



"Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible"

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Graduación

DIAGNÓSTICO DE LOS AGENTES CAUSANTES DEL MAL SECO EN EL CULTIVO DE QUEQUISQUE (*XANTHOSOMA* SPP) EN EL MUNICIPIO DE NUEVA GUINEA, NICARAGUA

AUTORES

Br. Markelyn José Rodríguez Zamora

Br. Danessa Joseph Ramírez Reynoza

ASESORES

Ing. MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán

Lic. MSc. Verónica Guevara Torrez

MANAGUA NICARAGUA

JUNIO, 2012



“Por un Desarrollo Agrario
Integral y Sostenible”

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

Trabajo de Graduación

**DIAGNÓSTICO DE LOS AGENTES CAUSANTES
DEL MAL SECO EN EL CULTIVO DE
QUEQUISQUE (*XANTHOSOMA* SPP) EN EL
MUNICIPIO DE NUEVA GUINEA, NICARAGUA**

AUTORES

Br. Markelyn José Rodríguez Zamora

Br. Danessa Joseph Ramírez Reynoza

ASESORES

Ing. MSc. Yanet Gutiérrez Gaitán

Lic. MSc. Verónica Guevara Torrez

Presentado a la consideración del honorable tribunal examinador, como requisito
para optar al grado de Ingeniero en Sistemas de Protección Agrícola y Forestal

MANAGUA NICARAGUA

JUNIO, 2012

ÍNDICE DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTO	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
ÍNDICE DE FIGURA	v
ÍNDICE DE ANEXO	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVO	3
III. REVISIÓN DE LITERATURA	4
3.1. Generalidades del cultivo	4
3.2. Problemas fitosanitarios	4
3.3. Patógenos causantes de marchitamientos vasculares	5
3.3.1. Género <i>Pythium</i>	5
3.3.2. Género <i>Fusarium solani</i>	7
3.3.3. Género <i>Ralstonia solanacearum</i>	7
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1. Ubicación del área del estudio	8
4.2. Etapa de campo	8
4.3. Etapa de laboratorio	9
4.3.1. Medios de cultivo	9
4.3.2. Aislamiento a partir de diluciones seriadas en suelo	9
4.3.4. Técnica de aislamiento de tejido vegetal enfermó	9
4.3.4.1. Aislamiento de patógenos a partir de raíces	9
4.3.4.2. Identificación de los patógenos	10
4.3.4.3. Claves utilizadas para la identificación de los patógenos	11
4.4. Etapa de invernadero	11
4.4.1. Pruebas de patogenicidad	11
4.4.1.1. Siembra de planta sana en suelo infectado	11
4.4.1.2. Inoculación de los patógenos en suelo estéril y planta sana	11
4.4.1.3. Aislamiento de los patógenos	13
4.5. Variables evaluadas	13
4.6. Análisis de datos	13
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
5.1. Etapa de campo	15
5.1.1. Caracterización de las fincas	15
5.1.2. Descripción de síntomas del mal seco en campo	16
5.1.3. Análisis físico químico de suelo	16
5.2. Etapa de laboratorio	17
5.2.2. Patógenos de suelo y raíces	17
5.3. Caracterización macro y micro morfológica de las especies de	19

patógenos	
5.3.1. <i>Pythium myriotylum</i>	19
5.3.2. <i>Fusarium solani</i>	20
5.3.3. <i>Ralstonia solanacearum</i>	20
5.4. Etapa de invernadero	20
5.4.1. Aislamiento de patógenos de suelo y raíces de planta sana en suelo infectado	20
5.5. Pruebas de patogenicidad	22
5.5.1. Manifestaciones patológicas aéreas y en raíces de <i>Pythium myriotylum</i>	22
5.5.2. Manifestaciones patológicas de <i>Fusarium solani</i>	22
5.5.3. Manifestaciones patológicas de <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
5.5.4. Manifestaciones patológicas de <i>Pythium myriotylum</i> + <i>Fusarium solani</i> + <i>Ralstonia solanacearum</i>	23
5.5.5. Severidad en raíces	24
VI. CONCLUSIONES	25
VII. LITERATURA CITADA	26
VIII. ANEXOS	30

Tanto los estudiantes, como los demás elementos que integran la universidad, juegan un papel importantísimo en el proceso revolucionario. Pero éste debe estar vinculado con el de los demás sectores populares. A los obreros y campesinos les corresponde la parte estratégica, mientras que a los estudiantes universitarios, sobre todo en estos países sumidos en el analfabetismo, les corresponde ser el sustento ideológico, para facilitar la existencia de una adecuada conciencia revolucionaria.

Carlos Fonseca Amador

DEDICATORIA

A nuestro Padre Celestial Jesús Cristo nuestro Señor

A todos los héroes y mártires que defendieron nuestra patria.

A mis padres María Agustina Zamora y José Santos Palma, a mis hermanos Maybellyng Zamora y Andy Zamora por estar ahí siempre apoyándome y regañándome, por compartir conmigo los buenos y malos momentos de mi vida y guiarme en todo este camino. Los amo con todo mi corazón

Sobre todo dedico muy especialmente este trabajo a mis asesoras Ing. MSc. Yanet Gutiérrez, Lic. MSc. Verónica Guevara, al Dr. Guillermo Reyes e Ing. Agustín Chavarría por apoyarme en la culminación de mis estudios y sobre todo por los conocimientos y buenos valores que me brindaron, por sus consejos y toda la confianza que depositaron en mí y por no dudar de mis capacidades.

A Danessa Joseph por mostrarme el gran tesoro que es como persona y apoyarme en cada momento de mis proyectos, en las buenas y malas, por enseñarme el valor de una verdadera amistad. Sé que nunca me perdonará cuando te decepcioné y siempre lo tengo presente pero soy ser humano. Pero tu "maclo" que te quiere mucho siempre estará ahí para todo lo que necesites, apoyándote en las buenas y malas.

Markelyn José Rodríguez

AGRADECIMIENTO

A mis asesores Ing. MSc. Yanet Gutiérrez, Lic. MSc Verónica Guevara, por estar ahí siempre apoyándome y formándome como un profesional entusiasta y por brindarme todos los conocimientos científicos, por no dudar de mis capacidades como profesional. Muchas bendiciones y que el amor de nuestro señor siempre este ahí rodeándolas. Nunca podre agradecerle todo lo que hicieron para formarme como un profesional competitivo y lleno de valores éticos.

Al Dr. Guillermo Reyes por el apoyo y la confianza brindada en la realización de este trabajo, por enseñarme grandes valores como profesional y cada aporte y consejo brindado para seguir adelante en este arduo camino.

A mis amigos: Ing. Agustín Chavarría, Ing. Osvaldo Rodríguez, Ing., María Navarro, Ing. Nicolás Valle, Lic. Ruth Rodríguez, Eduardo Herrera, Nicolás Valle junior, Cristóbal Lira, Jonathan Dávila, Escarleth Silva, por todo el apoyo brindado, por sus consejos, valores éticos y sobre todo por no dudar de mis capacidades y por ser un ejemplo a seguir como persona y profesional.

A los técnicos: Mario Cerna, Armando Serrato, Candida Rosa y a los profesores que me apoyaron Dr. Dennis Salazar, Dr. Arnulfo Monzón, Dr. Ulises Blandón, Dr. Oscar Gómez, Dr. Víctor Aguilar, Ing. MSc. Martha Zamora, Ing. MSc. Víctor Sandino, Ing. MSc Rosana Salgado, Ing. MSc Carolina López y en especial a nuestro querido Rector Ing. MSc Telémaco Talavera por todo su apoyo brindado y no dudar de mis capacidades como estudiante y por cada grano de arena que brindaron para mi formación profesional.

Markelyn Rodríguez

DEDICATORIA

Le dedico este trabajo a Dios, que es tan sabio, que todo lo puede, y ha hecho que llegue a este punto de mi vida, también a nuestra madre santísima la siempre Virgen María, por que se, que es ella la que intercede por cada uno, para que cumplamos con nuestros sueños y metas.

A mi familia, que ha sido siempre y en toda circunstancia de mi vida, fuesen estos buenos o malos momentos, el pilar y fortaleza de mi existir, a Mis Madres Nery Sánchez y Luisa Reynoza, a Mi Padre Luis Reynoza, por apoyarme e impulsarme siempre a salir adelante, por darme Amor, y palabras de aliento cuando las necesite, por darme un consejo cuando creían que cometía errores.

A la memoria de mi amado hermano Francisco Ezequiel, que siempre fue un ejemplo de fortaleza ante las adversidades y que a pesar de que fue un sobreviviente de la crueldad de la vida, siempre mantuvo una sonrisa y fue un ser luchador, que defendía sus sueños y los míos, siempre vivirá en mi corazón y sé que sus recuerdos siempre pondrán una gota de Fe, Amor, Alegría y Esperanza en mi vida.

A mi compañero, amigo, confidente y cómplice, Markelyn José Rodríguez Zamora, por apoyarme y aguantarme, por estar ahí siempre que lo necesité y nunca abandonarme, por ser siempre tan leal y sincero, por simplemente ser como es él, una gran persona con lindos sentimientos y grandes sueños.

Danessa Joseph Ramírez Reynoza

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco primera y principalmente, a la Ing. MSc. Yanet Gutiérrez y la Lic. MSc. Verónica Guevara, por haber sido todo este tiempo un ejemplo de vida para mí y compartir sus conocimientos y sobre todo haber aguantado y tenido paciencia con todos los errores cometidos durante la realización de este trabajo.

A mi familia, que me han brindado siempre su apoyo moral, espiritual y económico.

A mi padre Ernesto Ramírez, mis hermanos Ezequiel, Erika, Sophia Ramírez y Roberto Gadea, a mi abuela Ofelia Bustamante de Ramírez, a mis tíos, Freddy y Cela Reynoza, a mis primos Roniel, Nazari, Jesling, Janny, Aryok y Josny que siempre han estado ahí, apoyándome.

Al Ing. Eduardo López Dávila, por ser un ejemplo, de lucha, dedicación y trabajo constante, por enseñarme que en la vida nada es fácil y uno siempre debe seguir sus sueños y cumplir sus metas, por darme la oportunidad de aprender de él, al Dr. Arnulfo Monzón por el apoyo brindado.

A mis amigos, Carlos Ramírez, Isaura Palma, Marbel Centeno, Marisol Vásquez, María Marlene Navarro, Markelyn Rodríguez, Carla Adriana Mendoza, Ricardo Torrez, Karen Mendoza, Jhader Robles, Geovanni y Jonny Gómez, que han sido parte fundamental de mi vida, por el cariño y apoyo que siempre me han brindado y han estado junto a mí en las buenas y malas rachas de mi vida.

A todo el claustro de docentes de la Universidad Nacional Agraria, pero principalmente a los docentes del DPAF, por haber ayudado a mi formación personal y profesional.

Danessa Joseph Ramírez Reynoza

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Frecuencia de patógenos en suelo	18
2	Frecuencia de patógenos en raíces	18
3	Frecuencia de patógenos de suelo, planta sana en suelo infectado	21
4	Frecuencia de patógenos de raíces, planta sana en suelo infectado	21
5	Severidad de los tratamientos en raíces	24

ÍNDICE DE ANEXO

ANEXO		PÁGINA
1	Encuesta realizada al agricultor	31
2	Medios de cultivos	32
3	Pruebas bioquímicas	33
4	Pruebas de patogenicidad	35
5	Inoculación vaciado al suelo	36
6	Escala de severidad en raíces	37
7	Generalidades de las fincas en estudio	38
8	Síntomas del mal seco en campo	39
9	Análisis físico de suelo	40
10	Análisis químico de suelo	41
11	Análisis patológico de suelo	42
12	Análisis patológico de raíces	43
13	Frecuencia de patógenos de suelo, colectados en campo	44
14	Frecuencia de patógenos de raíces colectadas en campo	45
15	Caracterización macro y micro morfológica del género <i>Pythium myriotylum</i>	46
16	Caracterización macro y micro morfológica del género <i>Fusarium solani</i>	47
17	Caracterización macro y micro morfológica del género <i>Ralstonia solanacearum</i>	48
18	Frecuencia de patógenos de suelo, planta sana suelo infectado	51
19	Frecuencia de patógenos de raíces, planta sana suelo infectado	52
20	Manifestaciones patológicas aéreas y en raíces de <i>Pythium myriotylum</i>	52
21	Manifestaciones patológicas del género <i>Fusarium solani</i>	53
22	Manifestaciones patológicas del género <i>Ralstonia solanacearum</i>	54
23	Manifestaciones patológicas de <i>Pythium myriotylum</i> + <i>Fusarium solani</i> + <i>Ralstonia solanacearum</i>	55
24	Porcentaje de severidad de los patógenos en raíces	56
25	Cálculo de tasa o incremento de la enfermedad en raíces	57

RESUMEN

El objetivo del estudio fue contribuir al esclarecimiento de la etiología de los agentes causales del mal seco. La colecta de muestras de suelo y material vegetal enfermo, fue realizada en 17 fincas, en el municipio de Nueva Guinea. Se realizó un análisis patológico y físico-químico de suelo, así como una encuesta sobre el historial del manejo del cultivo. Para el aislamiento de agentes causales se utilizaron los medios: papa dextrosa agar (PDA), agar nutritivo (AN) y agar harina de maíz más antibióticos Pimaricina, Ampicilina y Rifampicina (PARC). Para la prueba de patogenicidad, se sembraron plantas en suelo infectado y en suelo estéril donde se inoculó con los patógenos: *Pythium myriotylum*, *Fusarium solani*, *Ralstonia solanacearum* y *Pythium myriotylum*+*Fusarium solani*+*Ralstonia solanacearum*; los que fueron previamente aislados de raíces. Las variables evaluadas fueron frecuencia de aparición de patógenos y severidad en raíces. Los datos de crecimiento de los patógenos en los diferentes medios de cultivos fueron analizados por el método de Chi cuadrado. La frecuencia de aparición de *P. myriotylum*, en medio PARC, *Fusarium solani* PDA, y *Ralstonia solanacearum* en AN, fueron significativos con $P < 0.0001$ en los aislados de raíces y suelo. Las plantas sembradas en suelo inoculado con *Pythium myriotylum* presentaron clorosis generalizada en las partes aéreas mientras en *F. solani* y *R. solanacearum*, presentaron coloración verde pálido y flacidez en hojas. En raíces *P. myriotylum* presentó pudrición y descortezamiento, *F. solani* pudrición seca y *R. solanacearum* puntos necróticos acuosos. Se observó un 80 % de severidad en raíces en los tratamientos de *P. myriotylum* y *P. myriotylum* + *F. solani* + *R. solanacearum* con tasa de incremento de la enfermedad de 0.005 y 0.006 respectivamente. El tratamiento *P. myriotylum* presentó los síntomas característicos del mal seco: clorosis generalizada, caída del pecíolo en forma de arco, pudrición y descortezamiento en raíces.

ABSTRACT

The objective of this study is to clarify the etiology of the causal agents of dry root disease. The collection of soil samples and diseased plant material was conducted in 17 farms in the municipality of New Guinea. An analysis of pathology and management of soil physical-chemical were done, and a survey of the history of crop management. For the isolation of causative agents were used: potato dextrose agar (PDA), nutrient agar (NA) and cornmeal agar plus antibiotics Pimaricin, Ampicillin, and Rifampicin (PARC). For the pathogenicity test plants were sown in infected soil and sterile soil where it was inoculated with pathogens: *Pythium myriotylum*, *Fusarium solani*, *Ralstonia solanacearum* and *Pythium myriotylum* + *Fusarium solani* + *Ralstonia solanacearum*: those who were previously isolated from roots. The variables assessed were occurrence of pathogens and severity in roots. Growth data of pathogens in the different cultures were analyzed by chi-square method. The frequency of occurrence of *P. myriotylum* amid PARC, *Fusarium solani* in PDA and *Ralstonia solanacearum* An, were significant at $P < 0.0001$ in isolates from roots and soil. Plants grown in soils inoculated with general chlorosis *Pythium myriotylum* in the aerial parts while in *F. solani* and *R. solanacearum*, had pale green leaves and flaccid. In roots *P. myriotylum* presented rot and barking. *F. solani* dry rot and *R. solanacearum* aqueous necrotic spots. Being watched by 80% severity on roots in the treatment of *P. myriotylum* and *P. myriotylum* + *F. solani* + *R. solanacearum* with increased rates of 0.005 and 0.006 disease respectively. The treatment *P. myriotylum* presented the following characteristic symptoms of dry root disease: generalized chlorosis, loss of arch-shaped petiole, decay and barking in roots.

I. INTRODUCCION

El quequisque (*Xanthosoma* spp) es una planta ampliamente cultivada en Centro y Sur América, Hawái, Florida, y es probablemente de origen Antillano. Perteneció a la familia de las Aráceas. Morfológicamente el quequisque es una planta herbácea, suculenta sin tallos aéreos que alcanza una altura de hasta 2 m. Las hojas provienen directamente de un cormo subterráneo, primario, el cual es vertical y donde se forman cormos secundarios laterales y horizontales, que son los comestibles (INTA, 2000).

El quequisque es un cultivo apreciado para la alimentación en los países tropicales y subtropicales. Por sus valores nutricionales, su fácil cocción y sus cualidades digestivas, es un producto de alta demanda en el mercado nacional e internacional. En la dieta del nicaragüense existe la tradición de consumir quequisque lila o criollo, por su valor nutricional, rico en carbohidratos, proteínas, grasas y aminoácidos. El quequisque, se cultiva en pequeños huertos del Pacífico y la Región Autónoma Atlántico Sur (RAAS). La demanda de este rubro en mercados internacionales, principalmente a Costa Rica, Puerto Rico y Estados Unidos, lo convierte en un producto no tradicional de exportación con muchas expectativas económicas para las familias (INTA, 2000).

Uno de los problemas más graves del cultivo en la actualidad, es la aparición de una sintomatología que afecta la calidad de su producto comercial y la parte aérea de la planta. Este síndrome se caracteriza por la aparición de clorosis en las hojas que avanza hacia los pecíolos, algunas plantas permanecen enanas y otras llegan a emitir una o dos hojas nuevas que no logran alcanzar un desarrollo normal y que generalmente se marchitan. Los cormos que llegan a formarse son pequeños o escasos. Además, presentan pobre desarrollo de sus raíces y la mayor parte de ellos se necrosan.

Las principales enfermedades reportadas en Nicaragua, en el cultivo de quequisque son el virus del mosaico del Dasheen (DsMV), el cual causa pérdidas del 68 al 100 % en plantaciones comerciales (Reyes, 2005); y el mal seco que es considerado como el principal obstáculo de la producción de quequisque y malanga a nivel mundial. En nuestro país los

agentes causales no están claramente definidos, pero las pérdidas frecuentemente son totales y actualmente no existen estrategias de manejo efectivas a esta enfermedad.

Considerando que en el país existen limitados estudios acerca de la identificación de los agentes causales del mal seco y por la importancia del cultivo de quequisque en la economía nacional y en los productores principalmente de Nueva Guinea, el presente estudio se aislaron e identificaron los patógenos asociados a esta enfermedad, se realizaron pruebas de patogenicidad utilizando las pruebas de patogenicidad para determinar cuál de los patógenos aislados presentaba los síntomas característicos del mal seco, para así contribuir al esclarecimiento de los patógenos involucrados en esta enfermedad.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Contribuir al esclarecimiento de la etiología de los agentes causales de mal seco en el cultivo de quequisque

2.2 Objetivos específicos

Identificar los agentes patogénicos, bacterias y hongos de raíces y suelo provenientes de fincas productoras de quequisque

Realizar las pruebas de patogenicidad, para los patógenos aislados de raíces

III. REVISION DE LITERATURA

3.1. Generalidades del cultivo

Xanthosoma es un género de cerca de 50 especies tropicales y sub-tropicales de la familia de las Aráceas, todas nativas de regiones tropicales de América. La mayoría son utilizadas como plantas ornamentales y hortícolas. Algunas especies como *X. sagittifolium*, *X. atrovirens*, *X. violaceum*, *X. mafaffa*, han sido domesticadas. Entre las especies comestibles se encuentran *X. violaceum*, y *X. sagittifolium*, las que se cultivan especialmente en el Caribe, América Central, África Subsahariana y Asia (Wikipedia, 2010).

En Nicaragua son pocos los cultivares que se explotan comercialmente (*X. violaceum*, y *X. sagittifolium*) y ninguno es resistente al mal seco. Para garantizar el aumento sostenido de los rendimientos y la rentabilidad del cultivo se requieren genotipos resistentes a los factores bióticos (plagas y enfermedades) y abióticos (factores climáticos, edáficos, etc.) (Reyes, 2005). No obstante, el cultivo se enfrenta a limitaciones de producción como plagas, enfermedades y baja fertilidad del suelo en cualquier parte del continente donde se cultiva el quequisque los problemas más graves son las enfermedades (INTA, 2000).

3.2. Problemas fitosanitarios

El principal problema que enfrenta la producción quequisquera mundial es la reducción del rendimiento y la tendencia a desaparición del cultivo debido al ataque de la enfermedad conocida como mal seco y el Virus del Mosaico del Dasheen (DsMV), enfermedades diseminadas principalmente a través del material de propagación (Reyes 2005).

En Nicaragua, el mal seco se reporta principalmente en los departamentos donde la producción es orientada a la exportación: Nueva Guinea, El Rama, Jinotega, Matagalpa y sus efectos son evidentes en la baja producción. A pesar de la importancia actual y potencial el área de siembra total se ha reducido de manera constante. El área de siembra de 30 000 ha en 2001 (MAGFOR, 2005) disminuyó 6 450 ha en el 2004 (CEI, 2005). El rendimiento nacional

promedio también declinó de 19 a 22 t/ha en 1999 (INTA, 2000) a 7.2 t/ha en el 2004 (MAGFOR, 2005).

3.3. Patógenos causantes de marchitamientos vasculares

Los marchitamientos vasculares son enfermedades que se encuentran ampliamente distribuidas en suelos y agua de todo el mundo y son muy destructivas. Todos los marchitamientos vasculares, tienen ciertas características en común, cuando el patógeno llega a la raíz de la planta, el micelio del hongo se extiende hasta los vasos xilémicos y se propaga a través de ellos en el tallo y en el resto de la planta, los vasos xilémicos formados disminuyen y sus paredes celulares adelgazan, las células parenquimatosas en torno a los vasos xilémicos son estimulados por las secreciones del patógeno para que se dividan excesivamente y esto, aunado a las paredes adelgazadas y debilitadas de los vasos, da como resultado la disminución del diámetro o el colapso total de los vasos. Las hojas de plantas infectadas y partes de la planta pierden su turgencia, se debilitan y adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso, decaen y finalmente se marchitan y mueren (Agrios 2007).

3.3.1. Género *Pythium*

Pythium pertenece al Reino: *Chromalveolata*, Filo: *Heterokontophyta*, Clase: Oomicetes Orden: *Pythiales*, Familia: *Pitiácea*, Género: *Pythium* (Van Der Plaats-Niterink, 1981). Los Oomycetes se caracterizan por la presencia de celulosa, también de glucanos y de un aminoácido llamado hidroxiprolina, el cual no se encuentra en la pared celular de los hongos. El género *Pythium* comprende aproximadamente 120 especies que ocupan diversos hábitat que van desde los ecosistemas terrestres a los estuarios de agua salada (Martín y López, 1999). Muchas especies de *Pythium* son patógenas de plantas, mientras que otros son saprófitos estrictos (Van Der Plaats-Niterink, 1981).

Las especies de *Pythium* son los patógenos de suelo más importante por su capacidad de infectar a una gran variedad de plantas. La infección a menudo ocurre en pre-emergencia y post emergencia, y resulta en ahogamiento de las plántulas y pudrición de la raíz. Las especies

de *Pythium* se encuentran ampliamente distribuidas en los suelos y aguas de todo el mundo en regiones cálidas con una gran gama de huéspedes. *Pythium* spp sobrevive en el suelo como organismo saprófito sobre restos vegetales y animales muertos, como parásito atacando las raíces fibrosas de las plantas (Agrios, 1988) o por la producción de estructuras de reposo resistentes como oosporas. Las oosporas están en reposo en el suelo, pero puede germinar en la presencia de exudados de la raíz o semilla. La supervivencia en el suelo de las especies de *Pythium* consideradas saprófitas, se consideran menos importantes (Martin y López, 1999).

Las afectaciones por *Pythium* spp generalmente presentan retraso en el crecimiento de las plantas y puede causar importantes pérdidas económicas, especialmente cuando la raíces primarias son productos cosechables (Martin y López, 1999), como en el caso del quequisque, la remolacha o la zanahoria. Las plantas afectadas por *Pythium* son propensas al ataque de otros patógenos. El desarrollo de la enfermedad se produce cuando el tubo germinal o el micelio entran en contacto con el tejido de las plántulas, ya sea al azar o bien debido a que los exudados de estas plántulas le sirven al patógeno, como nutrientes, estimulantes químico trópicos para sus zoosporas y micelios (Agrios. 1988).

El micelio de las especies de *Pythium* puede ser incoloro, brillante, ligeramente amarillento o grisáceo color lila. El micelio puede ramificarse de forma apical en ángulo recto para formar estructuras que conocemos como hifas, estas producen núcleos diploides que no están divididos transversalmente (septos), excepto en los más viejos. Las paredes de las hifas se componen de un 80 a 90 % de polisacáridos principalmente. La quitina es rara en las paredes de las hifas, mientras que el contenido de proteínas y lípidos es de 8.3 a 1.3 % respectivamente. *Pythium* spp puede producir hifas con regiones hinchadas y digitadas llamados apresorios que permiten que el patógeno se adhiera y penetre a las células del huésped (Van der Plaats-Niterink, 1981).

La reproducción asexual, se da mediante la producción de esporangios y zoosporas. Por otra parte las hifas pueden producir anteridios (órgano masculino) y el órgano femenino (oogonio). Un anteridio podrá rodear al talo oogonial al ser atado a la parte del oogonio antes de introducir un tubo de fertilización con posterior liberación del núcleo gamético (Van der Plaats-Niterink 1981).

3.3.2. Género *Fusarium solani*

Fusarium solani produce marchitamiento vasculares principalmente en flores, hortalizas anuales y plantas herbáceas perennes. *Fusarium* es un hongo que habita el suelo, infectando a plantas a través de sus raíces, en las que penetra directamente o a través de heridas.

Tan pronto como el hongo invade las raíces el micelio se extiende a los vasos xilemáticos donde forma microconidios y ascienden en toda la planta, hasta ocasionar la muerte de la misma (Agrios 2007).

3.3.3. *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum está presente en los trópicos y climas más cálidos de todo el mundo y produce enfermedades en diversos hospedantes. Los síntomas de la marchitez bacteriana aparecen como una marchitez repentina. Las plantas jóvenes mueren con rapidez y las plantas adultas pueden mostrar inicialmente debilitamiento y manchado en las hojas. Los tejidos vasculares del tallo, raíces y tubérculos se ponen café y al observarlo en cortes transversales dejan ver un exudado bacteriano de color blanquizco. Es muy común observar pústulas bacterianas en torno a los haces vasculares de la médula y corteza, lo cual hace que las raíces a menudo se pudran y desintegren cuando la planta se marchita permanentemente (Agrios 2007).

IV. MATERIALES Y METODOS

4.1. Ubicación del área de estudio

La investigación se realizó de Enero 2010, hasta Agosto 2011 y comprendió tres etapas: etapa de campo, etapa de laboratorio y etapa de invernadero. La etapa de campo inició con la colecta de muestras de suelo y material vegetal enfermo, en el municipio de Nueva Guinea, Región Autónoma del Atlántico Sur (RAAS). Localizado a 150 msnm, con coordenadas 11° 41' latitud Norte y 84° 27' longitud oeste, temperatura promedio anual de 23°C, precipitación promedio de 2 000 a 3 000 mm anual y suelos de textura arcillosa.

La etapa de laboratorio e invernadero se realizó en los laboratorios de Micología, Microbiología e invernaderos de la Universidad Nacional Agraria.

4.2. Etapa de campo

La etapa de campo consistió en coleccionar muestras de suelo y tejido vegetal enfermo en fincas con antecedentes de afectaciones del mal seco. Las fincas muestreadas, se seleccionaron con el apoyo de los técnicos del INTA de la región, quienes cuentan con un registro de afectaciones del mal seco. Se realizó una encuesta al agricultor, de cada finca muestreada con el fin de obtener información acerca del manejo del cultivo (Anexo 1). Las muestras se coleccionaron en un total de diecisiete fincas.

Para el análisis patológico (hongos y bacterias) y físico químico de suelo se coleccionaron cinco muestras de suelo en cada finca. Las muestras se coleccionaron al azar a una profundidad de 15 a 20 cm, con la ayuda de un palín graduado. En cada punto o sitio de muestreo se tomaron tres sub muestras alrededor de plantas que presentaron síntomas de la enfermedad, conformando una muestra compuesta de aproximadamente 1 kg de suelo.

Se extrajeron raíces y cormos enfermos, que fueron empacadas en papel y bolsas plásticas y debidamente rotuladas para su traslado al laboratorio.

4.3. Etapa de laboratorio

Esta etapa consistió en el procesamiento de suelo y tejido vegetal enfermo procedente de las zonas de muestreo, para aislar e identificar los posibles patógenos asociados al mal seco y obtener los cultivos puros de los patógenos y realizar las pruebas de patogenicidad.

4.3.1. Medios de cultivo

Los medios de cultivos utilizados para el aislamiento general de patógenos fueron, papa dextrosa agar (PDA) para hongos; agar nutritivo (AN) para bacterias y medio de agar con harina de maíz más antibiótico Pimaricina, Ampicilina y Rifampicina (PARC), específico para *Pythium* (Anexo 2)

4.3.2. Aislamiento a partir de diluciones seriadas en suelo (Sergueichuk, 1986)

Este procedimiento consistió en pesar un kilogramo de suelo, el cual fue homogenizado y tamizado para descartar terrones y residuos vegetales, luego se tomaron diez gramos de suelo de la muestra y se depositaron en 90 ml de agua destilada estéril, que se agitó mecánicamente durante 30 minutos y posteriormente se realizó dilución en serie, hasta obtener la dilución de 10^{-4} que fue utilizada para el aislamiento de hongos y 10^{-7} para aislamiento de bacterias. De las diluciones seleccionadas se tomó 0.2 ml de suspensión de suelo con una micro pipeta y se depositó en platos petri con medio de cultivo. Se realizaron cinco repeticiones correspondientes para cada dilución.

Los platos petri se sellaron con parafilm y se incubaron por siete días a temperatura ambiente (25- 27 ° C). A las 24 horas después de la inoculación se evaluó el crecimiento bacterial y a los 7 días se hizo el conteo de las colonias de hongos.

4.3.4. Técnica de aislamiento de tejido vegetal enfermo

4.3.4.1. Aislamiento de patógenos a partir de raíces

Este método consistió en seleccionar raíces que presentaban síntomas recientes de la enfermedad. Luego se hicieron cortes de aproximadamente 8 cm de largo los que fueron

colocados en un erlenmeyer al que se le agregó alcohol histológico al 98 % hasta cubrir las raíces, se tapó para evitar la caída de nuevos contaminantes y se agitó por 3 minutos, se extrajo el alcohol por decantación y se agregó agua estéril hasta cubrir las raíces agitándose por 3 minutos, decantando el agua estéril y volviendo a agregar más agua que se agitó por 1 minuto más.

Los trozos de raíz se extrajeron con una pinza estéril, se secaron en papel absorbente y se cortaron los extremos para eliminar la parte oxidada por el alcohol. De estos trozos se seleccionaron secciones de la zona del avance del síntoma, se hicieron cortes transversales para favorecer la salida de los patógenos y se depositaron en platos petri conteniendo los medios correspondientes para hongos y bacterias y se sellaron con parafilm.

Se realizaron cinco repeticiones (cinco platos petri), por cada medio de cultivo, sembrando en cada plato petri, cinco trozos de tejido vegetal enfermo. Se observaron los aislamientos cada día hasta descubrir su crecimiento, para su respectiva identificación y aislamiento, para la obtención del cultivo puro.

4.3.4.2. Identificación de patógenos

Los patógenos encontrados fueron identificados mediante la utilización de claves taxonómicas, caracterización macro morfológicas: características de crecimiento en medio de cultivo (color, forma de crecimiento, elevación de micelio) y observación al microscopio de sus características micro morfológicas (formación y medición de estructuras fructíferas).

Las especies de *Pythium* se identificaron utilizando la clave por Van Der Plaats -Niterink (1981). Las especies del género *Fusarium* se identificaron comparando la formación de estructuras reproductivas, forma de crecimiento y coloración de micelio en los medios agar al 2% con hojas de clavel y Papa Dextrosa Agar (PDA) y la clave de Nelson y Toussoun (1983).

Los géneros de bacterias fitopatógenas fueron identificados mediante las pruebas bioquímicas según Schaad (1994) (Anexo 3).

4.4. Etapa de invernadero

4.4.1. Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad fueron realizadas con dos finalidades: obtención de patógenos de raíces jóvenes e inoculación en suelo estéril con los diferentes patógenos aislados de raíces, utilizando plantas sanas aplicando los postulados de Koch (Anexo 4).

4.4.1.1. Siembra de plantas sanas en suelo infectado

Se sembraron plantas sanas desarrolladas en el laboratorio de tejido de la UNA, en suelo infectado procedente de los lugares donde se realizó las colectas de muestras. Se establecieron en maceteras 5 plantas por muestra.

Los síntomas aéreos y de raíces que presentaron las plantas fueron evaluados a los 8 y 15 días después de la siembra. Para observar el daño en raíces, se extrajo la planta para su posterior procesamiento en laboratorio e identificación.

4.4.1.2. Inoculación de los patógenos en suelo estéril y planta sana

Se inoculó los patógenos debidamente identificados en suelo procedente de las zonas de muestreo, esterilizado a 200 °C, en dos días consecutivos. El inóculo se obtuvo de las muestras colectadas en las diferentes fincas.

Para la inoculación de los patógenos *Pythium* y *Fusarium*, aplicamos la metodología según Artavía *et al.* (2010), que consistió en cultivar en medio PARC *Pythium* y en PDA *Fusarium*. Posteriormente se inocularon los patógenos en arroz a fin de obtener un sustrato para la subsecuente inoculación del hongo *in vivo*. Para esto se utilizaron erlenmeyers de 125 ml con 26 g de arroz y 14 ml de agua, que se esterilizaron dos veces consecutivamente, durante 25 min a 121 °C en autoclave. Cada erlenmeyer se inoculó con cuatro secciones (5 mm de

diámetro) de agar, colonizado con el cultivo puro de *P. myriotylum* y *Fusarium solani*, incubados a 21 °C durante una semana, agitando el frasco cada dos días, hasta que los granos de arroz fueron colonizados en su totalidad.

En cada macetera se distribuyeron 20 granos de arroz colonizados con *P. myriotylum*, colocados en cinco puntos alrededor de las plantas, a temperatura ambiente, se regó manualmente diario (mañana y tarde), para proveer suficiente humedad al suelo.

Para la inoculación de bacterias se empleó la técnica de inoculación vaciado al suelo empleada por French y Hebert (1980) (Anexo 5). La suspensión se obtuvo, del medio agar cloruro de tetrazolio, la solución se preparó en agua destilada estéril y se ajustó a una densidad óptica de 600 nm, (OD_{600}) = 0,3 (aproximadamente 6×10^8 ufc/ml), medida con un colorímetro de acuerdo a lo propuesto por Michell y Mew (1998). En cada macetera se depositó 3 ml de la suspensión.

Se utilizaron plantas de cultivo *in vitro* del laboratorio de cultivo de tejido de la Universidad Nacional Agraria, con doce semanas de aclimatización.

Se establecieron las siguientes inoculaciones:

1. *Pythium myriotylum*
2. *Fusarium solani*
3. *Ralstonia solanacearum*
4. *P. myriotylum* + *F. solani* + *R. solanacearum*
5. Testigo

Se observó y evaluó el avance de la enfermedad cada tres días después de la inoculación, durante un mes utilizando como base, la presencia de síntomas en partes aéreas de las plantas. Para evaluar la severidad en raíces se utilizó la escala usada por Fontem (2008) (Anexo 6).

4.4.1.3. Aislamiento del patógeno

Para comprobar la presencia de los patógenos inoculados, cada tres días después de la inoculación, se procedió a sembrar en los diferentes medios de cultivo, las raíces extraídas de los tratamientos. Los platos se incubaron a temperatura ambiente de 26 °C, hasta observar el crecimiento de los patógenos sobre los medios del cultivo, se utilizó el microscopio para observar las formas y estructuras características de los patógenos, para su debida identificación.

4.5. Variables evaluadas

- **Frecuencia de aparición de los patógenos**

La frecuencia de aparición de los patógenos se evaluó a partir de la observación de características macro y micro morfológicas de los patógenos.

- **Severidad en raíces**

Se registraron datos a los 3, 6 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 y 30 días después de la inoculación (ddi), utilizando como base la escala de Fontem (2008).

4.6. Análisis de datos

A los datos, se le realizó un análisis descriptivo de la información colectada a través de las encuestas. En los ensayos de los postulados de Koch, se calculó la tasa de incremento de la severidad en raíces (**r**), para explicar la intensidad o pendiente, usando el modelo mono molecular (Vander- Plank, 1963,1968 citado por Campbel y Madden, 1990).

$$r = \frac{1}{(t_2 - t_1)} \left[\left(\log_e \left(\frac{1}{1-Y_2} \right) \right) - \left(\log_e \left(\frac{1}{1-Y_1} \right) \right) \right]$$

Donde

r = tasa de incremento de la enfermedad

1 = constante (tejido sano)

t₂ = tiempo (segunda evaluación)

t₁ = tiempo (primera evaluación)

log e = logaritmo natural

A los datos de frecuencia de aparición de los patógenos se le realizó una prueba de chi-cuadrado (X^2).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Etapa de campo

5.1.1. Caracterización de las fincas

En base a la información obtenida mediante la encuesta realizada a los agricultores de las 17 fincas donde se colectaron las muestras de suelo y tejido vegetal, se observó que el cultivar Quequisque lila (*Xanthosoma violaceum* (L.)) predominó en 16 de las fincas muestreadas, y solamente en la finca del productor Ramón Inés García se encontró el cultivar Quequisque blanco [*Xanthosoma sagittifolium* L. (Shott)].

Las áreas de siembra oscilaron entre 1 mz a 25 mz, con densidad poblacional de diez mil plantas por mz (Anexo 7). De los agricultores encuestados el 90% realizan un manejo tradicional en aquellas áreas de siembra de tres a cinco mz, el cual consiste en labranza de suelo con tracción animal, aplicación de fertilizante completo fórmula 10-30-10 al momento de la siembra y eliminación de arvenses en etapa vegetativa con herbicidas. En este tipo de manejo se realiza desinfección de semilla con Benomil (Benomil 50 WP[®]) con dosis de 10 ml en 200 l de agua, sumergido durante cinco minutos.

El manejo convencional se realiza en áreas de 7 a 25 mz según la información recopilada. Este manejo consiste en labranza mecanizada y aplicación de productos químicos: fungicidas, herbicidas e insecticidas, para el manejo de plagas. La desinfección de semilla lo realizan con Benomil (Benomil 50 WP[®]) al momento de la siembra y quince días después aplicación de Silvacur (Tebuconazole[®]) con dosis de 10 ml en 200 l de agua aplicado cada quince días durante tres meses. Los productores expresan que las medidas de manejo que aplican al mal seco no tienen efectos sobre la enfermedad.

En las áreas de siembra los cultivos que los productores establecían anteriormente al quequisque son: yuca, malanga, maíz, frijol y pasto. Al momento de las colectas de muestras

las plantaciones de quequisque se encontraban en etapa vegetativa y fructificación, con edades de 2 a 10 meses.

5.1.2. Descripción de síntomas del mal seco en campo

Al realizar las colectas de muestras en las plantaciones, los síntomas observados en las plantas fue clorosis de las hojas más viejas, las hojas jóvenes presentaban color verde pálido y en casos severos las hojas estaban dobladas en forma de arco. Un síntoma típico fue, que al tomar la planta y levantarla, esta se desprendía fácilmente, porque el sistema radicular estaba totalmente destruido o había pobre crecimiento de raíces. La enfermedad se observó en un rango visual del 5-90%, con distribución focalizada (Anexo 8).

5.1.3. Análisis físico químico de suelo

El resultado de los análisis de suelo indica que en las 17 fincas en estudio los suelos son arcillosos, con mayor porcentaje de arcilla y menor en partículas de limo y arena (Anexo 9), con acidez de medio a fuertemente ácidos y con altos contenidos de materia orgánica excepto dos fincas (Anexo 10).

La cantidades de nitrógeno total es alto en todos los suelos estudiados, el contenido de potasio es pobre, característico de los suelos de Nueva Guinea debido a las condiciones climáticas, relacionado con la acidez, todos los suelos presenten limitaciones de las bases Ca, Mg, K y presentan niveles altos de los micronutrientes Fe y Zn.

De acuerdo con Elango (1998) y Dávila *et al.*, (2010), el mal seco se desarrolla en condiciones ambientales de 90% de humedad relativa, pH 5 a 5.5, precipitaciones de 400 a 700 mm y que el mal seco se asocia a deficiencia de potasio.

5.2. Etapa de laboratorio

5.2.2. Patógenos aislados de suelo y raíces

En el análisis patológico de suelo fueron encontrados los siguientes patógenos: *Fusarium solani*, *Pythium myriotylum*, *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina* spp y *Ralstonia solanacearum*, los géneros *Macrophomina* y *Rhizoctonia* fueron aislados solamente de las muestras provenientes de tres fincas (La Herencia, El Esfuerzo y El Sincoyal) y su crecimiento está probablemente relacionado a los antecedentes de las parcelas, ya que anteriormente al cultivo de quequisque, se cultivó frijol (Anexo 11).

En raíces se encontraron: *P. myriotylum*, *F. solani* y la bacteria *R. solanacearum*. En la finca La Herencia no se aisló *P. myriotylum* esto se debió posiblemente a la edad de la plantación, que correspondía a 9 meses (etapa reproductiva), las raíces procesadas, se encontraban lignificadas y no había raíces tiernas y suculentas. Pero si fue aislado en suelo, esto evidencia que el patógeno estaba presente (Anexo 11 y 12).

Agrios (1988) refiere que las plantas adultas rara vez son destruidas por *Pythium* ssp, ya que si la plántula ha logrado su completo desarrollo y ha formado paredes celulares lignificadas y densas, la propagación del patógeno se inhibe a nivel de la zona de infección (o cerca de ella) y solo produce lesiones pequeñas. Los tejidos maduros y bien desarrollados presentan una resistencia considerable a la presión mecánica y actividad enzimática debido al gran grosor y la estructura modificada de sus paredes celulares.

En el medio PDA siempre se observó un asocio de crecimiento simultáneo de los patógenos *P. myriotylum*, *F. solani* y *R. solanacearum*. El crecimiento de la bacteria siempre fue persistente, a pesar del uso de antibióticos, así que para lograr obtener el cultivo puro de *P. myriotylum*, se transfirió una porción de micelio al plato petri y posteriormente se colocó encima una porción del medio PARC, para evitar la oxigenación de la bacteria y su crecimiento.

Pacumbaba *et al.* (1992) refiere que obtuvo el cultivo puro de *Pythium myriotylum* a partir de raíces con síntomas de mal seco en quequisque, utilizando antibióticos.

Para el análisis estadístico se consideró a los patógenos de interés en el estudio. La frecuencia de aparición de los patógenos, fue significativa tanto en suelo como en raíces, aunque fue en los aislados de raíces, donde hubo mayor frecuencia de aparición de los patógenos. En raíces predominó *P. myriotylum*, en 91.26 % en medio específico PARC y alcanzó una frecuencia de aparición de 41.18 % en suelo y mantuvo un crecimiento combinado con *F. solani* y *R. solanacearum* en todos los medios de cultivos (Figura 1 y 2).

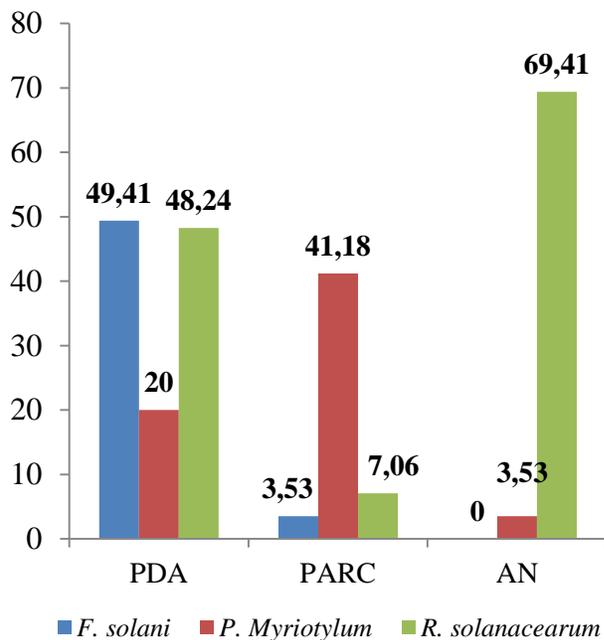


Figura 1. Frecuencia de patógenos en suelo

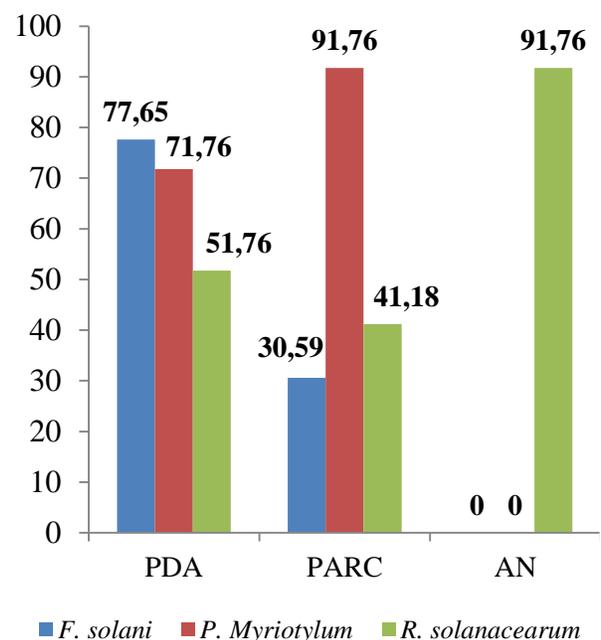


Figura 2. Frecuencia de patógenos en raíces

P. myriotylum, en medio PARC, la frecuencia de aparición fue mayor que *R. solanacearum* y *F. solani*, tanto en el caso de los aislados procedentes de suelo ($\chi^2=51.4724$; $P<0.0001$) como para raíz ($\chi^2=73.2864$; $P<0.0001$). En medio PDA la frecuencia de aparición de *F. solani* es

mayor en suelo ($x^2=19.7748$; $P < 0.0001$) y raíces ($x^2=14.1667$; $P < 0.0008$) con respecto a *P. myriotylum* y *R. solanacearum* ($x^2=19.7748$; $P < 0.0001$). *P. myriotylum* y *F. solani* en raíces, en medio AN, tuvieron un crecimiento nulo, con respecto a *R. solanacearum*, ($x^2= 224.7458$; $P < 0.0001$). (Figura 1 y 2)(Anexo 13 y 14)

El INTA (2000) reportan que el mal seco es generado por un complejo de hongos habitantes del suelo, entre los cuales se encuentran *Rhizoctonia solani*, *Pythium* spp y *Fusarium solani*.

Espinoza *et al* (2003), en Cuba refieren a los agentes causales de mal seco como: *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium* mientras que Saborío *et al* (2003) en Costa Rica y Pacumbaba *et al.* (1992) en Camerún aislaron de tejido vegetal tres organismos, *P. myriotylum*, *F. solani* y *Rhizoctonia solani*. No obstante señalan después de realizar los postulados de Koch que *P. myriotylum* es el agente causal de mal seco, puesto que manifestara los síntomas característicos de la enfermedad, marchitamiento y pudrición de las raíces.

5.3. Caracterización macro y micro morfológica de las especies de patógenos

5.3.1. *Pythium myriotylum*

De acuerdo a la clave descrita por Van der Plaats-Niterink (1981) las características morfológicas de *Pythium* corresponde a la especie *myriotylum*. El micelio observado de esta especie en medio PARC, es de color crema y de crecimiento espaciado, pero la coloración varía en dependencia del tipo de medio a utilizar. Las hifas observadas son hialinas sin septos, la hifa principal es de 10 a 7 micras de ancho, aunque las hifas solían presentar septos cuando pasaban mucho tiempo en el medio de cultivo. Los esporangios son ligeramente inflados de 10 a 8 micras de ancho. Las estructuras de reproducción sexual observadas fueron oogonios de 26 micras de ancho y 16 micras de largo y se observaban de tres a cuatro anteridios rodeando al oogonio (Anexo 15).

5.3.2. *Fusarium solani*

El micelio observado de esta especie presentó un rápido crecimiento aéreo de color rosado/violeta bajo en medio PDA y blanco en Agar con hojas de clavel. En ambos medios se observó una abundante producción de microconidias en cadena, unicelulares. En medio PDA formó macro y micro conidias y clamidiosporas (Anexo 16).

5.3.3. *Ralstonia solanacearum*

Las colonias de *R. solanacearum* en el medio tetrazolium, se caracterizaron por presentar coloración blanco-cremosa, con el centro rosado, bordes irregulares, haciéndose visibles a partir de las 48 horas de incubación, completándose su desarrollo máximo a las 72 horas.

Las células de *R. solanacearum* observadas en el microscopio presentaron forma bastonada, con un penacho de flagelos en sus extremos. La respuesta a la tinción Gram resultó ser negativa, las observaciones de estas características morfológicas de colonias y de células permitió identificar a la bacteria *R. solanacearum*. Estas características morfológicas corresponde a las claves descritas por Schaad (1994) (Anexo 17).

5.4. Etapa de invernadero

5.4.1. Aislamiento de patógenos de suelo y raíces, de planta sana en suelo infectado

Este experimento se condujo con la finalidad de aislar *Pythium* de suelo y raíces jóvenes, en plantas *in vitro*, en suelo infectado procedente de las fincas muestreadas. Los patógenos aislados en suelo y raíces fueron: *Fusarium solani*, *Pythium myriotylum* y *Ralstonia solanacearum*, estos patógenos también fueron aislados de las muestras colectadas en campo (Figura 3 y 4).

La frecuencia de crecimiento de los patógenos fue favorecida por el tipo de medio de cultivo. En medio PARC, la frecuencia de aparición de *P. myriotylum* fue significativamente mayor

que *R. solanacearum* y *F. solani* tanto para los aislados procedentes de suelo ($\chi^2=48.1545$; $P < 0.0001$) como para raíces ($\chi^2=151.7647$; $P < 0.0001$). En el medio PDA el aislamiento de *F. solani* fue significativamente mayor en comparación a *R. solanacearum* y *P. myriotylum* en los aislados de suelo y raíces respectivamente ($\chi^2=42.3492$; $P < 0.0001$), ($\chi^2=42.3582$; $P < 0.0001$). En medio AN la frecuencia de aislamiento de *R. solanacearum* fue significativamente mayor que *P. myriotylum* y *F. solani* (Anexo 18 y 19).

El mayor porcentaje de crecimiento de colonias para cada patógenos en los diferentes medios de cultivo, correspondieron a los aislados de raíces y hubo un asocio en el crecimiento de ellos en todos los medios.

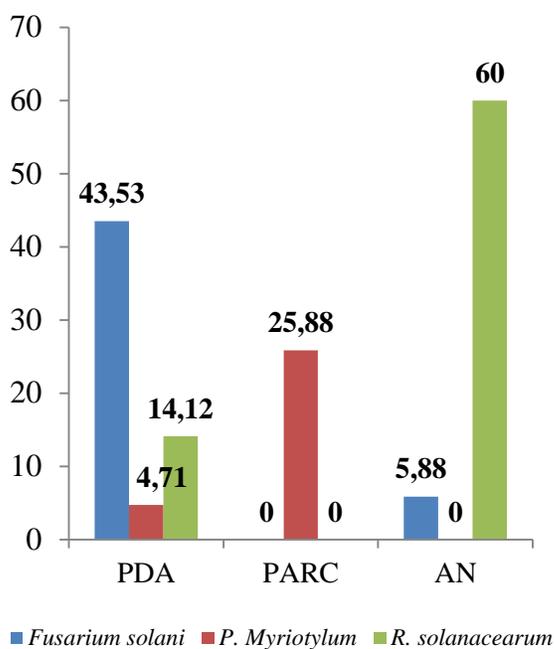


Figura 3. Frecuencia de patógenos de suelo, planta sana en suelo infectado

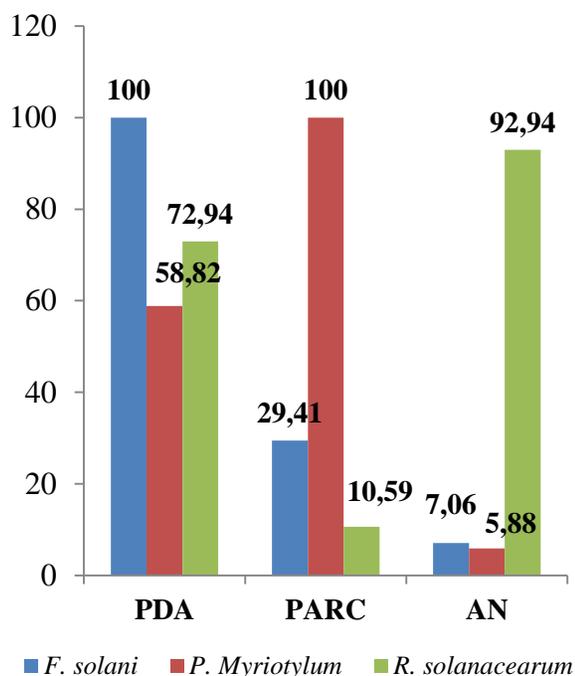


Figura 4. Frecuencia de patógenos de raíces, planta sana en suelo infectado

5.5. Pruebas de patogenicidad

5.5.1. Manifestaciones patológicas aéreas y en raíces de *Pythium myriotylum*

Los síntomas aéreos, en las plantas inoculadas con *Pythium myriotylum* se observaron a los quince días después de la inoculación (ddi) y se manifestaron como marchitez parcial, con apariencia clorótica. A los veinte y cinco días, los síntomas aéreos observados fueron clorosis y marchitamiento. Los síntomas iniciaron en las hojas más viejas presentando coloración verde pálido, en algunos casos la hoja se dobló en forma de arco y las plantas murieron. En raíces los síntomas se observaron seis días después de la inoculación, se mostraron puntos necróticos que luego se tornaban en una pudrición y descortezamiento. A los 14 (ddi), las plantas mostraban disminución del sistema radicular (Anexo 20).

Estudios realizados por Saborío *et al* (2003) en Costa Rica reportan que plantas inoculadas con *P. myriotylum* fueron cultivadas en cuatro contenidos diferentes de agua del suelo (1., 0.33, 2 y 10 bares) y refieren que a los tres días después de la inoculación, los síntomas de marchitamiento son evidentes en las hojas y a nivel de las raíces, eran evidente las primeras lesiones, todas las plantas murieron después de 10 días. Pacumbaba *et al.* (1992) refieren que síntomas incluyen raíces podridas y marchitez con clorosis general en plantas inoculadas con *P. myriotylum*.

5.5.2. Manifestaciones patológicas del género *Fusarium solani*

El síntoma observado en hojas para este patógeno consistió en una marchitez progresiva, en raíces, flacidez y falta de turgencia. A los quince días, en raíces se presentaron puntos necróticos secos (Anexo 21).

Plaza (1994) afirma que *F. solani* (Mart) Sacc ha sido considerado como el agente causal del mal seco en Puerto Rico y se ha demostrado su acción conjunta con otros patógenos (*R. Solani* Kuhn y *P. splendens* Brawn).

A si mismo Espinoza *et al* (2003), en Cuba refieren que *F. solani*, es el agente causal de la pudrición seca cortical, del quequisque ya que las raíces mostraron daños, presentando necrosis parcial o total.

5.5.3. Manifestaciones patológicas del género *Ralstonia solanacearum*

Se observó una marchitez progresiva en hojas, flacidez, falta de turgencia y pudrición acuosa en raíces y cormo (Anexo 22).

5.5.4. Manifestaciones patológica de *P. myriotylum* + *F. solani* + *R. solanacearum*

Las raíces mostraron necrosis, descortezamiento y pudrición que avanzaba progresivamente. En hojas se presentó un color verde pálido y flacidez, luego clorosis que avanzó hasta la muerte de la hoja (Anexo 23).

Estudios realizados por Saborío *et al* (2003), en Costa Rica reporta que *Pythium myriotylum* Drechs, *Fusarium solani* (Mart) Sacc y *Rhizoctonia solani* Kuhn son capaces de penetrar en las raíces de quequisque, pero sin causar síntomas visuales. No obstante refiere que *P. myriotylum* es el único que presentó los síntomas idénticos a mal seco.

5.5.5. Severidad en raíces

Tanto las inoculaciones individuales como en asocio mostraron síntomas en las palntas. La severidad en raíces para las inoculaciones de *P. myriotylum* y la combinación de los patógenos: *P. myriotylum* + *F. solani* + *R. solanacearum* se manifestaron a los seis días después de la inoculación, el comportamiento fue similar con un 80% de severidad, no obstante *P. myriotylum* por si solo causó necrosamiento, descortezamiento y marchitamiento en raíces.

Las tasas de progreso de la enfermedad fueron de 0.0530 para *P. myriotylum* y 0.0617 para la combinación de los patógenos, lo que significa que la severidad aumentó un 5.30 % y 6.17 %, diario después de la inoculación de los patógenos (Figura 5) (Anexo 24 y Anexo 25). El crecimiento de las raíces de las plantas testigos mostraron un crecimiento normal.

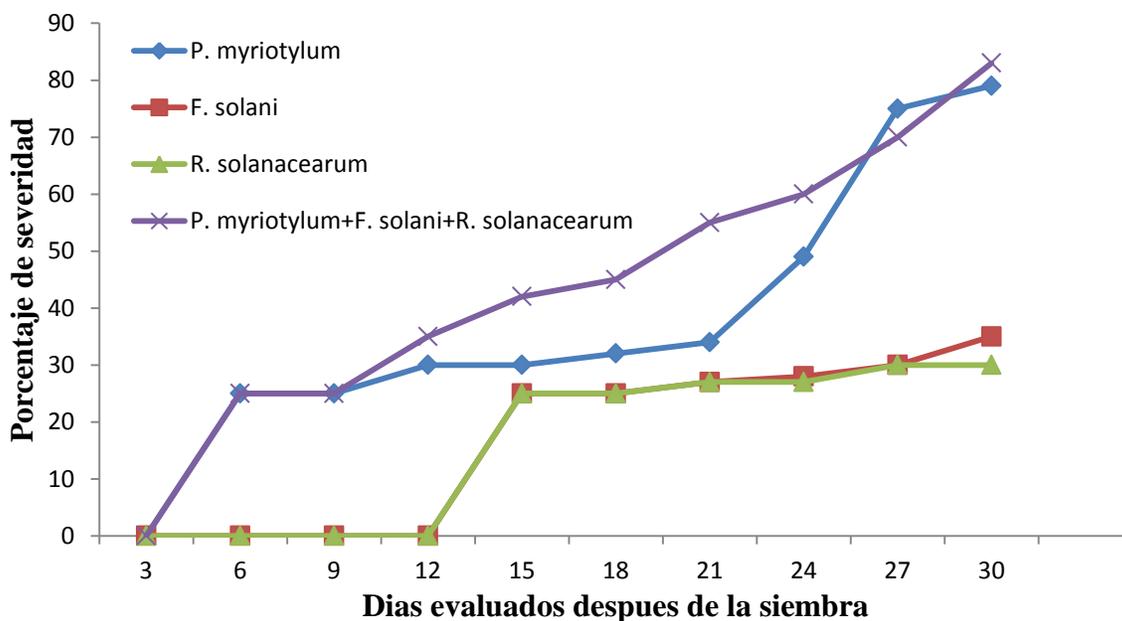


Figura 5. Severidad en raíces, en los diferentes tratamientos

VI. CONCLUSIONES

- La aplicación de las pruebas de patogenicidad demostraron que *Pythium myriotylum*, *Fusarium solani* y *Ralstonia solanacearum* son patógenicos
- Los patógenos *Pythium myriotylum*, *Fusarium solani* y *Ralstonia solanacearum*, fueron identificados en muestras de suelo y raíces colectadas en campo y pruebas de patogenicidad
- Las pruebas de patogenicidad mostraron que *Pythium myriotylum* fue el patógeno que ocasionó los síntomas característicos del mal seco
- La frecuencia de aparición de los patógenos aislados varió con relación al medio de cultivo utilizado, aunque la frecuencia de crecimiento fue favorable al medio específico para cada patógeno, siendo el medio PARC el más adecuado para *P. myriotylum*
- El progreso de la enfermedad de plantas inoculadas solo con *Pythium myriotylum*, causó necrosamiento y muerte de las raíces

VIII. LITERATURA CITADA

Adiobo, A. 2006. Biological control on cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) root rot disease caused by *Pythium myriotylum* Dresch. Importance of soil organic matter content and cultural practices. ISBN 13: 97-8905-98915-00.

Agrios, G. 1988. Plant pathology, 3th edition, Academic Press. San Diego, California.

Agrios, G. 2007. Fitopatología. Ed. Limusa s.a. MX .856 p. (2a Edición) ISBN 13: 978-968-18-5184-2.

Artavía S.; Uribe L.; Saborío F.; Arauz L.; Castro L. Efecto de la aplicación de abonos orgánicos en la supresión de *Pythium myriotylum* en plantas de tiquisque (*Xanthosoma sagittifolium*). (en línea). Costa Roca, CR. Consultado 18 nov. 2010. Disponible en http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242010000100002&script=sci_arttext.

Campbell, L.C. y Madden, V.L. 1990. Introduction to plant disease epidemiology 2da. Ed. United States of America 173, 174, 195 y 196 p

Centro de Exportaciones e Investigaciones de Nicaragua (CEI) 2005. Servicios de inteligencia comercial. Nicaragua: exportaciones Enero-Diciembre 2004.

Elango, F. 1998. Enfermedades en la producción de raíces y tubérculos. San José, Costa Rica, EARTH. 35p.

Espinoza, E. 2003. Estudio de las pudriciones secas en el cultivo de la malanga (*Xanthosoma* spp.) y *Colocasia esculenta* Schott. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV, Villa Clara, Cuba, 45 pp.

Fontem, D. 2008. Response of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) asseccions to (*Pythium myriotylum* Dresch) inoculation.

French, E. y Hebert, T. 1980 Método de investigación fitopatología. Ed. Matilde de la Cruz. CR. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. 289 p.

Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA). 2000. El cultivo del quequisque Guía Tecnológica. Managua, Nicaragua. 24 p.

MAG-FOR. 2005. Informe de producción agropecuaria de Nicaragua 2003-2004. Dirección de estadísticas del MAG-FOR. Nicaragua.

Martin, F y López J. 1999. Soilborne diseases caused by *Pythium spp*: ecology, epidemiology, and prospects for biological control. Critical Reviews in Plant Sciences 18, 111-181.

Michel, V. V. ; Mew, T.M. 1998. Effect of soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soil. Phytopathology 88 : 300- 305.

Nelson, P. ; Toussoun T y Marasas W. 1983. *Fusarium* sp: an illustration manual for identification. 193 p. University Park, Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, USA.

Pacumbaba R.; Sama, A.; Tambong, J and Nyochembeng, M. 1992. Isolation and pathogenicity of Rhizosphere fungi of cocoyam in relation to cocoyam root rot disease. Journal Phytopathol. 135: 265-273

Plaza, J. A. 1994. La etiología del mal seco de la yautía (*Xanthosoma* sp.) en Puerto Rico. Tesis M. S. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, 46 pp.

Sergueichuk, M. 1986 Guía metodológica para clases prácticas de microbiología. NI. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN).

Reyes, G. y Aguilar, M. 2005. Reproducción acelerada de quequisque (*Xanthosoma* spp.) y malanga (*Colocasia* spp.). Guía Técnica N° 8. Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.

Saborío, F.; Umaña, G.; Solano, W.; Ureña, G.; Muñoz, G.; Idalgo, N y Brenes, A. 2004. Mejoramiento genético del tiquizque (*Xanthosoma sagittifolium* Schott) contra el mal seco. Memoria REDBIO 2004.

Saborío, F. Ureña, G. y Umaña, G. 2003. Pathogenicity of *Pythium myriotylum*, *Fusarium* sp y *Rhizoctonia* spp on cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) plants under different soil water conditions.

Schaad, N.W. 1994. Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria. Second Edition. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society, página 157

Universidad Nacional Agraria. 2008. Guías y normas metodológicas de las formas de culminación de estudios. Managua, NI. 56 p.

Van Der Plaats- Niterink A. 1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology No 21 Centraalbureau voor Schimmeicultures barn, the Netherlands.200-239 p.

Wikipedia. Centro de Nuevos cultivos y Productos de plantas. Distribucion y nombres de aráceas comestibles. Universidad de purdue. Obtenido el 20 de mayo del 2010 disponible en <http://en.wikipedia.org/wiki/Xanthosomaspp>.

IX. ANEXOS

Anexo 1. Encuesta realizada al Agricultor

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA

Encuesta a Agricultores de quequisque

I. INFORMACIÓN GENERAL

Nombre del productor _____ Fecha _____ Dpto. Municipio _____
Localidad _____ Finca _____ Cultivo _____
Variedad _____ Altitud _____

Edad de la plantación _____ Etapa _____ Área /densidad sembrada _____

Descripción de síntomas si conoce la enfermedad, conocida como mal seco

Muestra colectada

Raíz _____ Suelo _____ Tallo _____ Semillas /tubérculo _____

Distribución de la enfermedad

En focos _____ Uniforme _____

Porcentaje de la infección de la enfermedad (mal seco) _____

II. MANEJO DEL CULTIVO

Cultivo anterior _____ Tipo de suelo _____ Tipo de labranza _____

USO DE AGROQUÍMICOS

PRODUCTO	DOSIS	FECHA DE APLICACIÓN	FORMA DE APLICACIÓN

III. CONDICIONES AMBIENTALES DE LA FINCA

Temperatura _____ Humedad _____ Vientos _____

Anexo 2. Medios de cultivo (Castaño. 1986)

1.1. Agar nutritivo(AN) Medio general para bacterias

Este medio viene preparado y solo se agregan 20 g a 1 000 ml de agua destilada, se ajusta el pH 7.5 y luego se esteriliza en autoclave a 121°C

1.2. Papa dextrosa Agar (PDA) Médio general para hongos

Este medio viene preparado y solo se agregan 39 g a 1 000 ml de agua destilada, se ajusta el pH y luego se esteriliza en autoclave a 121°C

1.3. Medio de harinas de maíz mas antibióticos (PARC)

Harina de maíz 60 g

Agar 12 g

Agua 1 000 ml

10 mg/L Pimaricina (20 de 50% i.a.)

10 mg/L Rifampicina (100% i.a.)

250 mg/L Ampicilina (100% i.a.)

Anexo 3. Pruebas bioquímicas

4.1. Prueba de KOH (Schaad, 1988)

Consiste en colocar unas gotas de solución de KOH al 3 % en un porta objeto, luego con un asa bacteriológica se recoge parte de la colonia y se agita en forma circular por unos minutos si las cepas son gran negativas la solución se pone viscosa y forma un hilillo mucoso al levantar el asa, las bacterias positivas se dispersan en las gotas y no presentan esta reacción.

4.2. Prueba de la catalasa (Schaad, 1988)

La mayoría de los microorganismos que crecen en un medio incubado anaeróbicamente, poseen enzima catalasa.

Utilizando un porta objeto coloque un poco de cultivo bacteriano y luego una gota de agua oxigenada, la efervescencia causada por la liberación del oxígeno libre en forma de gas, indica la presencia de catalasa en el cultivo, es decir la prueba es positiva.

4.3. Prueba oxidasa (Schaad, 1988)

Una pequeña cantidad del cultivo joven se tomará con un asa esterilizada y se depositará sobre un trozo de papel filtro que ha sido previamente empapado con un poco de solución de tetramethyl-p phenylene diamine dihydrochloride (TPDD) al 1%. La formación de un color azul o un violeta oscuro formado en el cultivo depositado sobre el papel filtro, antes de 10 segundos es un resultado positivo.

4.4. Licuefacción de la gelatina (Schaad, 1988)

Esta prueba comprueba la producción de la enzima extracelular por la bacteria, denominada gelatinasa, que tiene la propiedad de licuar la gelatina. Con ayuda de un asa sembrará la bacteria, en el medio gelatina. La observación se realizará dos semanas posteriores a la siembra, los tubos serán colocados en el refrigerador por media hora. Si el medio, luego de esa práctica, permanece sólido es señal que no hubo licuefacción.

4.5. Fermentación de carbohidratos (Schaad, 1988)

Con esta prueba se determinará la utilización de los hidratos de carbono por parte de las bacterias, por vía oxidativa (proceso aeróbico, presencia de oxígeno) o por vía fermentativa (proceso anaeróbico, ausencia de oxígeno). En un tubo de ensayo se colocará medio de cultivo de Huhg y Leifson, que es un medio semisólido, que lleva incorporado el azúcar y azul de bromo timol como indicador, se inoculará por picadura y por duplicado, cubriendo uno de los tubos con parafina líquida para crear condiciones de anaerobiosis. La positividad se traduce por un cambio del color del indicador a un color amarillo, si no hay cambio de color la reacción es negativa.

4.6. Prueba de reducción de nitratos (Schaad, 1988)

Con este ensayo se estudia la capacidad de las bacterias de reducción de nitrato a nitritos por acción de la enzima nitrato reductasa.

En un tubo con medio nitrato será inoculado con un asada de cultivo bacteriano, otro tubo servirá de testigo, se dejará incubar por tres días en incubación y luego se le agregara a cada tubo 1 ml de solución A y 1 ml de solución B, y se mezcla la aparición de un color rojo indica la presencia de nitritos.

Medio para la reducción de nitratos:

peptona 10 g.

K_2HPO_4 5 g.

Extracto de levadura 1 g

KNO_3 1 g.

Agar 2 g.

Anexo 4. Pruebas de patogenicidad (Agrios, 2007)

- ❖ El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen
- ❖ El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parasito obligado) o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parasito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzcan
- ❖ El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas
- ❖ El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y su característica deben corresponder a la anotada en el segundo punto

Anexo 5. Inoculación vaciado al suelo (French y Hebert, 1980)

Algunos patógenos pueden penetrar al hospedante a través de los órganos subterráneos sin necesidad de contar con heridas artificiales. Se vierten cantidades iguales de inóculo uniformizado al suelo en cada maceta. Se recomienda tratar de conseguir un nivel y similar de humedad en el suelo de las macetas y agregar una cantidad que lo sature al agregar el inóculo.

Anexo 6. Escala de severidad en las raíces (Fontem, 2008)

Sintomatología	Escala	Grado
Sin síntomas visible	No hay enfermedad	0
Con puntos necróticos en la raíz	1 a 25 % afectación	1
Lesiones de un centímetro	26 a 50 % afectación	2
Con al menos la mitad de la raíz afectada	51 a 75 % afectación	3
Raíz totalmente afectada	76 a 100 % afectación	4

Anexo 7. Generalidades de las fincas en estudio

Finca	Productor	Comunidad	Área en mz	Manejo Tradicional	Manejo Convencional
La Minita	Antonio Matamoros	Las Colinas	7		x
Nuevo Amanecer	Oscar Duarte	La Fonseca	2	x	
El Porvenir	Rudy Villalobos	Las Colinas	3	x	
El Tamarindo	Edgar Abelardo	La Fonseca	2.5	x	
El Pavón	Ramón García	Rio Plata	1.5	x	
El Zapote	Francisco Palacios	Carlos Abelardo	25		x
El Coyolar	Emilio Oporta	Los Ángeles	1	x	
El Recuerdo	Carlos Gutiérrez	Guinea Vieja	5		x
La Envidia	Cristina Ojeda	Monte Video	1	x	
La Herencia	Flora Gómez	Yolaina	1	x	
La Perla	Efraín Duarte	Rio Plata	3	x	
El Majinehe	Isabel Gonzales	El Escobillo	10		x
El Esfuerzo	Yamilet Bermúdez	Serrano	1	x	
Los Manantiales	Reyna Reyes	El Escobillo	1.5	x	
El Sincoyal	Mariana Lazo	Monte Video	1	x	
Las Brisas	Danilo Martínez	El Bochinche	3	x	

Anexo 8. Síntomas de mal seco en campo



Anexos 9. Análisis físico del suelo

Análisis físico del suelo				
		Partículas		
Productor	Clase Textural	Arcilla	Limo	Arena
Danilo Martínez	Arcilla	59	29,2	11,8
Luis Palacios	Arcilla	47,8	26,6	25,6
Mariana Lazo	Arcilla	49,8	30,6	19,6
Cristina Farga	Arcilla	49,8	28,6	21,6
Emilio Porta	Arcilla	49,8	26,6	23,6
Carlos Gutiérrez	Arcilla	49,8	24,6	25,6
Inés García	Arcilla	61,8	20,6	17,6
Antonio Matamoros	Arcilla	55,6	22	22,4
Edgar Abelardo	Arcilla	53,6	28	18,4
Oscar Duarte	Arcilla	43,6	28	28,4
Rudy Villalobos	Arcilla	43,6	30	26,4
Flora Gómez	Arcilla	55,8	23,2	21
Efraín Duarte	Arcilla	57,8	19,2	23
Santos Romero	Arcilla	55,8	23,2	21
Urania Yamileth	Arcilla	63,8	19,2	17
Reyna Argentina	Arcilla	57,8	21,2	21
INTA	Arcilla	50,2	23	21,7

Anexos 10. Análisis químico de suelo

Análisis químico de suelo									
Finca/Productor	Rutina					Base		Micros	
	pH	MO %	N%	P - disp.	K- disp.	Ca me/100 g suelo	Mg me/100 g suelo	Fe - ppm	Zn- ppm
La Minita/Antonio Matamoros	5.14	4.5	0.23	0	nd	2.02	1.25	20.56	3.04
Edgar Abelardo	5.02	6	0.30	0	nd	1.44	1.05	39.92	5.6
Oscar Duarte	4.78	4.4	0.22	0.01	nd	1.58	1.15	28.72	2.7
Rudy Villalobos	5.44	4.3	0.22	0	nd	3.33	1.32	19.12	3.3
INTA	4.71	3.3	0.16	1.4	0.18	1.92	1.81	32.96	5.36
Luis Palacios	5.33	4.5	0.22	0.1	0.16	1.5	0.69	37.44	3.44
Mariana Lazo	5.13	3.4	0.17	8.9	0.39	2.57	1.05	49.76	8.00
Cristina Fargas	5.92	1.8	0.09	0.7	0.21	2.28	0.53	12.8	9.36
Emilio Oporta	5.78	4.5	0.22	0.2	0.11	2.73	1.02	16.32	2.72
Carlos Gutiérrez	5.23	4.94	0.25	1.2	0.09	1.68	0.69	51.44	3.28
Inés Garcia	4.82	3.39	0.17	0.9	0.06	1.88	0.69	33.84	5.44
Danilo Martínez	5.48	4.15	0.20	0.18	0.06	1.54	0.72	27.44	5.04
Flora Gómez	5.49	2.9	0.22	2.8	0.22	2.24	1.78	32	6.32
Efraín Duarte	5.3	2.9	0.21	2.6	0.21	1.96	1.35	45.36	15.92
Santo Romero	5.1	2.9	0.22	1.8	0.15	1.66	1.32	34.08	5.36
Reyna Argentina	5.09	1.6	0.23	6.6	0.33	2.4	1.51	94.8	5.6
Urania Yamileth	5.17	9.31	0.47	2.3	0.28	2.51	1.91	63.76	11.92

Anexo 11. Análisis patológico de suelo

Finca	<i>P. myriotylum</i>	<i>Pythium ssp</i>	<i>F.solani</i>	<i>Macrophomina spp</i>	<i>Rizoctonia solani</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
La Minita	x		x			X
Nuevo Amanecer	x	x	x			x
El Porvenir	x		x			x
El Tamarindo	x		x			x
El Pavón	x	x	x			x
El Zapote	x	x	x			x
El Coyolar	x	x	x			x
El Recuerdo	x		x			x
La Envidia	x		x			x
La Herencia	x		x	x	x	x
La Perla	x		x			x
El Majinehe						x
El Esfuerzo	x	x	x	x	x	x
Los Manantiales						x
El Sincoyal	x		x	x	x	x
Las Brisas		x	x			x
CETH		x	x			x

Anexo 12. Análisis patológico de raíces

Finca	<i>Pythium myriotylum</i>	<i>Pythium spp</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Macrophomina spp</i>	<i>Rizoctonia solani</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>
La Minita	x		x			x
Nuevo Amanecer	x	x	x			x
El Porvenir	x		x		x	x
El Tamarindo	x		x			x
El Pavon	x	x	x			x
El Zapote	x	x	x	x		x
El Coyolar	x	x	x			x
El Recuerdo	x		x			x
La Envidia	x		x			x
La Herencia		x	x	x	x	x
La Perla	x		x			x
El Majinehe	x					x
El Esfuerzo	x	x	x	x	x	x
Los Manantiales	x					x
El Sincoyal	x		x	x	x	x
Las Brisas	x	x	x			x
CETH	x	x	x			x

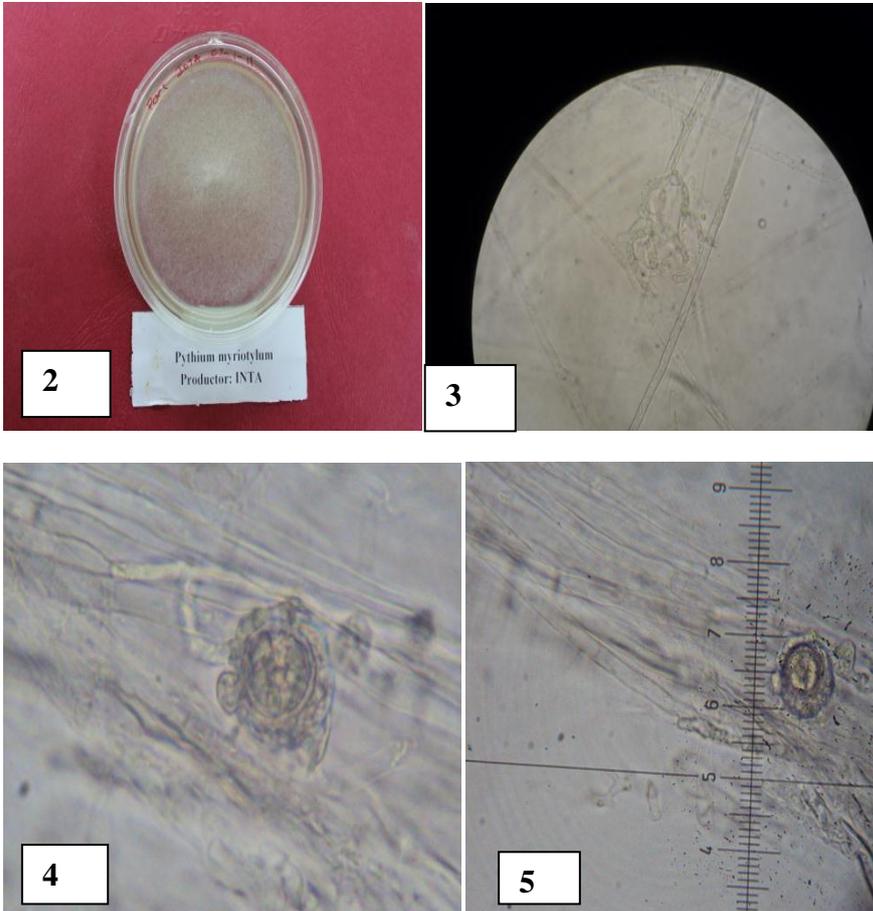
Anexo 13. Frecuencia de patógenos de suelo colectado en campo

Medio	Agente causal	Aislado	No aislado	Porcentaje	X ²	Valor P
PDA	<i>F. solani</i>	42	43	49.41	19.7748	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	17	68	20		
	<i>R. solanacearum</i>	41	44	48.24		
PARC	<i>F. solani</i>	3	82	3.53	51.4724	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	35	50	41.18		
	<i>R. solanacearum</i>	6	79	7.06		
AN	<i>F. solani</i>	0	85	0	141.2026	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	3	82	3.53		
	<i>R. solanacearum</i>	59	26	69.41		

Anexo 14. Frecuencia de patógenos de raíces colectadas en campo

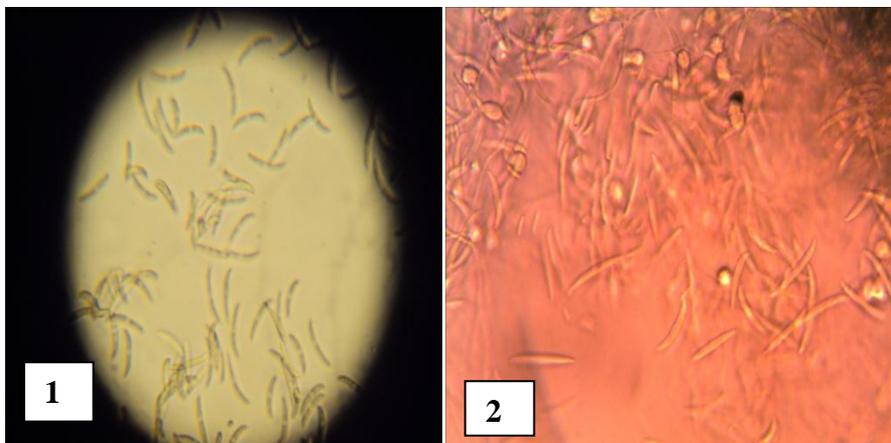
Medio	Agente causal	Aislado	No aislado	Porcentaje	X ²	Valor P
PDA	<i>F. solani</i>	66	19	77.65	14.1667	0.0008
	<i>P. myriotylum</i>	61	24	71.76		
	<i>R. solanacearum</i>	44	41	51.76		
PARC	<i>F. solani</i>	26	59	30.59	73.2864	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	78	7	91.76		
	<i>R. solanacearum</i>	35	50	41.18		
AN	<i>F. solani</i>	0	85	0	224.7458	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	0	86	0		
	<i>R. solanacearum</i>	78	7	91.76		

Anexo 15. Caracterización macro y micro morfológica de genero *Pythium* *myriotylum*



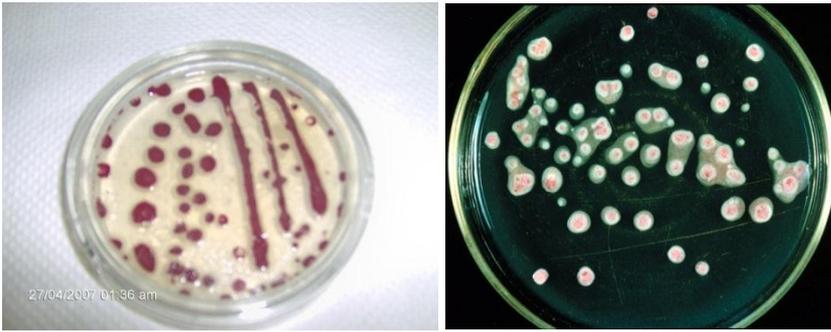
Fotos. Micelio de *P. myriotylum* en medio Parc 2), hifas y esporangio de *Pythium myriotylum* 3), Oogonios y Anteridios de *P. myriotylum* 4 y 5)

Anexo 16. Caracterización macro y micro morfológica del género *Fusarium solani*



Fotos. Macroconidias de *F. solani* 1), Macroconidias y clamidiosporas de *F. solani* 2)

Anexo 17. Caracterización macro y micro morfológica del género *Ralstonia solanacearum*



Colonias características de *Ralstonia solanacearum* en medio tetrazolium

Resultados de las pruebas característica, morfológicas, fisiológicas y culturales para la identificación de *Ralstonia solanacearum*.

Pruebas características de identificación		
Características culturales	Superficie	Lisa
	Elevación	Convexa
	Color	Blanco cremosa
	Borde	Irregular
Características morfológicas	Forma	Bacilar
	Presencia del hilo KOH 3 %	+
	Presencia de flagelo	polar
Características fisiológicas	Desarrollo de colonias en TZC (Kelman)	+
	Color de las colonias	Cremosa centro rosado
	Oxidasa	+
	Catalasa	+

Resultados de las pruebas bioquímicas de *Ralstonia solanacearum*

AZUCARES	Resultados
COLOR DE LA COLONIA	Colonia Blanca cremosa
TINCIÓN DE GRAM	G ⁻
PRUEBA DE HIDRÓXIDO DE POTASIO (KOH AL 3%)	Positiva (bacteria es G ⁻)
CATALASA	+
OXIDASA	+
DESARROLLO DE COLONIAS TÍPICAS EN MEDIO TETRAZOLIUM (TZC)	+
DESROLLO DE COLONIAS AMARILLAS EN MEDIO YDC	-
FLUORESENCIA EN MEDIO B DE KING	-
CELOBIASA	-
DULCITOL	-
MANITOL	-
ADONITOL	+
LACTOSA	-
SORBITOL	-
MALTOSA	-

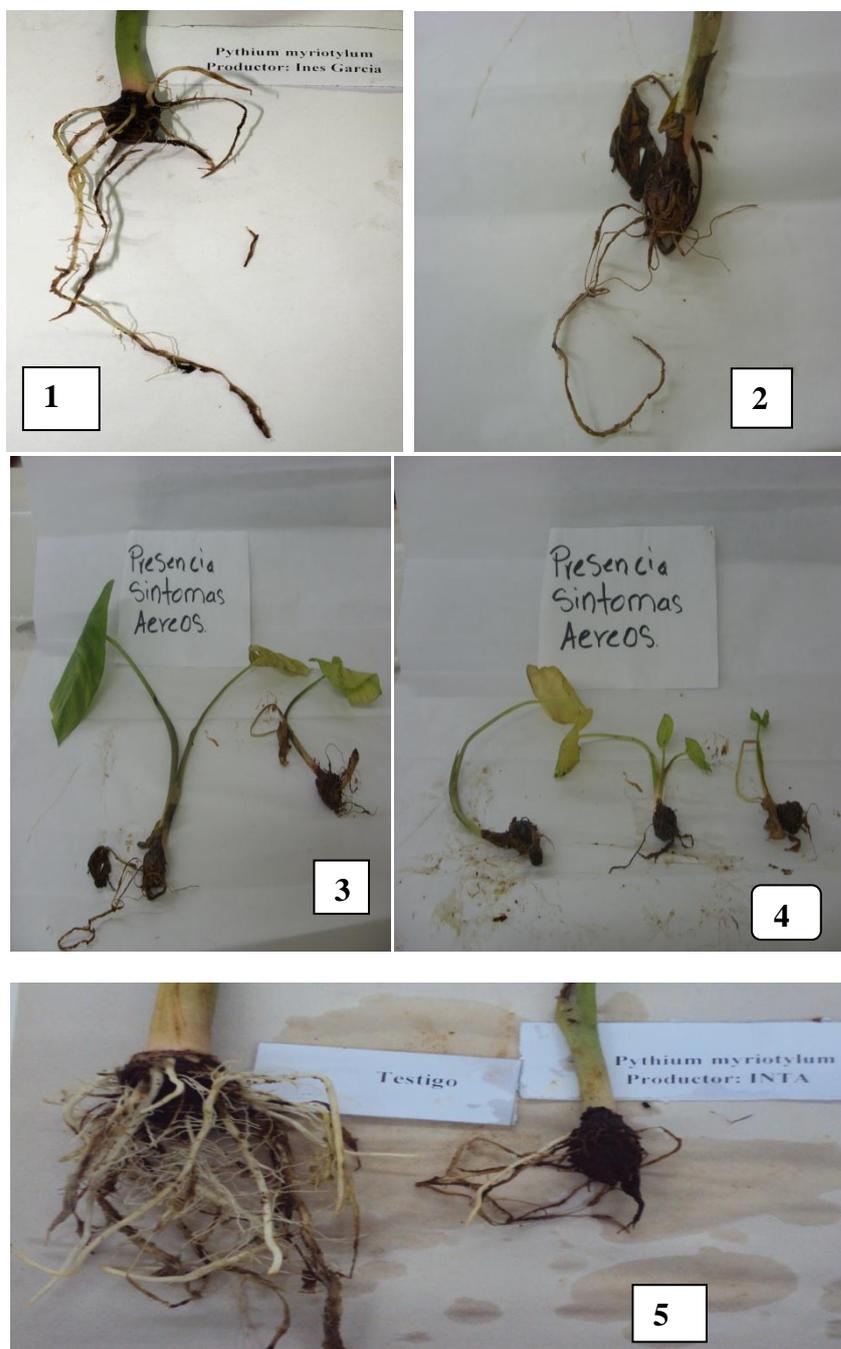
Anexos 18. Frecuencia de patógenos de suelo, planta sana en suelo infectado

Medio	Agente causal	Aislado	No aislado	Porcentaje	X ²	Valor P
PDA	<i>F. solani</i>	37	48	43.53	42.3492	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	4	81	4.71		
	<i>R. solanacearum</i>	12	73	14.12		
PARC	<i>F. solani</i>	0	85	0	48.1545	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	22	63	25.88		
	<i>R. solanacearum</i>	0	85	0		
AN	<i>F. solani</i>	5	80	5.88	108.5077	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	0	85	0		
	<i>R. solanacearum</i>	51	34	6		

Anexos 19. Frecuencia de patógenos de raíces, planta sana en suelo infectado

Medio	Agente causal	Aislado	No aislado	Porcentaje	X ²	Valor P
PDA	<i>F. solani</i>	85	0	100	42.3582	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	50	35	58.82		
	<i>R. solanacearum</i>	62	23	72.94		
PARC	<i>F. solani</i>	25	60	29.41	151.7647	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	85	0	100		
	<i>R. solanacearum</i>	9	76	10.59		
AN	<i>F. solani</i>	6	79	7.06	185.5576	0.0001
	<i>P. myriotylum</i>	5	80	5.88		
	<i>R. solanacearum</i>	79	6	92.94		

Anexo 20. Manifestaciones patológicas aéreas y en raíces de *Pythium myriotylum*



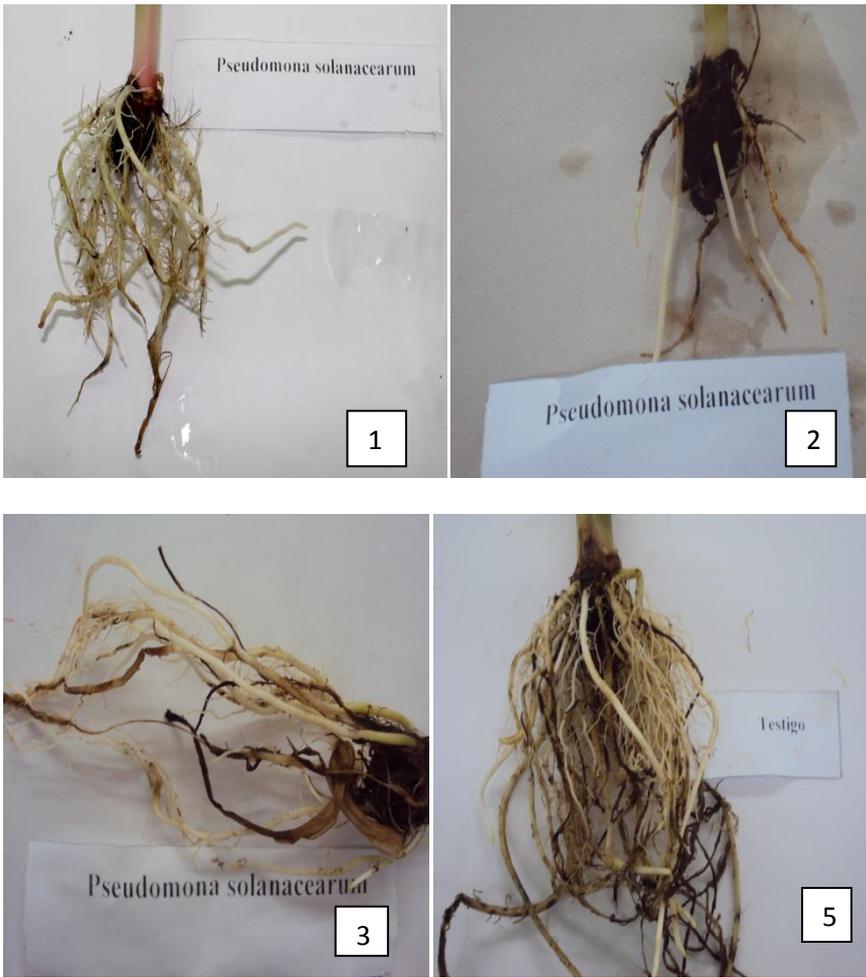
Síntomas de *P.myriotylum* en raíces 1y 2), Síntomas aéreos de *P. myriotylum* 3 y 4) *P. myriotylum* vs testigo 5)

Anexo 21. Manifestaciones patológicas del genero *Fusarium solani*



Síntomas de *F. solani* en raíces 1 y 2), *testigo* 3)

Anexo 22. Manifestaciones patológicas del genero *Ralstonia solanacearum*



Síntomas de *R. solanacearum* en raíces 1,2 y 3), *testigo* 4)

Anexo 23. Manifestaciones patológica de *Pythium myriotylum* + *Fusarium solani* + *Ralstonia solanacearum*



Síntomas de *P. myriotylum* + *F. solani* + *R. solanacearum* en raíces 1,2), *testigo* 3,4)

Anexo 24. Porcentaje de severidad de los patógenos en raíces

Tratamiento	Porcentaje de severidad										
	ddi										
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30
<i>Pythium myriotylum</i>		0	25	25	30	30	32	34	49	75	79
<i>Ralstonia solanacearum</i>		0	0	0	0	25	25	27	27	30	30
<i>Fusarium solani</i>		0	0	0	0	25	25	27	28	30	35
<i>P. myriotylum</i> + <i>F. solani</i> + <i>R. solanacearum</i>		0	25	25	35	42	45	55	60	70	83

Anexo 25. Cálculo de tasa o incremento de la enfermedad en raíces

Tratamiento *Pythium myriotylum*

$$r = (1/(t_2-t_1)) [(\log_e (1/(1-y_2))) - (\log_e (1/(1-y_1)))]$$

$$t_1 = 6$$

$$t_2 = 30$$

$$t_1 = 6, y_1 = 25\% ; t_2 = 30, y_2 = 79\%$$

Donde: y_1 y y_2 es la severidad encontrada en los tiempos t_1 y t_2 respectivamente.

$$r = [1/(30-6)] [(\log_e(1/(1-0.79))) - \log_e (1/(1-0.25))]$$

$$r = [1/24] [\log_e (4.761) - \log_e (1.333)]$$

$$r = [1/24] [(1.560) - (0.287)]$$

$$r = (0.0416) (1.273)$$

$$r = 0.0530$$

En el tratamiento Pm, la enfermedad presentó una tasa de 0.0530, lo que significa que la enfermedad aumentó 5.30% en las raíces por cada día transcurrido después de la inoculación del patógeno.

Tratamiento *Fusarium solani*

$$r = (1/(t_2-t_1)) [(\log_e (1/(1-y_2))) - (\log_e (1/(1-y_1)))]$$

$$t_1 = 15$$

$$t_2 = 30$$

$$t_1 = 15, y_1 = 25\% ; t_2 = 30, y_2 = 35\%$$

Donde: y_1 y y_2 es la severidad encontrada en los tiempos t_1 y t_2 respectivamente.

$$r = [1/(30-15)] [(\log_e(1/(1-0.35))) - \log_e (1/(1-0.25))]$$

$$r = [1/15] [\log_e (1.538) - \log_e (1.333)]$$

$$r = [1/15] [(0.430) - (0.2857)]$$

$$r = (0.0666) (0.143)$$

$$r = 0.0095$$

En el tratamiento Fs, la enfermedad presentó una tasa de 0.0095, lo que significa que la enfermedad aumentó 0.95% en las raíces por cada día transcurrido después de la inoculación del patógeno.

Tratamiento *Ralstonia solani*

$$r = (1/(t_2 - t_1)) [(\log_e (1/(1 - y_2))) - (\log_e (1/(1 - y_1)))]$$

$$t_1 = 15$$

$$t_2 = 30$$

$$t_1 = 15, y_1 = 25\% ; t_2 = 30, y_2 = 30\%$$

Donde: y_1 y y_2 es la severidad encontrada en los tiempos t_1 y t_2 respectivamente.

$$r = [1/(30 - 15)] [(\log_e(1/(1 - 0.30))) - \log_e (1/(1 - 0.25))]$$

$$r = [1/15] [\log_e (1.428) - \log_e (1.333)]$$

$$r = [1/15] [(0.356) - (0.287)]$$

$$r = (0.066) (0.069)$$

$$r = 0.0045$$

En el tratamiento Rs, la enfermedad presentó una tasa de 0.0045, lo que significa que la enfermedad aumentó 0.45% en las raíces por cada día transcurrido después de la inoculación del patógeno.

Tratamiento *Pythium myriotylum* + *Fusarium solani* + *Ralstonia solanacearum*

$$r = (1/(t_2 - t_1)) [(\log_e (1/(1 - y_2))) - (\log_e (1/(1 - y_1)))]$$

$$t_1 = 6$$

$$t_2 = 30$$

$$t_1 = 6, y_1 = 25\% ; t_2 = 30, y_2 = 83\%$$

Donde: y_1 y y_2 es la severidad encontrada en los tiempos t_1 y t_2 respectivamente.

$$r = [1/(30 - 6)] [(\log_e(1/(1 - 0.83))) - \log_e (1/(1 - 0.25))]$$

$$r = [1/24] [\log_e (5.882) - \log_e (1.333)]$$

$$r = [1/24] [(1.771) - (0.287)]$$

$$r = (0.0416) (1.484)$$

$$r = 0.0617$$

En el tratamiento Pm + Fs + Rs, la enfermedad presentó una tasa de 0.0617, lo que significa que la enfermedad aumentó 6.17% en las raíces por cada día transcurrido después de la inoculación del patógeno.