarse en función de la morfología sexual de sus conidias. Además de eso, *Curvularia* tiene una morfología conidial curva y robusta en comparación con *Bipolaris*, que tienen grandes conidios.

Entre las principales especies de estos géneros que producen daños económicos importantes, especialmente en las regiones tropicales, se reportan *C. lunata*, *C. geniculata*, *B. oryzae*, *B. sorokiniana* (Pincioli *et al.*, 2013).

Por otra parte, Sharma *et al.* (2013), informa la existencia de *Nigrospora oryzae* como la causa numerosas y diminutas pústulas negras en las hojas de arroz. Wang *et al.* (2017), describe aislamientos realizados de este género asociados con manchas foliares donde se cultivaron tejidos y esporas simples. Ou (1985), menciona que esta especie es una de las más comunes en el género *Nigrospora* reportadas en el cultivo de arroz.

Cabe destacar que en el caso de *Fusarium* Nenínger *et al.* (2003), lo identifica como un patógeno de semilla. De acuerdo a Seifert (1996), las especies de *Fusarium* se encuentran muy extendidas y pueden aislarse de semillas y otros tejidos de una amplia variedad de plantas, entre ellas el arroz. Pincioli *et al.* (2013), reporta *Fusarium* como un importante hongo fitopatológico en campo, además lo describe como un hongo de almacenamiento toxicogénico importante.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Se obtuvo colonias en medio de cultivo PDA con antibiótico para los cuatro géneros de hongos fitopatógenos previamente identificados.

En el género *Curvularia*, se logró identificar las especies *Curvularia cf. lunata*, *Curvularia cf. geniculata* y *Curvularia cf. verruculosa*, las cuales presentaban las siguientes características:

Curvularia cf. lunata, con colonias oscuras en el centro y de bordes café claro, conidios ligeramente curvados, con tres septos y la segunda célula más ensanchada y pigmentada que el resto, reafirmando lo descrito por a Azizah *et al.* (2015) para esta especie. *Curvularia cf. geniculata* con conidias de color café a café oscuro, lisas, (doblado como rodilla), la célula central usualmente café oscuro, grande y más oscura que el resto, corroborando la descripción realizada por Piontelli (2015). La especie *Curvularia cf. verruculosa*, presentó las siguientes características previamente descritas por Piontelli (2015), colonias de color café oscuro a negro, de crecimiento rápido. Conidios normalmente de 3 septos, de color café claro, con células apicales y basales más pálidas que el resto, mostrando paredes verrugosas.

Las colonias correspondientes al género *Bipolaris* presentaban características distintivas para cada especie, donde *Bipolaris cf. sorokiniana* formó micelios aterciopelados con una pigmentación de color marrón oscuro, con anillos concéntricos; conidias rectas a ligeramente curvadas de coloración café oscura, ratificando la descripción que realizó Azizah *et al.* (2015) para este hongo

fitopatígeno. La especie *Bipolaris cf. oryzae* presentó abundante micelio aéreo que da una apariencia algodonosa, esponjosa; reverso oliváceo a oliváceo oscuro; superficie gris oscuro con bordes oliváceos. Conidias mayormente curvadas de coloración café a café pálido, reseña realizada anteriormente por Marin *et al.* (2011), en esta especie.

Las colonias de *Nigrospora cf. oryzae* presentaron un crecimiento rápido con un cambio de coloración de acuerdo a la edad del micelio, corroborando lo observado por Wang *et al.* (2017), quien afirma que esta especie desarrolla colonias lanudas, de margen circular, creciendo rápidamente, las cuales al principio son blancas con pequeños conidios negros brillantes fácilmente visibles bajo un microscopio de disección de baja potencia debido a su gran tamaño, que luego se vuelven marrones o negras cuando la esporulación es abundante.

Reafirmando lo descrito por Seifer (1996), el género *Fusarium* mostró producción de conidios, hialinos, septados, en forma de canoa (conocido como macroconidia). Además de esto, algunas especies también producen clamidosporas. Sus colonias exhiben una textura algodonosa o algo corpulenta, donde los pigmentos rojos son producidos por especies de varias secciones.

VI. CONCLUSIONES

- ❖ El empleo de cámaras húmedas, medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA), Hojas de Clavel-Agar-Agua (CLA) y Agar Agua, resultaron metodologías de diagnóstico apropiadas para el aislamiento de hongos fitopatógenos asociados a granos y hojas en los cultivares de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP.
- ❖ Se logró identificar los hongos fitopatógenos: *Curvularia cf. lunata*, *Curvularia cf. geniculata*, *Curvularia cf. verruculosa*, *Nigrospora cf. oryzae*, *Fusarium sp.*, *Byopolaris cf. oryzae*, *Bipolaris cf. sorokiniana*, asociados a los cultivares de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP; a través del empleo de las claves taxonómicas (Ou, 1985), (Sivanesan, 1992), (Seifert, 1996) y evaluación de características morfológicas.
- ❖ Se documentaron hongos fitopatógenos asociados a los cultivares de arroz Estrella 71 y tres cultivares codificados del IDIAP, al igual que características macroscópicas y microscópicas distintivas de estos organismos. Para la descripción de colonias creciendo en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) se registró color y apariencia; por otra parte, para sus estructuras reproductivas se registró: en los conidios forma, color, septación, curvatura, largo y ancho y tipo de germinación de presentarse; en los conidióforos color, septación, curvatura y ancho.

VII. RECOMENDACIONES

- Implementar otros medios de cultivo como Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), que permite la formación de conidios consistentes en tamaño y forma, óptimo para utilizarse con fines de identificación; Malta Sal Agar (MSA) el cual resulta ser un medio menos favorable para hongos contaminantes de crecimiento rápido, así como periodos alternados de luz y oscuridad, que favorezcan el crecimiento de estructuras especializadas y de otras especies de hongos fitopatógenos de relevancia en el cultivo del arroz.
- El empleo de acidificantes en los medios de cultivo, a partir de una solución estéril de ácido tartárico al 10 %, que permite bajar el pH del medio a 3.5 ± 0.1 , condición que inhibe el crecimiento bacteriano. La presencia de bacterias en el medio de cultivo representa un obstáculo para la evaluación y caracterización de los organismos de interés, ya que impiden el desarrollo óptimo de los hongos fitopatógenos y sus estructuras.

VIII. REFERENCIAS CITADAS

- Agrios, G. (2005). Fitopatología. México. Editorial Limusa. 4-279 p.
- Almaguer, M. (diciembre de 2008). Perspectivas de los estudios aeromicológicos para la protección del cultivo del arroz. Revista de protección vegetal, 23 (3): 137-143p.
- Araúz, L. (1998). Fitopatología: Un enfoque Agroecológico. San José, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. 240-244 p.
- Arbeláez, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agronomía Colombiana, 17: 11-22.
- Aylward, J.; Steenkamp, E. T.; Dreyer, L.; Roets, F.; Wingfield, B. D.; Wingfield, M. J. (9 de febrero de 2017). A plant pathology perspective of fungal genome sequencing. IMA Fungus, 8(1): 1-15.
- Azizah, N.; Zakuan, M.; Zulkifly, S.; Mohd, Y.; Mohd, N. (2015). Morphological and molecular characterization of *Curvularia* and related species associated with leaf spot disease of rice in Peninsular Malaysia. Scienze Fisiche e Naturali, 27(2).
- Benavides, H. y Segura, O. (junio 2005). El entorno internacional del sector arrocero Centroamericano. San José, Costa Rica. Editorial Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 7 p.
- Cabral, E. (2013). Hongos Diversidad Vegetal (en línea). Consultado 05 de enero de 2020. Recuperado de <http://exa.unne.edu.ar/carreras/docs/Estudio%20HONGOS.pdf>

Cañedo, V. y Ames, T. (2004). Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos. Lima, Perú. Editorial Centro Internacional de la Papa (CIP). 18-20 p.

Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA). (2018). Cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) (en línea). Consultado 15 de octubre de 2019. Recuperado de http://centa.gob.sv/docs/guias/granos%20basicos/Guia%20Centa_Arroz%202019.pdf

Claros, G.; Saladrigas, V.; González-Halphen, D. (2004). Vocabulario Inglés Español de Bioquímica y Biología Molecular. REB, 23 (1): 42-54.

Cooper, J. (2007). Fungal Plant Pathogens and Symptomology (en línea). Consultado 15 de abril de 2020. Recuperado de https://s3.wp.wsu.edu/uploads/sites/2054/2014/04/FungalPlantPathogens_002.pdf

Crous, P.; Hawksworth, D.; Wingfield, M. (2015). Identifying and Naming Plant-Pathogenic Fungi: Past, Present, and Future. Annual Review of Phytopathology, 53: 247-267.

Duan, G.; Nils, C.; Schwachtje, J.; Walther, D.; Ebenhöf O. (2013). The metabolic interplay between Plants and Phytopathogens. Metabolites. 3: 1-23.

Fábrega, A.; Agut, M.; Calvo, A. (2002). El género *Alternaria*: Características morfológicas y su capacidad para producir micotoxinas. Anales de la real academia de doctores. 6: 357-367.

- Fernández, M.; Brusa, F.; Damborenea, M.; Dellapé, P.; Gallardo, F. (2013). Introducción a la Taxonomía. Buenos Aires, Argentina. Editorial Universidad de La Plata. 6-61 p.
- Franquet, J. (2004). Variedades y mejora del arroz. Cataluña, España. Editorial Tortosa. 18 p.
- Gaitán, A. (2003). Las enfermedades de las plantas y su diagnóstico. Enfermedades del cafeto en Colombia. Colombia. Editorial Especial Impresores. 21-31 p.
- Garrigues, F. (23 de mayo de 2017). NGS: Secuenciación de Segunda Generación (en línea). Consultado 02 de noviembre de 2018. Recuperado de <https://revistageneticamedica.com/blog/ngs-secuenciacion/>
- Gaviria, A. (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas (Tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia. Medellín, Colombia.
- Gilchrist, L.; Fuentes, G.; Martínez, C.; López, R. M.; Duveiller, E.; Singh, R. P.; Henry, M.; García, I. (2005). Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. México D. F., México. Editorial CIMMYT. 3-17 p.
- Greif, G. (2012). Métodos de secuenciación de ácidos nucleicos (en línea). Consultado 25 de julio de 2018. Recuperado de http://www.chlaep.org.uy/descargas/curso_tb_mico_bacterias/metodos_de_secuenciacion_de_acidos_nucleicos.pdf

- Hung-Chun, L. y Fukushima, Y. (2016). Rice Cultivation Methods and Their Sustainability Aspects. *Sustainability*. 8 (529): 1-2.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2009). Plan de acción para la competitividad de la cadena de arroz de Panamá: hacia un mecanismo de reconocimiento de la calidad. San José, Costa Rica. Editorial IICA. 11 p.
- Juárez, G. P.; Sosa, M. E.; López, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 4(2): 14-23.
- Lasso, M. La Estrella de Panamá. (Abril 2017). Panamá declara el arroz, cultivo de seguridad alimentaria (en línea). Consultado 25 de julio de 2018. Recuperado de <http://laestrella.com.pa/economia/panama-declara-arroz-cultivo-seguridad-alimentaria/23997595>
- Lastres, L. (2009). Patógenos que atacan los cultivos. *Sanidad Vegetal* (en línea). Consultado 18 de abril de 2020. Recuperado de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1354/2/02.pdf>
- Leslie, J. y Summerell, B. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Iowa, Estados Unidos. Editorial Blackwell. 5 – 13 p.
- Marchio, I. (2014). Manchado del grano: incidencia y microflora presente en diferentes genotipos de arroz, cultivados en dos regiones agroecológicas argentinas (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de la Plata. La Plata, Argentina.

- Marin, F. (2011). New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere*. 8(9):1556-1574.
- Marin, Y.; Senwanna, C.; Cheewangkoon, R.; Crous, P. (2011). New species and records of *Bipolaris* and *Curvularia* from Thailand. *Mycosphere*. 8(9): 1555-1573.
- Mason, E. (1927). En especies del género *Nigrospora* Zimmermann registradas en monocotiledóneas. *Transacciones de la British Mycological Society*. 12: 152–165.
- Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA). (2014). Aportes para el desarrollo del sector agropecuario y rural de Panamá (en línea). Consultado 25 de julio de 2018. Recuperado de <https://www.mida.gob.pa/upload/documentos/aportesmidasector.pdf>
- Ministerio de Economía y Finanzas (MEF). (2017). Informe Económico y Social – 2017 (en línea). Consultado 25 de julio de 2018. Recuperado de <http://www.mef.gob.pa/es/informes/Documents/Informe%20Economico%20y%20Social%20-%20Anual%202017.pdf>.
- Nenínger, H.; Hidalgo, E.; Barrios, L.; Pueyo, M. Hongos presentes en semillas de arroz (*Oryza sativa*) en Cuba. *Fitosanidad*. 7(3): 7-11.
- Ou, S. (1985). *Rice Diseases*. Wisconsin, Estados Unidos. Editorial Commonwealth Mycological Institute. 316 – 320 p.

- Pérez, Y.; Portales, J.; López, M. (2009). Nuevos registros de especies de *Curvularia* (hongos anamorfos) en suelos de Cuba. *Acta botánica Cubana*. 205: 26-29.
- Pincioli, M.; Gribaldo, A.; Vidal, A.; Bezus, R.; Sisterna, M. (2013). Mycobiota evolution during storage of paddy, brown and milled rice in different genotypes. *Summa Phytopathologica*. 39(3).
- Piontelli, E. (2015). Especies oportunistas de importancia clínica de los géneros *Bipolaris* Shoemaker y *Curvularia* Boeddiijn: su caracterización bajo los nuevos criterios taxonómicos. *Bol. Micol.* 30(2): 40-63.
- Prado, G. (2016). Caracterización genética y patotípica del hongo *Magnaporthe oryzae* en cultivos de arroz en Colombia (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia.
- Rivas, E.; De Armas, Y.; Hernández, L.; Ramírez, M.; Drake, L.; Medina, R. El diagnóstico y su papel en la fitoprotección. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 12 (35): 47-54.
- Rocabado, D. (2011). Los Hongos. *Bolivia Ecológica*. 62: 9-12.
- Rodríguez, D. (2017). Potencial de rendimiento de líneas mutantes de arroz (*Oryza sativa* L.) desarrolladas mediante aplicación de rayos gamma en condiciones del valle de Jequetepeque (Tesis de grado). Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú. 1-19 p.

- Rodríguez, D. y Piepenbring, M. (2007). Two new species of *Appendiculella* (Meliolaceae) from Panamá. *The Mycological Society of America*. 99 (4): 544-552.
- Rodríguez, D.; Kirschner, R.; Piepenbring, M. (2015). New species and new records of Meliolaceae from Panama. *Fungal Diversity*. 70(1): 73-84.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2018). Detección e identificación de hongos fitopatógenos a partir de semillas (en línea). Consultado 17 de abril de 2020. Recuperado de <http://sinavef.senasica.gob.mx/CNRF/AreaDiagnostico/DocumentosReferencia/Documentos/ProtocolosFichas/Protocolos/HongosFitopatogenos/6.%20ProtocoloDetecci%C3%B3nHongosFitopat%C3%B3genosSemillas%20V.1%20Pub.pdf>
- Seifert, K. (1996). *Fusarium* interactive key. Ottawa, Canada. Editorial Agriculture and Agri-Food Canada, Research Branch, Eastern Cereal & Oilseed Research Centre.
- Shama, P.; Dayal, M.; Singh, J. (2013). First report of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch Causing stem blight on *Brassica juncea* in India. *Journal of Phytopathology*. 161. 439-441.
- Shirouzu, T. y Harada, Y. (2004). Notes on species of *Helminthosporium* and its allied genera in Japan. *Mycoscience*. 45: 17-23.

- Sivanesan, A. (1992). New *Bipolaris*, *Curvularia* and *Exserohilum* species. *Mycological Research*. 96: 485-489
- Stchigel, A. (2000). Estudio taxonómico de los ascomicetes del suelo (Tesis doctoral). Universidad Rovira y Virgili. Cataluña, España.
- Tandazo, M. (2015). Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de Yuca (*Manihot esculenta*) en el sector Los Laureles Canton La Mana – Periodo 2015 (Tesis de Grado). Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga, Ecuador.
- Tascón, E. y Gracia, E. (1985). Arroz: Investigación y producción. Cali, Colombia. Editorial CIAT. 565-584 p.
- Taylor, J.; Spatafora, J.; O'Donnell, K.; Lutzoni, F.; James, T.; Hibbett, D.; Geiser, D.; Bruns, T.; Blackwell, M. (2004). The Fungi (en línea). Consultado 20 de abril de 2020. Recuperado de https://taylorlab.berkeley.edu/sites/default/files/taylorlab/publications/taylor_TOL2004.pdf
- Ulloa, M. (1991). Diccionario ilustrado de micología. México, D. F. Editorial Universidad Nacional Autónoma de México. 40 – 269 p.
- Universidad Complutense de Madrid. (2005). De la taxonomía tradicional a las filogenias moleculares (en línea). Consultado 05 de octubre de 2019. Recuperado de <http://www.rsehn.es/cont/publis/boletines/89.pdf>
- Von-Linné-Weg, C. (1996). Fungal Infection of Plants. *The Plant Cell*. 8: 1711-1722.

- Wang, M.; Liu, F.; Crous, P. W.; Cai, L. (2017). Reevaluación filogenética de *Nigrospora*: endófitos ubicuos, patógenos de plantas y humanos. *Persoonia, Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 39: 118-142.
- Zillinsky, F. (1984). Guía para la identificación de enfermedades en cereales de grano pequeño. México D. F., México. Editorial CIMMYT. 2-7 p.

ANEXOS

Anexo 1. Glosario de términos.

1. Agar Agua: consiste en 20 g de agar en 1 L de agua destilada. Este medio es recomendado para la germinación de conidios que serán utilizados para iniciar un cultivo (Leslie y Summerell, 2006).
2. Agar Hoja de Clavel (CLA): es un medio de cultivo natural preparado asépticamente, en donde se prepara agar 2% (20 g de agar en 1 L de H₂O) y se colocan piezas de hojas estériles de 3 a 5 mm en un plato Petri. Se utiliza en específico para el desarrollo de estructuras macro y microscópicas de las especies del género *Fusarium* (Leslie y Summerell, 2006).
3. Agar Papa Dextrosa (PDA): es un medio de cultivo que puede prepararse a base de componentes naturales, sintéticos o semi-sintéticos. Es rico en carbohidratos estimulando el crecimiento vegetativo en muchos hongos (Leslie y Summerell, 2006).
4. Asca: célula en forma de saco o bolsa que generalmente contiene un número definido de ascosporas (típicamente ocho), que se forman (por un proceso llamado formación de células libres) por lo común después de la cariogamia y la meiosis; las ascas son características de los ascomicetes (Ulloa, 1991).
5. Ascomiceto: hongos imperfectos (no se conoce su fase sexual), caracterizados por presentar una célula fértil (célula ascógena) en forma de saco en la que ocurre cariogamia y meiosis, y da como resultado

generalmente 8 meiosporas endógenas (ascosporas). Esta estructura se denomina asco (esporangio), y constituye la sinapomorfía (novedad evolutiva que permite diferenciar a un taxón de otros taxones) del grupo. Forman un cuerpo fructífero pseudoparenquimatoso denominado ascocarpo, el que puede presentar una leve diferenciación de tejidos y varias formas: cleistotecio, peritecio y apotecio (Cabral, 2013).

6. Ascospora: espora haploide, propia de los hongos ascomicetes, que nace en el interior del asca como resultado de un proceso de reproducción sexual. (Ulloa, 1991).
7. Basidiomiceto: hongos imperfectos (no se conoce su fase sexual), en los cuales al igual que en los ascomicetos su sinapomorfía es el esporangio. En este grupo se denomina basidiocarpo, y se caracteriza por ser una célula terminal en forma de clavo en la que se produce cariogamia y meiosis, produciendo generalmente 4 esporas exógenas (basidiósporas). Todos los Basidiomicetos tienen micelios compuestos por hifas tabicadas, uni-, bi- o multinucleadas, con tabiques perforados por poros compuestos denominados dolíporos (Cabral, 2013).
8. Bipolar: se aplica al tipo de germinación que tienen algunas esporas, que emiten un tubo germinativo en cada polo. (Ulloa, 1991).
9. Células conidiógenas: en los hongos conidiales, se refiere a la célula fértil, especializada para la producción de conidios. (Ulloa, 1991).
10. Clamidospora: espora de origen asexual, recubierta por una pared celular recia y de tipo perdurante, que funciona como espora de resistencia o

latencia; respecto a su ontogenia, las clamidosporas se consideran como conidios holotáticos, por lo que no deben ser confundidos con las teliosporas de los Heteribasidiomycetes, que son de origen sexual. (Ulloa, 1991).

11. Claves taxonómicas: su propósito principal es facilitar la identificación o distinguir un tipo de organismo de otro. Las claves se construyen utilizando características contrastantes para dividir los organismos en grupos más pequeños; cada vez que se hace una elección, un número de organismos son eliminados. Si suficientes características se contrastan, el número de posibilidades para la identidad del organismo desconocido se reduce eventualmente a uno (Universidad Complutense de Madrid, 2005).
12. Conidio: también se llama conidiospora; es una espora asexual, no móvil, generalmente formada en el ápice o en un lado de la célula esporógena especializada. Los conidios pueden ser uni, bi o pluricelulares, y secos o mucosos, pero nunca se producen dentro de alguna estructura con pared celular rígida o peridio. Los conidios son las esporas asexuales de los deuteromicetes, ascomicetes y basidiomicetes. (Ulloa, 1991).
13. Conidióforo: hifa, simple o ramificada, que se diferencia morfológica y fisiológicamente de una somática por producir y sustentar conidios; éstos son generados en células especializadas denominadas conidiógenas, que pueden disponerse de manera muy diversa. (Ulloa, 1991).

14. Distoseptado: tipo de conidio pluricelular en el que cada una de las células se halla rodeada por una pared parecida a un saco o bolsa (distosepto), distinta de la pared externa o periférica del conidio, de manera que no existen verdaderos septos entre célula y célula. (Ulloa, 1991).
15. Flexuoso: torcido o doblado alternadamente en direcciones opuestas, en zigzag. (Ulloa, 1991).
16. Genuculado: arrodillado; se aplica metafóricamente a la parte de una hifa o de un conidióforo que forma codos debido a los cambios de dirección por el crecimiento simpodial del mismo. (Ulloa, 1991).
17. Hilum: cicatriz, punto o marcas de las esporas (conidios, basidiosporas, etc.) que indica el sitio de unión al esporóforo, esterigma, etc. El hilo es una estructura distintiva en algunas especies. (Ulloa, 1991).
18. Macroconidios: conidio o esporas de reproducción asexual, que se distingue del microconidio tanto por su mayor tamaño como por ser pluricelular. (Ulloa, 1991).
19. Microconidios: se refiere a un conidio pequeño, generalmente unicelular. (Ulloa, 1991).
20. Monopolar: se dice de la germinación que tiene la mayoría de las esporas, en la que se produce un tubo germinativo. (Ulloa, 1991).
21. Septo: pared celular en una célula o en una hifa. Los septos o tabiques se forman por crecimiento centrípeto de la pared celular, y se presentan con cierta regularidad espacial en los micelios septados. (Ulloa, 1991).

22. Seudosepto: membrana protoplasmática o membrana vacuolar semejante a un septo, también llamados distoseptos. (Ulloa, 1991).
23. Subglobosa: esferoidal, casi esférico; se aplica a las estructuras (esporas, esporocarpos, etc.) cuya relación entre el eje polar y el diámetro ecuatorial se encuentra entre 1.05 y 1.15. (Ulloa, 1991).
24. Tubo germinal: hifa corta que surge del poro o hendidura germinal de una espora durante la germinación, y que al continuar su desarrollo en condiciones propicias forma una hifa de mayor tamaño, incluso un micelio. (Ulloa, 1991).
25. Verruculosa: con la superficie áspera, ornamentada de microscópicas o diminutas prominencias semejantes a verrugas. (Ulloa, 1991).
26. Vesícula: recipiente o bolsa en forma de vejiga o ampolla. También se denomina vesícula a la estructura que presentan los conidióforos de algunas especies, que consiste en un hinchamiento de la parte apical, que da origen a las fiálides productoras de conidios. (Ulloa, 1991).

Anexo 2. Procedimiento para la preparación de medio de cultivo Papa, Dextrosa, Agar (PDA).

- Preparación de medios PDA a partir de papas
 1. Se lavaron de 200 a 300 gramos de papa. Se cortó la papa en pequeñas secciones y se colocó en un matraz conteniendo agua destilada. Se colocó el envase conteniendo las papas sobre un plato caliente hasta que estas se suavizaron. Se utilizaron de dos a tres capas de gasa para filtrar los pequeños pedazos de papas. Los trozos de papa suaves se exprimían a través.
 2. Se recolectó el filtrado en un matraz, se añadió 15 gramos de dextrosa, 20 gramos de agar, se aforó a un litro. Se colocó el filtrado en el plato caliente para homogenizar la mezcla.
 3. Se esterilizó el medio 20 minutos a 15 libras de presión.
 4. Cuando el medio se encontraba tibio ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), se añadieron 0.050 gramos de antibiótico (azitromicina) en 10 mL de agua, se mezcló hasta homogeneizarlo. Finalmente, se adicionó el antibiótico al medio y se vertió el medio en los platos Petri autoclavados.

Anexo 3. Procedimiento para la preparación de medio de cultivo Agar Agua.

- Preparación de medio de cultivo Agar Agua
 1. Se colocó en un matraz 1 litro de agua destilada y esterilizada, luego se añadió 20 gramos de agar y 15 gramos de dextrosa.
 2. Se colocó el matraz con la solución sobre una plancha calentadora para homogenizar la mezcla.
 3. Se esterilizó el medio 20 minutos a 15 libras de presión.
 4. Cuando el medio está tibio ($\pm 40^{\circ}\text{C}$), se vertió en los platos Petri autoclavados.

Anexo 4. Procedimiento para la preparación de medio de cultivo Hojas de Clavel, Agar, Agua (CLA).

- Preparación de medio de cultivo CLA
 1. Se preparó medio de cultivo Agar Agua.
 2. Una vez el medio estaba solidificado se colocaron pequeños trozos de hojas de clavel previamente autoclavadas.

**Nota. El medio de cultivo CLA se utilizó para estimular el crecimiento de macro y microestructuras del hongo fitopatógeno Fusarium sp.*

Anexo 5. Procedimiento para la elaboración de Polyvinyl alcohol.

Para la preparación de placas semipermanentes se utilizó Polivinyl alcohol en las siguientes proporciones: 16.6 gramos de Polyvinyl alcohol, 100 ml de agua destilada, 100 ml de ácido láctico y 10 ml de glicerol.

1. Se añadió el Polyvinyl alcohol al agua destilada y se disolvió en un baño de agua caliente a 70-80°C.
2. Luego se mezcló la solución con el ácido láctico y el glicerol y se colocó en un envase para su posterior uso.