

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA.



Título:

“Caracterización Morfológica de *Fusarium moniliforme* causante de “La Marchitez vascular” y su sintomatología en diferentes estados de desarrollo del cafeto en Santa Ana, El Salvador”.

Presentado por:

Br. Karla Ileana Romero Solís.

Para optar al grado de:

Licenciada en Biología.

Ciudad universitaria, Agosto de 2012.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA.



“Caracterización Morfológica de *Fusarium moniliforme* causante de la “Marchitez vascular” y su sintomatología en diferentes estados de desarrollo del cafeto en Santa Ana, El Salvador”.

Presentado por:

Br. Karla Ileana Romero Solís.

Para optar al grado de:

Licenciada en Biología.

Asesor interno y externo

Ing. Andrés Rivas.
Asesor Interno

Dr. Adán Hernández
Asesor Externo

Ciudad universitaria, Agosto de 2012

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

RECTOR
ING. MARIO ROBERTO NIETO LOVO

VICERRECTORA ACADÉMICA
MAESTRA ANA MARÍA GLOWER DE ALVARADO

VICERRECTOR ADMINISTRATIVO INTERINO
LIC. SALVADOR CASTILLO

SECRETARIA GENERAL
DRA. ANA LETICIA DE AMAYA

FISCAL GENERAL
LIC. FRANCISCO CRUZ LETONA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA.

DECANO
MSc. MARTIN ENRIQUE GUERRA CÁCERES

VICEDECANO
LIC. ARÍSTIDES PAZ SÁNCHEZ

SECRETARIO
MSc. NELSON GOMEZ CEDILLOS.

DIRECTOR ESCUELA DE BIOLOGIA

LIC. RODOLFO MENJIVAR

ASESORES

ING. AGR. DR. ADAN HERNANDEZ

ING. AGR. M.Sc. ANDRES WILFREDO RIVAS FLORES.

Agradecimientos.

A DIOS TODO PODEROSO

Por darme fuerzas cuando no las tenía, por poner en mi camino personas maravillosas y por enseñarme que cada día tiene su propia magia.

A LA UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Por la formación académica durante todos estos años de estudio.

A MIS ASESORES

Ing. Agr. M.Sc. Andrés Wilfredo Rivas Flores por sus enseñanzas, paciencia, amistad y auxiliarme cuando lo necesite, y al Dr. Adán Hernández por la oportunidad de trabajar en mi tesis bajo su apoyo incondicional, sabiduría y amistad.

A la fundación PROCAFE, al personal que ahí labora, por permitirme realizar mi trabajo en sus instalaciones, por brindarme todo el apoyo necesario durante todo este tiempo y por darme la oportunidad de seguir aprendiendo con ustedes.

Dedicatoria.

A DIOS

Por formar parte esencial de mi vida y guiarla con tu luz.

A MI MAMA

Lilliam del Carmen Solís, por enseñarme que el que persevera alcanza y siempre creer en mí.

A MIS HERMANAS

Krissia y Jeimy Romero por compartir momentos dulces y amargos, por ser parte de mí y nunca dejarme sola.

A MI NOVIO

Julio Grande, por todo lo que en la vida aun nos espera, por ser parte especial de este éxito y por amarme más de lo que espere.

A LA FAMILIA GRANDE MELENDEZ

Julio Grande (Padre), Nuria, Tia Cole, Esmeralda, Balmore, Dieguito, Francisco y Karen, por siempre apoyarme y dejarme entrar en su familia.

A MIS AMIGOS

Por brindarme su amistad y palabras de aliento cuando más lo necesite, Raúl Rivera, Paola, Wendy, Iris, Evangelina, Clelia, Beatriz, Cristina, y a todos aquellos que con el recorrer del tiempo estuvieron junto a mí.

Karla Ileana Romero Solís.

Resumen

Se realizó la caracterización morfológica de *F. moniliforme* causante de la marchitez vascular de cafetos y se describió la sintomatología que causa en plantas de café de diferentes etapas de desarrollo. El trabajo se dividió en 3 fases: en la primera se hicieron visitas de campo para recolectar material. Las fincas visitadas fueron: Flor amarilla, Osorio y campanario A y B ubicadas en el cantón flor amarilla del municipio de Santa Ana. Los síntomas observados fueron los siguientes: plantas con pocas hojas de color amarillo, ramas con partes secas y otras verdes. Al efectuar raspados en la corteza se observaron franjas de color morado que recorrían parte del tallo. En cortes transversales se observó parte del sistema vascular afectado de color morado oscuro y raíces podridas. La segunda fase se llevó a cabo en el laboratorio de protección vegetal en las oficinas centrales de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café (PROCAFE). Se aisló y purificó cepas de *F. moniliforme* en medio PDA. En el medio de cultivo el fondo de la colonia fue de color morado vinaceo, con aspecto algodonoso, micelio tipo rastrero. La colonia tenía forma irregular con contorno ovalado y de color morado lila oscuro muy parecido al que se observó en campo. Tercera fase, se realizó en el invernadero de las oficinas centrales de PROCAFE. Se instalaron 5 ensayos separados que consistieron en inoculación de *F. moniliforme* en macetas donde se sembraron semillas, plántulas en estado de concha, plántulas de 3 meses, plantas de 6 meses y 12 meses respectivamente. La duración de los experimentos fue de 4 meses pero se tomaron datos cada 2 días de acuerdo al estado de desarrollo. Los resultados obtenidos demostraron: las semillas no germinaron y se tornaron de color morado, al hacer reaislamientos presento colonias típicas de *F. moniliforme*. Las plántulas concha y naranjito mostraron síntomas a los 21 y 27 días respectivamente, los cuales fueron: manchas de color café en hojas cotiledonales y verdaderas, ennegrecimiento y estrangulamiento de la base del tallo, y anillo color café oscuro. Las plantas de 6 y 12 meses, mostraron síntomas a los 60 días. Los cuales se presentaron como apareamiento de manchas color café y seguido de amarillamiento y marchitez de las hojas.

Palabras clave: *Fusarium moniliforme*, Procafe, sintomatología, cafetos, plántulas de café

Índice General.

PAG.

Autoridades.....	ii
Agradecimientos	iv
Dedicatorias.....	v
Resumen	vi
Índice General.....	vii
Índice de Cuadros.....	x
Índice de Figuras	xi
Índice de Anexos	xiii
I. Introducción	1
II. Fundamento Teórico.....	2
2.1 Descripción del género <i>Fusarium spp</i>	2
2.2 Importancia del género <i>Fusarium spp</i>	4
2.3 Base de identificación de <i>Fusarium moniliforme</i>	5
2.4 Sintomatología de plantas de cafeto en vivero	6
2.5 Epidemiología	7
III. Objetivos	8
IV. Metodología.....	9
4.1 Ubicación del sitio de estudio.....	9
4.2 Fase de Campo	11
4.3 Fase de laboratorio	12

4.3.1 Siembra de material vegetal infectado en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar)	12
4.3.2 Aislamiento del hongo Fusarium moniliforme	13
4.3.3 Purificación de cepas de Fusarium moniliforme.....	13
4.3.4 Identificación morfológica y crecimiento de F. moniliforme.....	14
4.4 Sintomatología de Fusarium moniliforme en plantas de cafeto Var. Pacas de diferentes estados de desarrollo.....	15
4.4.1 Fase de Invernadero.....	15
Ensayo 1. Efecto de F. moniliforme sobre semillas de cafeto.....	16
Ensayo 2. Efecto de F. moniliforme plántulas de cafeto de 2Meses de edad (estado de concha).....	16
Ensayo 3. Inoculación de F. moniliforme en plántulas deCafeto de 3 meses de edad (naranjito)	17
Ensayo 4. Inoculación de F. moniliforme en plantas de cafetode 6 meses de edad	18
Ensayo 5. Inoculación de F. moniliforme en plantas de cafetode 12 meses de edad	18
V. Resultados.....	20
5.1 Aislamiento del hongo F. moniliforme	20
5.2 Identificación morfológica y crecimiento de F. moniliforme	23
5.3 Sintomatología de Fusarium moniliforme en plantas decafetos de diferentes estados de desarrollo.....	25

5.3.1 Fase de Invernadero	25
Ensayo 1. Efecto de F. moniliforme sobresemillas de cafeto.....	25
Ensayo 2. Efecto de F. moniliforme en plántulas de cafeto de 2 Meses de edad (estado de concha).....	25
Ensayo 3. Inoculación de F. moniliforme en plántulas de Cafeto de 3 meses de edad (naranjito)	27
Ensayo 4. Inoculación de F. moniliforme en plantas de cafetode 6 meses de edad	28
Ensayo 5. Inoculación de F. moniliforme en plantas de cafetode 12 meses de edad	28
VI. Discusión	32
VII. Conclusión.....	35
VIII. Recomendaciones	36
IX. Referencias Bibliográficas	37
X. Anexos	39

Índice de Cuadros.

Cuadro N° 1. Dimensiones promedio de conidias de F. moniliforme	6
Cuadro N° 2. Ubicación de las Fincas a Muestreadas.....	9
Cuadro N° 3 Ubicación con las coordenadas del sitio de fase del laboratorio y de invernadero	10
Cuadro N° 4. Parámetros evaluados sobre la sintomatología en las plantas de café infectados por Fusarium moniliforme.....	19
Cuadro N° 5. Etapa de desarrollo de la planta y los parámetros evaluados sobre la sintomatología de la plántula o planta de café	19
Cuadro N° 6. Características macroscópicas más distintivas de Fusarium moniliforme.....	22
Cuadro N° 7. Porcentaje de infección de los ensayos 2 y 3, en los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre	25
Cuadro N° 8. Porcentaje de infección de los ensayos 4 y 5, en los meses de Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre	26
Cuadro N° 9. Cuadro resumen de los parámetros evaluados sobre la sintomatología causada por Fusarium moniliforme a plantas de café en diferentes estados de desarrollo.....	31

Índice de Figuras.

Figura 1. Muestra de microconidias	2
Figura 2. Macroconidia de 9 septos	3
Figura 3. Células estromáticas dilatadas	3
Figura 4. Mapa de la ubicación Geográfica de las fincas a muestrear, Departamento de Santa Ana, El Salvador(Arc.Map ver 9.3, 2009).....	10
Figura 5. Mapa de la ubicación Geográfica de las oficinas centralesde PROCAFE, departamento de La Libertad,El Salvador (Arc.Map Ver 9.3, 2009)	11
Figura 6. Preparaciones de las muestras a sembrar en medio de cultivo PDA	12
Figura 7. Procedimiento de la siembra de material vegetal infectadoen medio de cultivo PDA.....	13
Figura 8. A: Planta con pocas hojas y ramas secas. B: Franjas delos daños ocasionados en las ramas. C: Raíz podrida y sin raicillas. D: Corte transversal con daño del hongo	21
Figura 9. Ejemplos de la colonia desarrollada de F. moniliforme.....	23
Figura 10. Muestra del crecimiento irregular y de aspecto algodonoso de 5 días de crecimiento micelial	23
Figura 11.Diferentes vistas de microconidias, en el centro mayor cantidad de microconidias sobre macroconidias	24
Figura 12.Diferentes vistas de macroconidias y la vista de sus septos	24

Figura 13. Muestra de clamidospora coloreada azul oscuro y parte del micelio hialino.....	24
Figura 14. Plantas de 2 meses de edad mostrando síntomas del ataque de F. moniliforme	26
Figura 15. Tasa de infección a los 3 meses de observación del ensayo 2, Plantas en estado de Concha	27
Figura 16. Plantas en estado de Naranjito con síntomas causados por F. moniliforme.....	28
Figura 17. Tasa de infección a los 3 meses de observación del ensayo 3, Plantas en estado de Naranjito	28
Figura 18. Plantas de 6 meses de edad al principio del ensayo y luego mostrando síntomas, aparentemente sin daños en las raíces.....	29
Figura 19. Plantas de 12 meses de edad, presentando un tallo poco desarrollado y pocas hojas verdaderas, aparentemente sin daño en las raíces	29
Figura 20. Tasa de infección a los 4 meses de observación del ensayo 4, Plantas de 6 meses de edad.....	30
Figura 21. Tasa de infección a los 4 meses de observación del ensayo 5, Plantas de 12 meses de edad.....	30

Índice de Anexos.

Anexo N° 1. Sumatoria de crecimiento cada 24 horas y los días de observación de cajas de Petri inoculadas con Fusarium moniliforme	39
Anexo N° 2. Resultados mensuales de los 5 tratamientos de los ensayos 2 y 3.....	40
Anexo N° 3. Resultados mensuales de los 5 tratamientos de los ensayos 4 y 5.....	41

I. Introducción.

El café tanto en estado de vivero como en plantaciones ya establecidas, es susceptible a ataques de plagas y enfermedades que afectan su producción. Unos de los patógenos que causan marchitamiento de cafetos son especies del hongo de *Fusarium*, los cuales afectan los tejidos vasculares de las raíces, impidiendo que las plantas absorban agua y nutrientes.

Las enfermedades causadas por *Fusarium* afectan y ocasionan pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas, plantas del campo como el algodón y el tabaco, así como plantaciones tales como el plátano, café y caña (Agrios, 1991).

Gil (1991), citado por Bolaños *et al.*, (2000) indica que la marchitez vascular causada por *Fusarium spp* es más agresiva cuanto más joven es la planta de café; causando un 50% de pérdidas en viveros tanto comerciales como sembrados en las fincas cafetaleras; por lo tanto, al trasplantar estas plantas contribuyen a la diseminación de este patógeno a suelos donde han sido sembradas.

La tarea de caracterización de un organismo, implica realizar estudios más detallados y específicos sobre estos, esta investigación se realizó bajo criterios taxonómicos de las especies de *Fusarium*, empleando guías de identificación y clasificación del mismo (Bolaños, 2000).

La presente investigación tuvo como objetivos realizar la caracterización morfológica de *F. moniliforme* causante de la “Marchitez vascular” y sintomatología que produce en distintas etapas de desarrollo del cafeto, la cual servirá como una herramienta para la implementación de un programa de manejo integrado de la enfermedad en futuros planes de prevención y/o control, y así poder disminuir pérdidas económicas a los caficultores.

II. Fundamento teórico.

2.1 Descripción del género *Fusarium* spp.

Las enfermedades causadas por *Fusarium* afectan y ocasionan pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas, plantas del campo como el algodón y el tabaco, así como plantaciones tales como el plátano, café y caña.

Los marchitamientos causados por *Fusarium* se ven favorecidos ampliamente por las condiciones ambientales y del suelo de los invernaderos. (Agrios, 1991)

Los síntomas de la enfermedad que provoca *Fusarium* se manifiestan en epinastia, obstrucción y empardecimiento de los vasos xilémicos, necrosis, marchitamiento y finalmente, en la muerte de la planta.

La mayor parte de las especies del género *Fusarium* son hongos que habitan en el suelo y muchos de ellos pueden ser saprofitos facultativos agresivos. (Zillinsky, 1984)

El género presenta tres tipos de esporas asexuales: a) **Microconias:** Agrios (1991) menciona que son ovales o en forma de riñón, generalmente no septadas, son las que el hongo produce con mayor frecuencia y abundancia en todas las condiciones, siendo éstas las únicas esporas que forma el hongo en el interior de los vasos xilemáticos de las plantas hospederas que ha infectado. Las microconidias (Figura 1) también son hialinas, de forma fusoide a clavada y miden 1.5-2.5 x 5-12 micras (Castaño y Mendoza, 1994).



Figura 1. Muestra de microconidias.

b) **Macroconidias.** Son las esporas típicas de *Fusarium*, se agudizan gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos, semejando en muchos casos una media luna, con un extremo ligeramente curvado disminuido (Figura 2), aparecen con gran frecuencia sobre la superficie de plantas que han sido destruidas por el patógeno y por lo común se forman en grupos de estructuras en forma de esporodoquio (Agrios, 1991); Andrade (1981) citado por Bolaños *et al.*, (2000) menciona que las dimensiones pueden variar entre 25 a 66 μm \times 2.3 a 4.3 μm las que tienen tres septos y 32 a 68 μm \times 2.8 a 4.5 μm para las de cinco septos.



Figura 2. Macroconidiade 9septos

c) **Células estromáticas dilatadas:** Bolaños *et al.*, (2000) menciona que las clamidosporas están ausentes, sin embargo presenta células estromáticas dilatadas que muchas veces son confundidas como clamidosporas, y son de forma irregularmente globosa con aspecto azul oscuro dentro de ellas.

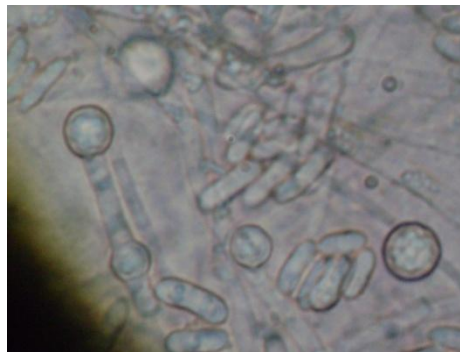


Figura 3. Células estromáticas dilatadas.

Rivera (1998) citado por Bolaños *et al.*, (2000) menciona que la apariencia del medio artificial cambia de tonalidad en relación a la especie de ***Fusarium*** inoculada, tornándose dentro de una gama de colores que van desde blanco hasta café oscuro, entre seis y nueve días después de inoculado el hongo, este logra mayor cantidad de microconidias; y se observa la presencia de estructuras conocidas como macroconidióforos donde normalmente se desarrollan las macroconidias con mayor cantidad de septos que las microconidias y de mayor tamaño, las agrupaciones de macroconidioforos son denominados esporodoquios. A partir de los 15 días se observa la presencia de clamidosporas, en especial cuando el medio de cultivo es escaso debido a la agresividad del hongo de invadir rápidamente la placa Petri empleada para el aislamiento.

2.2 Importancia del género *Fusarium* spp.

La importancia económica de las enfermedades de las plantas debe ser medida por el daño que en si ocasionan; así como por los costos de las medidas preventivas y curativas de control y por las limitaciones que las enfermedades imponen en relación al cultivo de ciertas plantas o de ciertas variedades, en determinados lugares. (Castaño & Mendoza, 1994)

Con respecto a la mayoría de las hortalizas, la contaminación por ***Fusarium*** se produce en el campo antes o durante la cosecha, aun cuando la infección pueda desarrollarse durante el almacenamiento de ellas. Las pérdidas son particularmente considerables en el caso de cultivos tales como el de la papa, que son almacenados durante largos periodos. (Agrios, 1991)

Según Booth (1964) citado por Nelson *et al.*, (1981) indica que en el cafeto la traqueomicosis (Enfermedad de las plantas producida por hongos que invaden su sistema vascular o región traqueal, marchitándolas o desecándolas) causa serias pérdidas en partes de África en ***Coffea liberica*** y ***C. canephora***.

Según PROCAFE (1997) la enfermedad es muy severa a nivel de vivero ya que el daño es irreversible y toda planta infectada generalmente muere en un periodo promedio de 10 días, causando pérdidas hasta del 50% en el vivero.

2.3 Base de identificación de *Fusarium moniliforme*

En los resultados obtenidos por Bolaños *et al.*, (2000) describen a ***Fusarium moniliforme*** de la siguiente forma:

La colonia desarrollada en PDA presenta un color amarillo y rosado.

El crecimiento del hongo sobre la superficie de PDA conteniendo en una caja de 90 milímetros de diámetro fue radial cuyo contorno se extendió de forma regular hasta llenar la caja en un promedio de once días produciendo micelio algodonoso afelpado.

Las **microconidias** presenta una forma fusiforme o clavada las cuales se muestran en cadenas sobre fialides simples laterales, formadas sobre hifas aéreas, apareciendo a los tres días de repicado, dando un aspecto afelpado a la colonia,

Las **macroconidias** son en ambos extremos fusoides, de pared delgada con una célula apical con punta y pedicelo basal encontrándose hasta siete septos, se desarrollan sobre conidióforos formados en ramas laterales sobre las hifas,

Células estromáticas dilatadas son de forma irregularmente globosas con aspecto azul oscuro dentro de ellas, muchas veces son confundidas como clamidosporas.

Siendo las dimensiones las siguientes:

Cuadro N° 1. Dimensiones promedio de las conidias de *Fusarium moniliforme*.

Conidias		
# de septos	Largo (µm)	Ancho (µm)
0	9.30	3.21
2	33.60	4.50
3	45.20	5.20
4	49.80	4.80
5	52.00	4.80
6	55.20	5.56
7	60.60	5.10
Fialide: Largo: 41.1 µm		

Fuente: Bolaños *et al.*, (2000)

2.4 Sintomatología de plantas de cafeto en vivero.

PROCAFE (1997) describe que las plantas de cafeto infectadas por *Fusarium*, inicialmente no muestran síntomas visibles de la enfermedad, pero cuando se hace un corte a lo largo del tallo, se observan bandas finas de color café claro, que indica que los vasos conductores están obstruidos impidiendo la circulación de agua y nutrientes, posteriormente causa amarillamiento del follaje y finalmente su marchitez. En plántulas de cafeto a nivel de vivero, la primera manifestación es la flacidez general del follaje (traqueomicosis), iniciando la marchitez de las hojas en la parte inferior de la planta, poco tiempo después, las hojas superiores se marchitan e inclinan, dando un aspecto a la planta infectada de cono invertido.

Las lesiones también aparecen en forma de constricción negruzca en el tallo, al nivel del suelo, en la parte superior de éste y cerca de los cotiledones. A veces, la enfermedad avanza por la superficie de los cotiledones cerrados o abiertos, mostrando parches sólidos de plantillas negras destruidas en el semillero (ANACAFE, 1998).

2.5 Epidemiología.

Agrios (1991) menciona que *Fusarium* produce clamidosporas de pared gruesa y constituidas por una o dos células, las cuales sobreviven a la sequía y a las bajas temperaturas. El hongo puede sobrevivir sobre tejidos vegetales muertos e invernar en forma de micelio o esporas en las semillas, en tejidos muertos o infectados. Las esporas son fácilmente diseminadas por el viento, equipo agrícola, el agua, por contacto, etc., de ahí que el hongo se encuentre en forma de micelio o esporas en muchos suelos.

La iniciación de la enfermedad de la marchitez vascular causada por *Fusarium* se favorece con una elevada humedad del suelo, que es necesaria para la germinación de las esporas y subsiguiente crecimiento del micelio. (Roberts & Boothroyd, 1972)

Manners (1986), sostiene que la incidencia de varios hongos de la pudrición de la raíz aumenta en presencia de nematodos fitoparásitos. Por ejemplo, *Fusarium spp*, entra con frecuencia a través de las heridas causadas por el nematodo *Meloidogyne spp*, es probable que el hongo entre a través de las heridas causadas por el nematodo y llega al sistema vascular, sin embargo no hay evidencia directa de este proceso.

III. Objetivos.

Objetivo general.

- ✓ Caracterización morfológica de ***F. moniliforme*** causante de la “Marchitez vascular” y su sintomatología en diferentes estados de desarrollo del cafeto en Santa Ana, El Salvador.

Objetivos específicos.

- ✓ Determinar las características morfológicas de ***F. moniliforme***.
- ✓ Identificar la sintomatología de la marchitez vascular causada por ***F. moniliforme*** en cafetos de diferentes estados de desarrollo.

IV. Metodología.

4.1 Ubicación del sitio de estudio.

Esta investigación se llevó a cabo en tres fases complementarias, en las cuales se realizaron las siguientes actividades:

Fase de Campo: La colecta de plantas infectadas se realizó en las Fincas Ubicadas en el Beneficio Las Tres Puertas, Municipio de Santa Ana.

Fase de Laboratorio: Las muestras colectadas se llevaron para identificación al Laboratorio de Protección vegetal en las oficinas centrales de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, (PROCAFE), ubicada en la Avenida Manuel Gallardo y 13 Calle Poniente, Santa Tecla, La Libertad, El Salvador .

Fase de invernadero: Los ensayos se realizaron en el invernadero de las oficinas centrales de la Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café, (PROCAFE), ubicada en la Avenida Manuel Gallardo y 13 Calle Poniente, Santa Tecla, La Libertad, El Salvador.

Cuadro N° 2. Ubicación de las Fincas a Muestreadas para la fase de Campo.

Nombre de la Finca	Latitud Norte	Longitud Oeste
Campanario A y B	13°54.919'	089°33.823'
Flor Amarilla	13°55.049'	089°34.121'
Osorio	13°56.149'	089°35.517'

Cuadro N° 3. Ubicación con las coordenadas del sitio de la fase de Laboratorio y de invernadero.

Lugar	Latitud Norte	Longitud Oeste	Altitud (msnm)
Oficinas centrales de la Fundación Salvadoreña para investigaciones del Café, PROCAFE	13°40'58.55"	89°17'15.15"	954.97

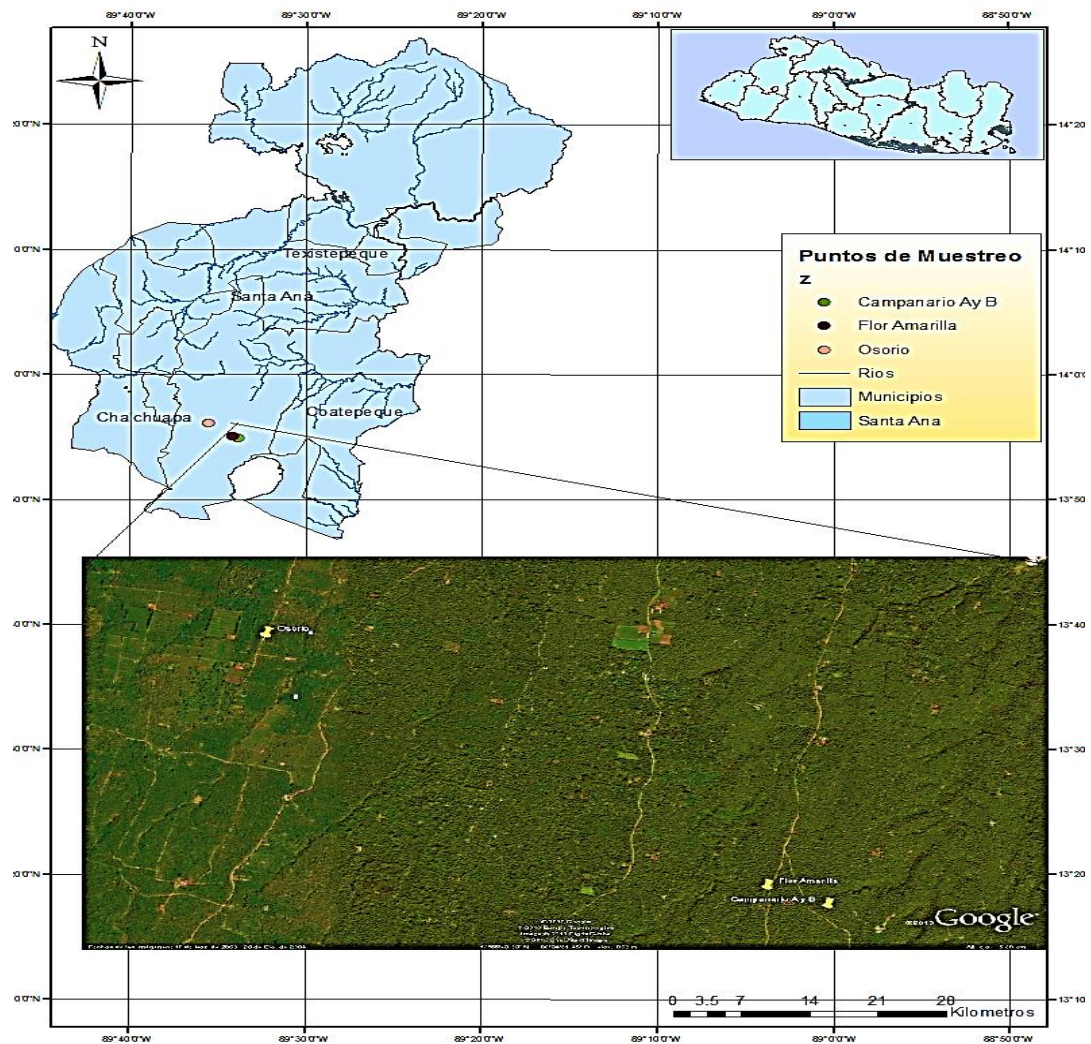


Figura 4. Mapa de la ubicación Geográfica de las fincas a muestrear, departamento de Santa Ana. El Salvador (Arc.Man ver 9.3. 2009)

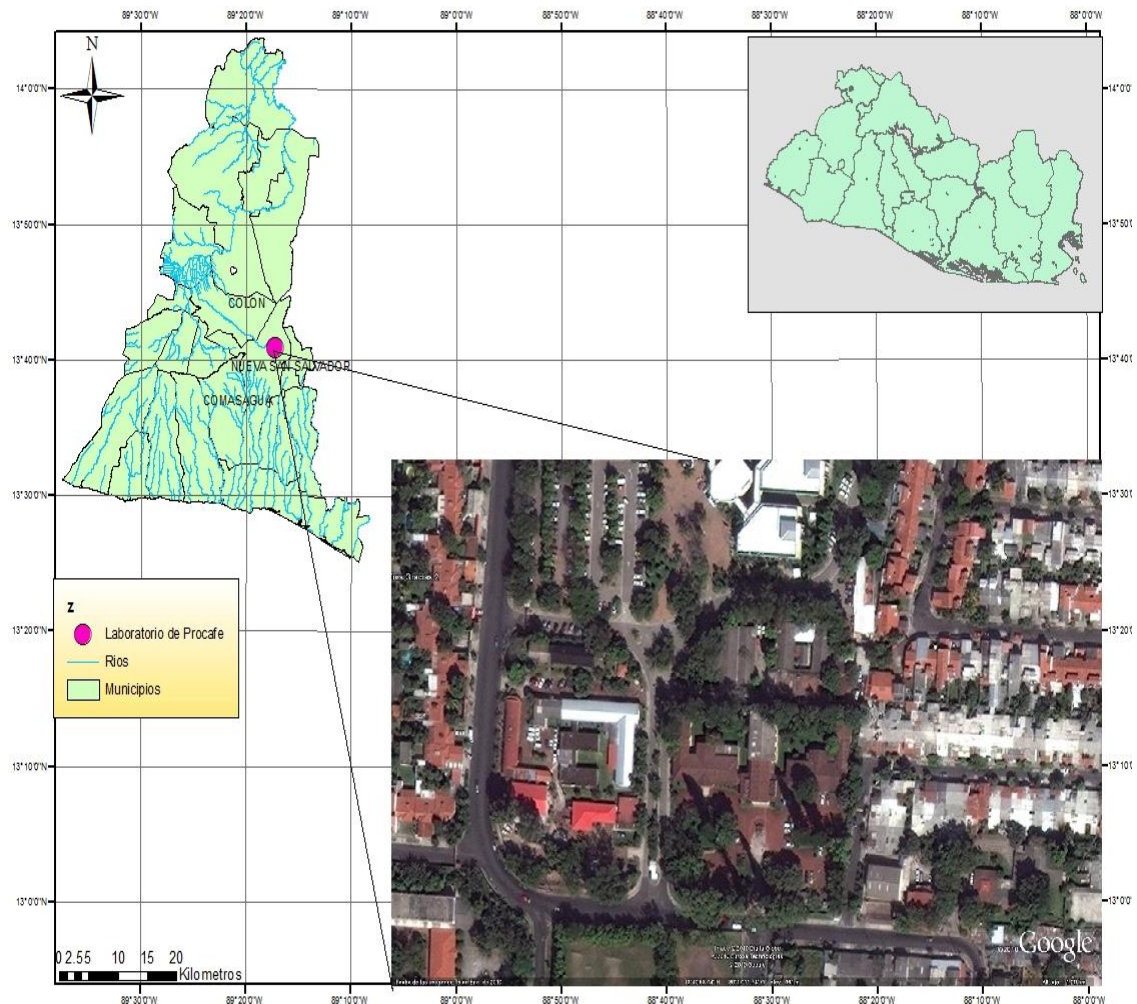


Figura 5. Mapa de la ubicación Geográfica de las oficinas centrales de PROCAFE, departamento de La Libertad, El Salvador (Arc.Map Ver 9.3, 2009)

4.2 Fase de Campo

Se realizaron recorridos en las diferentes fincas, para coleccionar plantas de café en estado, adulto que presentaron síntomas característicos de “fusariosis”, tales como: marchitez y flacidez en la parte aérea de la planta y hojas amarillentas. Se extrajo la planta de la tierra utilizando pala y piocha, con el cuidado de no dañar el sistema radicular. Seguidamente se le realizaron raspados con navaja, a nivel de raíz y tallo para observar posibles lesiones del hongo. Las muestras coleccionadas y tomadas como presuntamente afectadas por marchitez vascular por *Fusarium moniliforme* se pusieron en papel periódico humedecido y se colocaron en bolsas plásticas negras. Las cuales posteriormente se trasladaron

al laboratorio para su aislamiento e identificación. Se colectaron de una a cinco muestras por cada finca.

4.3 Fase de Laboratorio

Las muestras de raíces y tallos se lavaron con agua corriente para quitar el exceso de tierra, a continuación se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 1 a 2 cm. de longitud; posteriormente se lavaron con agua destilada para eliminar el exceso de impurezas.

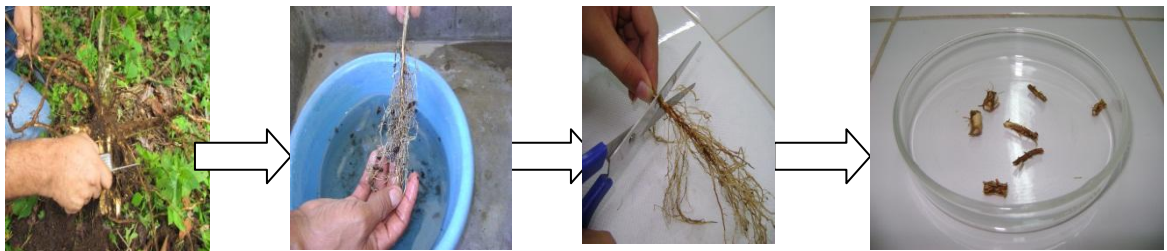


Figura 6. Preparaciones de las muestras a sembrar en medio de cultivo PDA.

4.3.1 Siembra de material vegetal infectado en medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa-Agar).

Una vez eliminado el exceso de impurezas de las muestras cortadas se procedió a la desinfección, la cual se realizó de la siguiente forma:

1. Inmersión de las muestras en Alcohol al 90% por 30 segundos,
2. Inmersión en agua destilada estéril por 1 minuto. (Para eliminar los residuos de alcohol).
3. Secado de las muestras en papel toalla estéril.

Posteriormente, las muestras se sembraron en cajas Petri conteniendo medio de cultivo PDA, (previamente esterilizado en autoclave a 120°C, 15 lbs de presión, durante 15 minutos), las cajas Petri fueron selladas con plástico adhesivo y se colocaron a temperatura ambiente

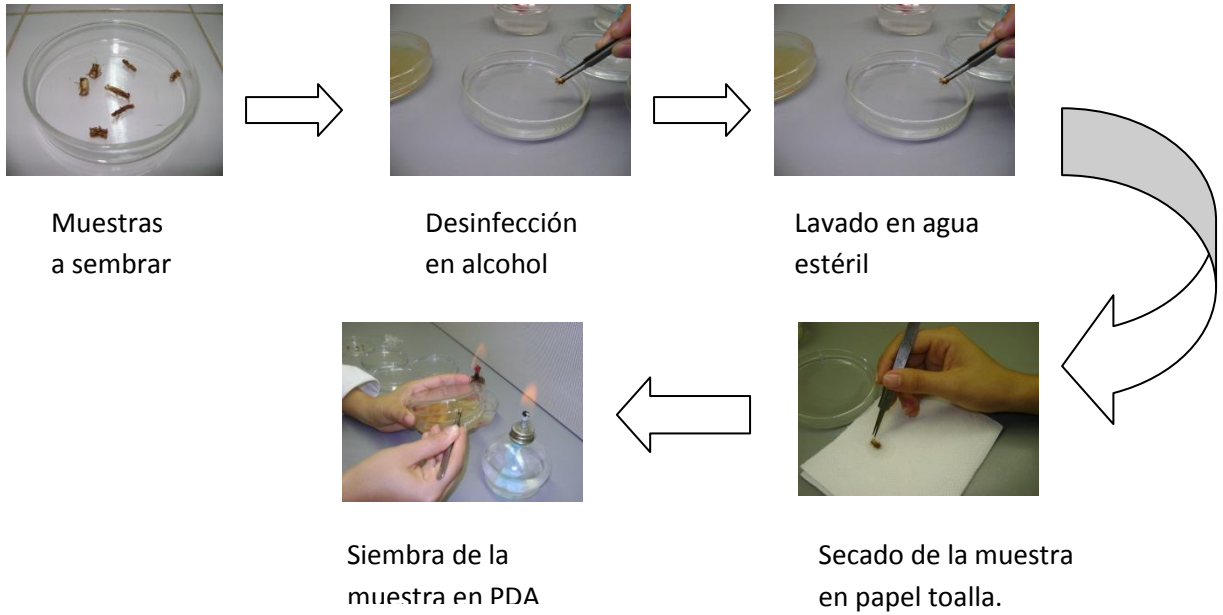


Figura 7. Procedimiento de la siembra de material vegetal infectado en medio de cultivo PDA

4.3.2 Aislamiento del hongo *F. moniliforme*.

Pasados de 6 a 9 días de incubación, las cajas Petri conteniendo el micelio que crecieron en éstas, fueron llevadas a una cámara de flujo laminar donde con pinzas estériles se tomó una parte del micelio del hongo y se colocó en cajas Petri conteniendo medio de cultivo PDA, luego se sellaron con plástico adhesivo y se colocaron a temperatura ambiente.

4.3.3 Purificación de cepas de *F. moniliforme*.

Pasados de 6 a 9 días de incubación, se observó el crecimiento del hongo en las cajas Petri, y se procedió a realizar preparaciones microscópicas para observar estructuras de reproducción tales como: Esporodocio, Conidióforo, y esporas asexuales (Microconidias, Macroconidias y Clamidosporas).

Posteriormente, con una pinza estéril se tomó parte del micelio aislado, y se realizaron réplicas en cajas Petri con medio de cultivo PDA, hasta obtener una cepa pura.

4.3.4 Identificación morfológica y crecimiento de *Fusarium moniliforme*.

Luego de obtener la cepa pura de *F. moniliforme*, se inició la identificación morfológica del hongo:

Se tomaron 20 cajas Petri conteniendo medio de cultivo PDA, se dibujó sobre el envés de cada una de las placas una cruz marcando el centro, con un plumón de tinta indeleble. Se identificó cada placa con un número y se marcaron cada uno de los cuatro radios con una letra (a b, c, d).

- A) Bajo la cámara de flujo laminar y con una pinza estéril, se sembró en cada una de las 20 cajas ya marcadas, el inóculo de micelio purificado de *F. moniliforme* de aproximadamente de 0.5 mm².
- B) seguidamente se dejó a temperatura ambiente, en un lugar con completa asepsia.
- C) Se incubo el hongo hasta observar un avance definitivo de éste y se marcó el punto de avance sobre los cuatro radios marcados en la placa; en este momento se dio inicio al estudio de crecimiento.

Se hicieron observaciones cada 48 horas, donde se describieron en una hoja de registro los siguientes aspectos:

- Color de la colonia: Amarillo y rosado
- Aspecto de la colonia: Algodonosa
- Forma de la colonia: Radial
- Ritmo de crecimiento del micelio: Rápido
- Contorno de la colonia: Redondeado
- Tipo de micelio: Algodonoso afelpado
- Coloración del fondo o revés de la colonia: Color vino
- Medición de macroconidias y microconidias

Cada 48 horas se marcó y midió el incremento del micelio, con una regla milimétrica, se tomaron los datos hasta cumplir de 12 a 15 días de desarrollo micelial. Estas cifras permitieron crear una curva de crecimiento. El ritmo

promedio de crecimiento se calculó dividiendo el crecimiento total entre el número de días de observación. (French & Herbert, 1982)

Cada 48 horas se observaron las cajas Petri al estereoscopio con el fin de observar el momento de formación de esporas, en ese instante se hicieron preparaciones al fresco del micelio del hongo.

Se anotaron en la hoja de registro diario cada aspecto sobresaliente de la colonia desde el momento de esporulación hasta la formación de células estromáticas dilatadas, se tomaron fotografías microscópicas de todas las estructuras representativas del hongo como: conidias (micro y macroconidias), conidióforos, células estromáticas dilatadas y esporodoquios presentes en cada una de las muestra.

Para conocer el tamaño del microorganismo, se trabajó en el Laboratorio 3 del Departamento de Protección Vegetal de la Facultad de Ciencias Agronómicas donde se calibro el microscopio mediante un micrómetro ocular y un micrómetro objetivo.

4.4 Sintomatología de *Fusarium moniliforme* en plantas de cafeto Var. Pacas de diferentes estados de desarrollo.

4.4.1 Fase de invernadero

Con el propósito de describir la sintomatología causada por el hongo *Fusarium moniliforme* en las plantas de cafeto, se realizaron 5 ensayos, cada uno de acuerdo a cada estado de desarrollo del cafeto (semilla, concha, plántulas de 3 meses, plantas de 6 meses y plantas de 12 meses de edad).

Las semillas, plántulas y plantas de cafeto que fueron utilizadas en los ensayos se seleccionaron del vivero ubicado en el Centro Tecnológico Cafetalero, Finca San Antonio, Cantón Las Aradas, Carretera hacia Santa Ana.

Para los ensayos 1 y 2. Previamente se realizarán los siguientes Pasos:

Paso 1. Se esterilizo arena en autoclave a 120°C a 15 libras de presión durante 15 minutos, se dejó enfriar y luego se depositó en 20 macetas limpias de 8 kg de capacidad.

Paso 2. Se tomó una caja Petri conteniendo medio de cultivo PDA, con la cepa de *F. moniliforme* de 8 días de crecimiento. Con un bisturí estéril se hicieron cortes en forma de cuadros al medio de cultivo. Convirtiéndose en el Inóculo.

Paso 3. Cinco de las macetas con arena previamente estéril fueron inoculados con *F. moniliforme*. El inóculo se colocó a 1cm. de profundidad, y se dejaron reposar durante 7 días. Las otras 5 macetas sirvieron de testigo.

Ensayo 1. Efecto de *F. moniliforme* sobre semillas de cafeto.

Siete días después de la inoculación del micelio de *F. moniliforme*, en la arena, se sembraron 10 semillas de cafeto Var. Pacas, en cada una de las 10 macetas.

Diariamente se aplicó agua destilada estéril para mantener la humedad y brindarle condiciones propicias al hongo para lograr la infección a la semilla.

El ensayo tuvo una duración de 2 meses en los cuales se observó el porcentaje de germinación de semillas.

Ensayo 2. Efecto de *F. moniliforme* en plántulas de cafeto de 2 meses de edad (estado de concha).

Siete días después de la inoculación del micelio de *F. moniliforme* en la arena, se sembraron 5 plántulas de cafeto Var. Pacas en estado de concha en cada una de las 10 macetas. Se aplicó diariamente agua destilada estéril, con el propósito de ofrecerle condiciones óptimas al hongo para permitir la infección a la plántula de cafeto en estado de concha.

El ensayo tuvo una duración de 2 meses en los cuales se observó la sintomatología de la plántula.

Ensayo 3. Inoculación de *F. moniliforme* en plántulas de cafeto de 3 meses de edad (naranjito).

Paso 1. Se esterilizó tierra negra (preparada en una mezcla de 70% de suelo de textura franca y suelta y 30% materia orgánica descompuesta) en autoclave a 120°C a 15 libras de presión durante 15 minutos, se dejó enfriar y se depositó en 10 macetas con capacidad de 10.5 kg.

Paso 2. Se seleccionaron 50 plántulas de cafeto Var. Pacas en estado de concha que estuvieran completamente sanas, de las cuales se sembraron 5 plántulas de cafeto en cada una de las 10 bolsas. Y se dejaron crecer hasta alcanzar los 3 meses de edad (estado de naranjito).

Paso 3. Se seleccionaron 2 cajas de Petri con la cepa de *F. moniliforme* de 8 días de crecimiento, se depositaron en una licuadora con 500 ml. de agua destilada estéril y se mezcló aproximadamente por 1 minuto. Posteriormente se depositó en un beaker.

Paso 4. Con un bisturí estéril se les realizó una incisión en la parte del cuello a 25 plántulas de cafeto ubicadas en 5 macetas que posteriormente fueron inoculadas, las otras 5 macetas (25 plántulas) sirvieron de testigo.

Paso 5. Cada una de las plántulas con incisión fue inoculada con 100ml de la suspensión de esporas de *F. moniliforme*.

Paso 6. A continuación, se colocó papel humedecido con agua destilada estéril para proporcionar humedad y oscuridad, y permitir la infección del hongo *F. moniliforme* a la planta.

El ensayo tuvo una duración de 2 meses en los cuales se observó el tiempo de infección y sintomatología.

Ensayo 4. Inoculación de *F. moniliforme* en plantas de cafeto de 6 meses de edad.

Paso 1. Se seleccionaron 10 plantas de cafeto Var. Pacas de 6 meses de edad que estuvieran completamente sanas.

Paso2. Se escogieron 2 cajas de Petri con la cepa de *F. moniliforme* de 8 días de crecimiento, se depositaron en una licuadora con 500ml. de agua destilada estéril y se mezcló aproximadamente por 1 minuto. Posteriormente se depositó en un beaker.

Paso 4,5 y 6. Se procedió de igual forma que para el ensayo 3.

El ensayo tuvo una duración de 2 meses en los cuales se observó el tiempo de infección y sintomatología.

Ensayo 5. Inoculación de *F. moniliforme* en plantas de cafeto de 12 meses de edad.

Paso 1. Se eligieron 10 plantas de cafeto Var. Pacas de 12 meses de edad que estuvieran completamente sanas.

Paso2. Se escogieron 2 cajas de Petri con la cepa de *F. moniliforme* de 8 días de crecimiento, se depositó en una licuadora con 500ml. de agua destilada estéril y se mezcló aproximadamente por 1 minuto. Posteriormente se depositó en un beaker.

Paso 4,5 y 6. Se procederá de igual forma que para el ensayo 3.

El ensayo tuvo una duración de 2 meses en los cuales se observó el tiempo de infección y sintomatología

Para evaluar la sintomatología en las plantas de cafeto infectados por el hongo, en los diferentes ensayos (del 2 al 5). Se utilizó la siguiente escala subjetiva:

Cuadro N° 4. Parámetros evaluados sobre la sintomatología en las plantas de café infectados por *Fusarium moniliforme*.

Grado	Sintomatología presentada.
0	Asintomática
1	Marchitamiento de las hojas cotiledonales
2	Pudrición de raíces secundarias
3	Aparecimiento de manchas en hojas verdaderas
4	Estrangulamiento de la base de la planta.
5	Muerte de la planta.

Nota: Esta escala se utiliza para evaluar los daños en diferentes estados fenológicos del café.

Cuadro N° 5. Etapa de desarrollo de la planta y los parámetros evaluados sobre la sintomatología de la plántula o planta de café.

Ensayo	Etapas de desarrollo de la planta	Parámetros a evaluar sobre la sintomatología del café en diferentes estados de desarrollo.
1	Semillas de café Var. Pacas	Porcentaje de germinación de semillas.
2	Plántula de 2 meses de edad	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo que dura la infección (Días) • Tasa de infección (%) ** • Sintomatología de la planta.
3	Plantas de 3 meses de edad	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo que dura la infección (Días) • Tasa de infección (%) ** • Sintomatología de la planta.
4	Plantas de 6 meses de edad	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo que dura la infección (Días) • Tasa de infección (%) ** • Sintomatología de la planta.
5	Plantas de 12 meses de edad.	<ul style="list-style-type: none"> • Tiempo que dura la infección (Días) • Tasa de infección (%) ** • Sintomatología de la planta.

** La tasa de infección se midió de la siguiente manera:

La tasa de infección para este trabajo se ha tomado como la variable incidencia:

$I = (\# \text{ de plantas enfermas} / \# \text{ total de plantas}) \cdot 100$

V. Resultados.

5.1 Aislamiento del hongo *F. moniliforme*.

Muestreo de campo

Al muestrear en el campo se colectaron plantas de 2-3 años de edad, las cuales mostraban síntomas tales como: pocas hojas y las que poseían tenían manchas y mostraban amarilla miento, parte de las ramas estaban secas y otras verdes (las que poseían hojas), al hacer raspados con navaja en el tallo se observaron franjas de color morado que recorrían parte del tallo, al extraer la planta del suelo las raíces se encontraban podridas. Al hacer cortes transversales en el tallo se observó parte del sistema vascular afectado de un color morado, muy parecido al que presenta *F. moniliforme* en aislamientos en medio de cultivo PDA. (Figura 8).

Estas muestras se procesaron y aislaron para la identificación del hongo.



Figura 8. A: Planta con pocas hojas y ramas secas. B: Franjas de los daños ocasionados en las ramas. C: Raíz podrida y sin raicillas. D: Corte transversal con daño del hongo.

Desde el 24 de Agosto de 2011 hasta el 20 de Septiembre de 2011 se tuvieron en observación 20 aislamientos en PDA, provenientes de colonias identificadas como ***Fusarium moniliforme***, a estos aislamientos se les observo cada 3 días sus características macroscópicas mas distintivas. Las características de la colonia se presentan en el cuadro N°6.

En cuanto a la características del color de fondo de placa Petri, los resultados dentro de los 20 aislamientos fueron variables a medida pasaron los días de

desarrollo micelial, obteniendo las gamas desde rosa pálido hasta violeta vinaceo. (Cuadro N°6)

El color del micelio, en los 20 aislamientos fue muy similar, desde rosado hasta morado.

La mayoría presentó una forma de colonia más o menos irregular a excepción de 3 aislamientos que presentaron una forma regular. (Cuadro N° 6)

Los resultados obtenidos en la característica de contorno de la colonia fue bastante regular, describiendo los contornos ovalados a excepción de un aislamiento que presento un contorno liso. Los colores presentados en todos los aislamientos fueron blanco crema. (Cuadro N°6).

Todos los aislamientos realizados durante la investigación denotaron la característica de un aspecto algodonoso similar en cada una de ellas.

La velocidad de crecimiento según Seifert (1996) citado por Bolaños *et al.*, (2000), sirvió para identificar el ritmo de crecimiento; los resultados comprendieron 360 horas en llenar la placa Petri de 90 mm de diámetro, a un ritmo de crecimiento de 0.02735 mm por día. (Anexo 1)

Cuadro N° 6. Características macroscópicas más distintivas de *Fusarium moniliforme*.

<i>Fusarium moniliforme</i>	Color de fondo	Aspecto de la colonia	Forma de la colonia	Contorno	Tipo de micelio	Color de colonia	Tiempo en llenar un diámetro de 90mm.
	Morado vinaceo	algodonoso	irregular	ovalada	Rastrero	Morado pálido	360 h.

5.2 Identificación morfológica y crecimiento de *Fusarium moniliforme*.

La colonia desarrollada en PDA produjo un color morado pálido. (Figura 9)



Figura 9. Ejemplos de la colonia desarrollada de *F. moniliforme*.

El crecimiento del hongo sobre la superficie de PDA contenido en una caja de 90mm de diámetro fue irregular cuyo contorno se extendió hasta llenar la caja en un promedio de 15 días produciendo un micelio algodonoso (Figura 10).



Figura 10. Muestra del crecimiento irregular y de aspecto algodonoso de 5 días de crecimiento micelial

Las **microconidias** se presentan en cadenas fialides simples laterales, apareciendo a las 3 días de haber realizado replicas, muy abundantes (Figura 11), formadas sobre hifas aéreas, dando un aspecto afelpado a la colonia, presenta una forma fusiforme o clavada.

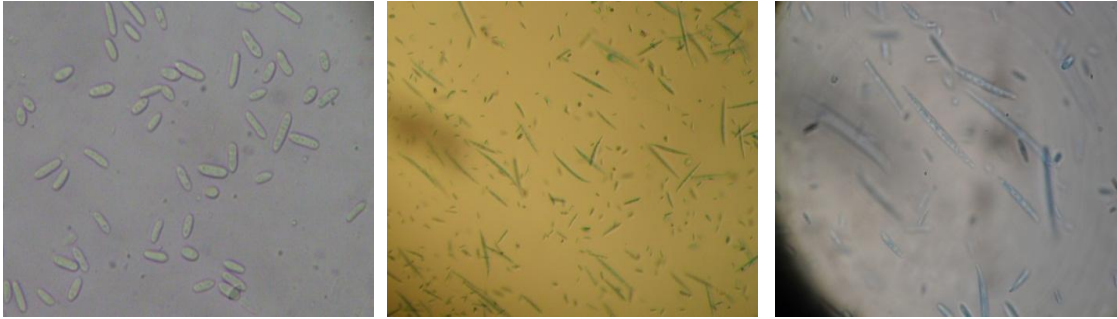


Figura 11. Diferentes vistas de microconidias, en el centro mayor cantidad de microconidias sobre macroconidias.

Las **macroconidias** se desarrollan sobre conidióforos formados en ramas laterales sobre las hifas, son en ambos extremos fusoides, de pared delgada con una célula apical con punta y pedicelo basal encontrándose hasta siete septos. Las dimensiones en promedio de las macroconidias fueron de 4µm de ancho. (Figura 12)(Cuadro N° 7).

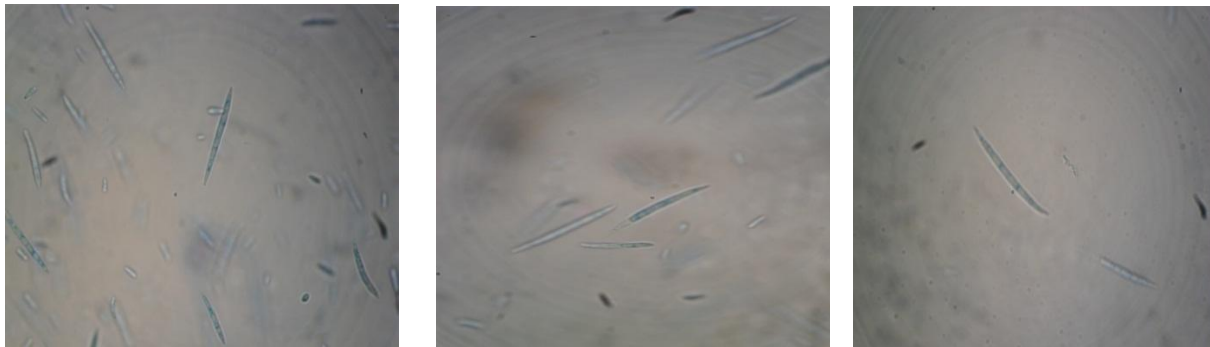


Figura 12. Diferentes vistas de macroconidias y la vista de sus septos.

Clamidosporas presentes en ambos casos (micelio y conidia), son de forma irregularmente globosa con aspecto azul oscuro dentro de ellas (Figura 13).

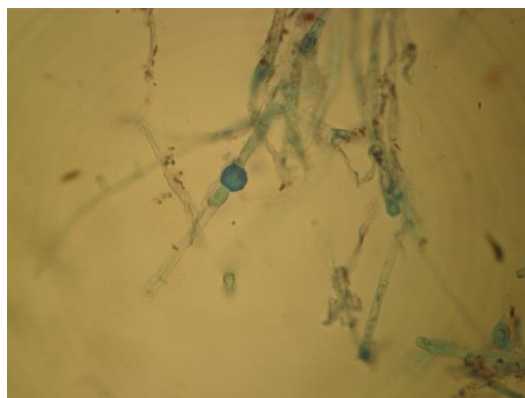


Figura 13. Clamidospora coloreada azul oscuro y parte del micelio hialino.

Cuadro N° 7. Promedios de Largo y Ancho de macroconidias de *Fusarium moniliforme*.

Fuentes en comparación.	Largo (µm)	Ancho (µm)
<i>Fusarium moniliforme</i> Fuente: Bolaños <i>et al.</i> , (2000)	13.46	1.37
<i>Fusarium moniliforme</i> Fuente: Romero (2012)	14	4

5.3 Sintomatología de *Fusarium moniliforme* en plantas de café de diferentes estados de desarrollo.

5.3.1 Fase de invernadero

Ensayo 1. Efecto de *F. moniliforme* sobre semillas de café.

En el ensayo realizado no se observó germinación de las semillas inoculadas con *F. moniliforme*, donde se dejaron en observación 3 meses, sin embargo las semillas presentaban una coloración morada y al realizar re aislamientos para comprobar los Postulados de Koch se obtuvieron colonias típicas de *F. moniliforme*, lo que indica que el hongo había infectado a las semillas.

Ensayo 2. Efecto de *F. moniliforme* en plántulas de café de 2 meses de edad (estado de concha).

Las plantas presentaron síntomas a los 21 días después de inoculadas. Se observó apareamiento de manchas de color café en hojas cotiledonales y verdaderas, al mismo tiempo también se observó pudrición de las raíces secundarias (Anexo N° 2). El síntoma más distintivo fue el ennegrecimiento y estrangulamiento de la base del tallo, comenzando con un anillo de color café oscuro, el cual avanzaba por todo el tallo y se detenía a 1.5 cm de las hojas (figura 14)



Figura 14. Plantas de 2 meses de edad mostrando síntomas del ataque de *F. moniliforme*.

El nivel de infección inicio a los 21 días, tenía 1 en la escala establecida, a los 60 días demostraba 1.83 y a los 90 días 2.5. (Cuadro N° 7 y Figura 15)

Cuadro N° 8. Porcentaje de infección de los ensayos 2 y3, en los meses de Septiembre, Octubre y Noviembre.

Tratamiento/Días después inoculación	% de Infección.		
	30	60	90
Estado de Concha	1%	1.83	2.5
Estado de Naranjito	0	2.88	4.65

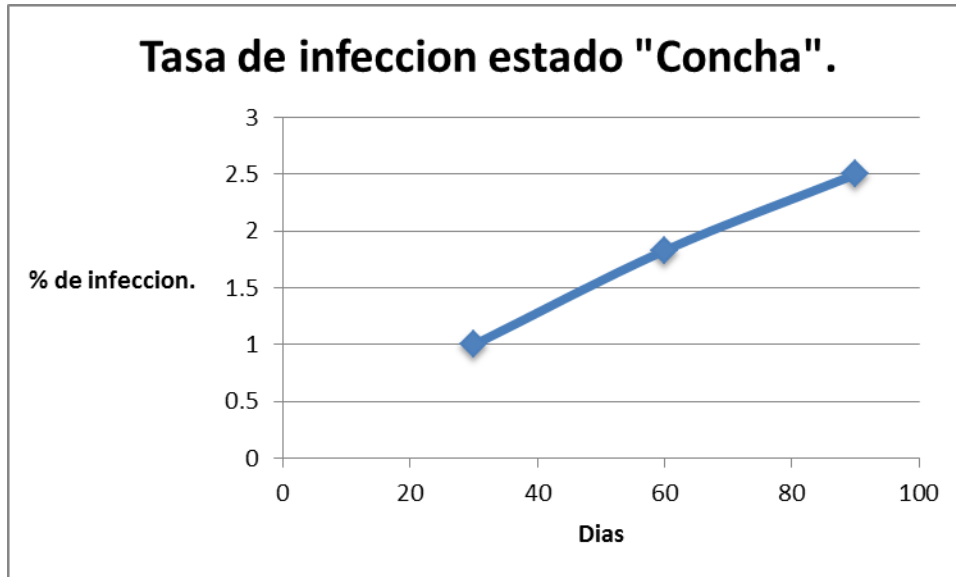


Figura 15. Tasa de infeccion a los 3 meses de observacion del ensayo 2, Plantas en estado de Concha.

Ensayo 3. Inoculación de *F. moniliforme* en plántulas de cafeto de 3 meses de edad (naranjito).

La variedad inoculada (Pacas) mostro síntomas a los 27 días de inoculado *F. moniliforme* comenzando con pudrición de las raíces secundarias, seguido de manchas de color café en hojas verdaderas y estrangulamiento en la base del tallo. (Anexo N° 2), al igual que en el ensayo 2 de plantas de 2 meses de edad el síntoma más distintivo fue el ennegrecimiento y estrangulamiento de la base del tallo, comenzando con un anillo de color café oscuro, el cual avanzaba por todo el tallo y se detenía a 1.5 cm de las hojas, a diferencia de *Rhizoctonia solani* donde estrangula el tallo y marchita las hojas, *F. moniliforme* estrangula el tallo se detiene a 1.5 cm de las hojas pero mantiene viva las hojas. (Figura 16)

El nivel de infección inicio a los 27 días, pero calculando la tasa de infección a los 30 días estaba en cero en la escala establecida, luego a los 60 días de la infección estaba a nivel 3 y a los 90 días aumento a 4.5. (Cuadro N° 7 y Figura 17)



Figura 16. Plantas en estado de Naranjito con síntomas causados por *F. moniliforme*.

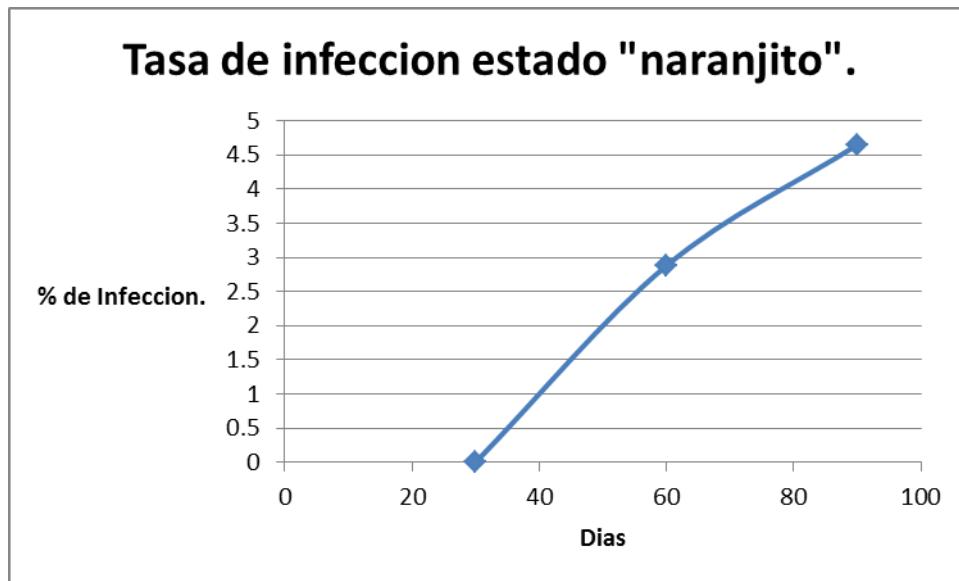


Figura 17. Tasa de infección a los 3 meses de observación del ensayo 3, Plantas en estado de Naranjito.

Ensayos 4 y 5. Inoculación de *F. moniliforme* en plantas de café de 6 y 12 meses de edad.

La variedad inoculada (Pacas) mostro síntomas a los 2 meses de inoculado *F. moniliforme* en ambos ensayos. Comenzando con un apareamiento de manchas color café de hojas verdaderas y seguidas de un amarillamiento y marchitez de las hojas, aparentemente en las raíces no se ven afectadas, pero al realizar el último

paso en los Postulados de Koch en ambos casos se aislaron colonias de *F. moniliforme*. (Figura 18 y 19)

En plantas de 6 y 12 meses mostro síntomas a los 60 días con una escala de infección de 0.5 y se prolongó a los 90 días, llegando a los 120 días con una escala de 0.8. (Cuadro N° 8 y Figura 20 y 21)



Figura 18. Plantas de 6 meses de edad al principio del ensayo y luego mostrando síntomas, aparentemente sin daños en las raíces.



Figura 19. Plantas de 12 meses de edad, presentando un tallo poco desarrollado y pocas hojas verdaderas, aparentemente sin daño en las raíces.

Cuadro N° 9. Porcentaje de infección de los ensayos 4 y5, en los meses de Agosto, Septiembre, Octubre y Noviembre.

Tratamiento/Días Después inoculación	% de Infección.			
	30	60	90	120
Plantas 6 meses	0	0.5	0.5	0.83
Plantas de 12 meses	0	0.5	0.5	0.83

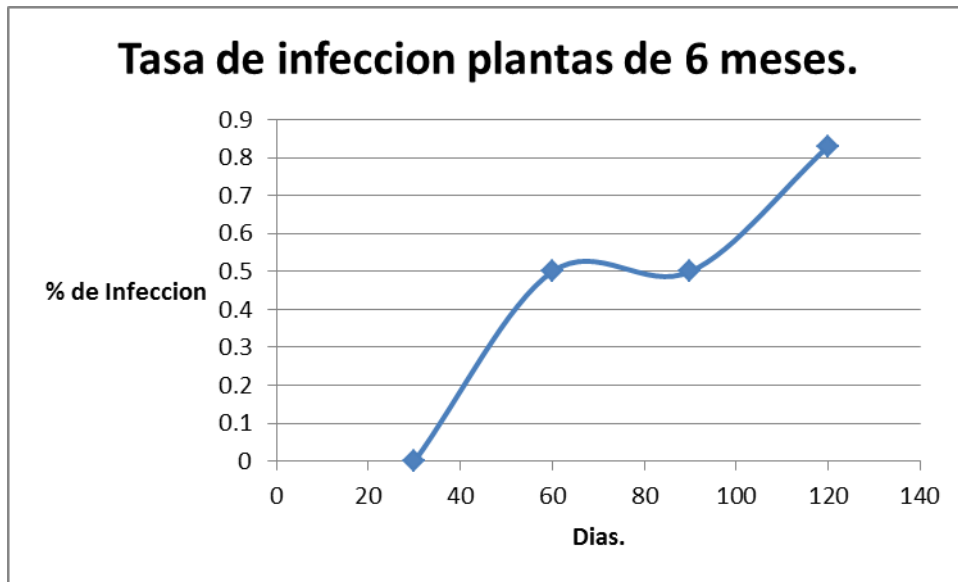


Figura 20. Tasa de infeccion a los 4 meses de observacion del ensayo 4, Plantas de 6 meses de edad.

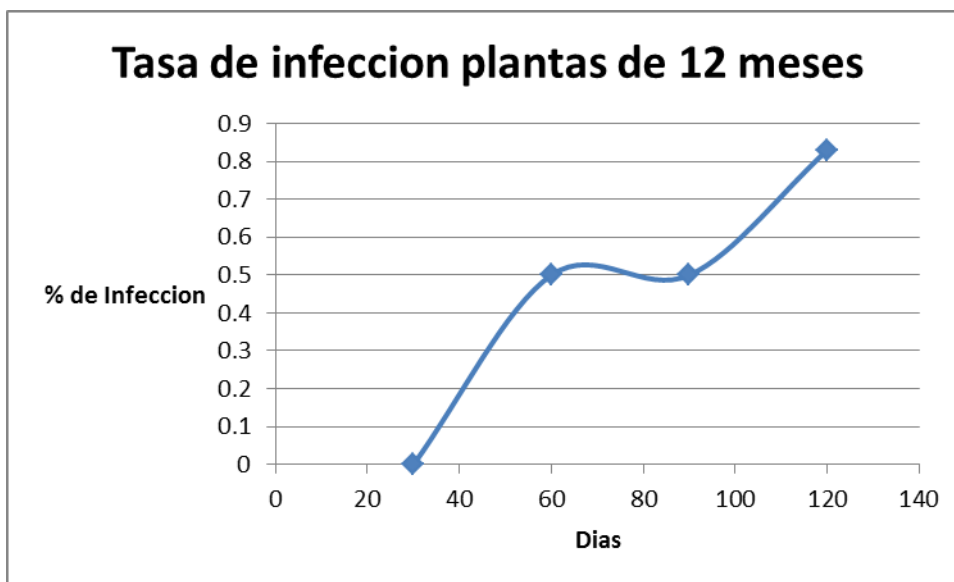


Figura 21. Tasa de infeccion a los 4 meses de observacion del ensayo 5, Plantas de 12 meses de edad.

Cuadro N° 9. Cuadro resumen de los parámetros evaluados sobre la sintomatología causada por *Fusarium moniliforme* a plantas de café en diferentes estados de desarrollo.

Ensayo	Etapa de desarrollo de la planta	Parámetros a evaluar sobre la sintomatología del café en diferentes estados de desarrollo.
1	Semillas de café Var. Pacas	0% de germinación de semillas.
2	Plántula de 2 meses de edad	Primeros síntomas a los 21 días, a los 90 días y no habían muerto.
		30 días:1%; 60 días: 1.83%; 90 días: 2.5%
		Sintomatología: -Manchas en hojas cotiledonales y en las hojas verdaderas. -Pudrición de las raíces secundarias. -Ennegrecimiento y estrangulamiento de la base del tallo. -Mantiene erectas las hojas.
3	Plantas de 3 meses de edad	Primeros síntomas a los 27 días, a los 90 días y no habían muerto.
		30 días: 0%; 60 días: 2.88%; 90 días: 4.65%
		Sintomatología: -Manchas en hojas cotiledonales y en las hojas verdaderas. -Pudrición de las raíces secundarias. -Ennegrecimiento y estrangulamiento de la base del tallo. -Mantiene erectas las hojas.
4	Plantas de 6 meses de edad	Primeros síntomas a los 60 días, a los 120 días y no habían muerto.
		30 días: 0%; 60 días: 0.5%; 90 días: 0.5%; 120 días: 0.83%
		Sintomatología: -Manchas en hojas verdaderas. - Amarillamiento y marchitez de las hojas.
5	Plantas de 12 meses de edad.	Primeros síntomas a los 60 días, a los 120 días y no habían muerto.
		30 días: 0%; 60 días: 0.5%; 90 días: 0.5%; 120 días: 0.83%
		Sintomatología: -Manchas en hojas verdaderas. - Amarillamiento y marchitez de las hojas.

VI. Discusión.

En cuanto a las características morfológicas de las colonias, los resultados no concuerdan con los de Bolaños, *et al.*, (2000); ellos observaron colonias desarrolladas en PDA produciendo un color amarillo y rosado, mientras que en este caso, las colonias presentaron colores de rosado hasta morado, Smith *et al.*, (1992) menciona que en PDA las colonias de ***Fusarium*** tienen un aspecto variable que depende del tipo de cepa. La cepa colectada por Bolaños *et al.*, (2000) fue aislada de plantas en estado de concha, mientras que la cepa que se aisló para este trabajo provenía de cafetos adultos, la diferencia de color podría deberse a la edad de los huéspedes.

De la misma forma, el crecimiento del hongo sobre la superficie de PDA fue diferente con los resultados de Bolaños, *et al.*, (2000). En este trabajo, el crecimiento del hongo en una caja Petri de 90cm de diámetro fue irregular con contornos ovalados y la cubrió en un tiempo de 360 horas, en cambio en el trabajo de ellos se observaron contornos que se extendieron de forma regular hasta llenar la caja a las 264 horas. La diferencia entre el tiempo de llenado posiblemente se pudo deber a las condiciones que se dejaron en crecimiento; Bolaños *et al.*, (2000) lo dejaron en completa oscuridad a 24°C, mientras que en este trabajo se dejaron a temperatura ambiente (26-28°C) y con 12 horas luz y 12 horas oscuridad.

Todos los aislamientos realizados durante la investigación denotaron la característica de un aspecto algodonoso similar en cada una de ellas, coincidiendo con Bolaños, *et al.*, (2000), en donde obtuvieron micelio algodonoso afelpado.

Las características morfológicas de ***F. moniliforme***, (microconidias, macroconidias y clamidosporas) observadas en este trabajo coinciden con las descripciones hechas por Bolaños, *et al.*, (2000) y por Agrios (1991), lo cual indica que se trata de la misma especie.

Por otra parte, en el ensayo de efecto de ***F. moniliforme*** sobre semillas se observó que cuando estaban afectadas presentaron una coloración negra a morada al abrirlas, lo cual concuerda con Saballos (1982) quien menciona que

Fusarium spp pueden causar ennegrecimiento y la muerte de los embriones, pero en este caso refiriéndose a semillas de algodón.

Asimismo, en el ensayo 2 y 3 efecto de ***F. moniliforme*** en plántulas de café de 2 y 3 meses de edad, los resultados fueron diferentes a los obtenidos por Ubeda (1996); y Anacafe (1998). En este trabajo las plantas mostraron síntomas a los 21 y 27 días respectivamente, después de haber sido inoculado el hongo. Mientras que ellos, afirman que los síntomas típicos en los semilleros y concheros son lesiones café oscuras en la base del tallo, las plantitas se marchitan, se doblan y luego mueren; en este trabajo los síntomas se notaron con un apareamiento de manchas color café en hojas cotiledonales y verdaderas; lo más distintivo fue el ennegrecimiento y estrangulamiento de la base del tallo, comenzando con un anillo de color café oscuro, el cual avanzó por todo el tallo y se detuvo a 1.5 cm de distancia de las hojas. Posiblemente Ubeda (1996) y Anacafe (1998) relacionan los síntomas observados a los patógenos ***Rhizoctonia solani***, ***Pythium spp***, ***Fusarium spp***, los cuales causan lo que se conoce como **mal del talluelo**. Sin embargo, estos patógenos cuando atacan a las plantas, las matan en un tiempo bien corto. Por lo contrario, lo que se observó en este trabajo, las plantas se mantuvieron vivas por largo periodo y según se observó en algunos casos podrían llegar a recuperarse, por lo tanto si se aplicaran fungicidas el hongo podría ser controlado.

Con respecto a los ensayos donde se inoculó ***F. moniliforme*** en plantas de café de 6 y 12 meses de edad (Ensayos 4 y 5), los resultados coinciden con los obtenidos por Bolaños *et al.*, (2000) quienes mencionan que cuando las plantas inoculadas tienen más de 6 meses, tardan un tiempo mayor de 3 meses en mostrar síntomas. En el presente trabajo, las plantas mostraron síntomas a los 4 meses, comenzando con apareamiento de manchas color café en hojas verdaderas y posteriormente amarillamiento y marchitez de las hojas. Aparentemente, las raíces no se ven afectadas, pero al realizar reaislamientos se obtuvieron colonias típicas de ***F. moniliforme***, lo cual concuerda con PROCAFE (2001), quien menciona que en plántulas y plantas adultas el hongo causa la

enfermedad también causa el estrangulamiento a nivel del cuello del tallo, por lo que posteriormente se marchitan y pueden llegar a morir.

En cuanto al aparecimiento de síntomas en cada uno de los ensayos, las diferencias observadas posiblemente se deban a lo que expone Smith (1992) quien menciona que los síntomas de la marchitez fusarica varían según el huésped, el patotipo y las condiciones de infección. Las hojas más viejas muestran al principio un aclarado de venas leve, clorosis de la lámina y/o marchitez, y estos síntomas progresan posteriormente a las hojas jóvenes, a menudo iniciándose unilateralmente en algunas, en correspondencia con una infección localizada en parte del sistema vascular de raíz y tallo; las partes afectadas se vuelven de color pardo.

El incremento de la tasa de infección en los ensayos 2 y 3, demuestra que durante el periodo del estudio, existieron las condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la enfermedad (figura 15 y 17 de ensayos 2 y 3), por lo contrario en los ensayos 4y 5 al principio se observó un crecimiento acelerado, sin embargo el hecho de haber observado un retardamiento en indica que hubieron condiciones ambientales desfavorables (figuras 20 y 21 ensayos 4y 5). Según Agrios (1991), las infecciones reales dan como resultado la formación de zonas necróticas o de zonas decoloradas y malformadas, a las que se les denomina síntomas. Sin embargo, algunas infecciones permanecen latentes, o sea, no producen síntomas observables, sino hasta cuando las condiciones del medio ambiente son favorables o bien durante una etapa distinta en la madurez de una planta.

VII. Conclusión.

Con los resultados obtenidos en este trabajo se puede concluir lo siguiente:

1. Se identificó el hongo ***Fusarium moniliforme*** como patógeno en plantaciones de café de la zona Occidental en El Salvador.
2. Se aisló y caracterizó una cepa de ***Fusarium moniliforme*** proveniente de la finca en estudio, mostrando pequeñas diferencias en cuanto a coloración de la colonia, en PDA.
3. ***Fusarium moniliforme*** presenta una morfología similar encontrada por otros autores.
4. ***Fusarium moniliforme*** es patogénico en todos los estadios de desarrollo de la planta de café.
5. Los cambios en el patrón de infección están en función de factores medio ambientales y la edad de la planta.

VIII. Recomendaciones.

1. Hacer estudios prospectivos para determinar la presencia de este patógeno a nivel nacional, para cuantificar el área afectada.
2. Realizar estudios para determinar si todas las variedades comerciales de cafeto, son susceptibles a los ataques de este patógeno.
3. Hacer estudios de patogenicidad en arboles de sombra ya que pueden ser hospederos alternos del patógeno.
4. Efectuar trabajos con diferentes cantidades de esporas ya que esta enfermedad depende de la cantidad de inóculo inicial que se encuentre en los sustratos.
5. Dada la agresividad del patógeno se recomienda evaluar diferentes medidas de control para dar soluciones viables a los productores.

IX. Referencias bibliográficas.

Agrios, N.G.1991. Fitopatología. 2 ed. Editorial Limusa. México D. F. 382 p.

ANACAFE (Asociación Nacional del Café) 1998. Manual de Caficultura. 3 Ed. Guatemala. 50pp

Bolaños, W.A.; López, F. & Velásquez, B.C. 2000. Caracterización del Hongo *Fusarium* spp en la zona cafetalera Occidental de El Salvador. Tesis. Ing. Agr. San Salvador. El Salvador. Universidad de El Salvador. 77pp

Castaño, J. & Mendoza, L. 1994. Guía para el Diagnóstico y Control de Enfermedades en Cultivos de Importancia Económica. 3 Ed. Zamorano Academic Press. Honduras. 290pp

Departamento de Protección de Vegetal. S.f. Manual de práctica de laboratorio de Microbiología Agrícola. San salvador, SV. Universidad de El Salvador; Facultad de Ciencias Agronómicas. P.i.

French, E.R. & Herbert, T.T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica. IICA. 290pp.

Manners, JG. 1986. Introducción a la Fitopatología. Sistemas Editoriales Técnicos S.A de C.V. México D.F. 295pp

Nelson, P.E; Toussoun, T.A; Cook, R.J. 1981.Fusarium diseases, Biology and Taxonomy.Library of congress cataloging in publication data. The Pennsylvania State University. United States of America.457 pp.

PROCAFE (Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café). 1997. Manejo integrado de Enfermedades en Viveros de Café. BoletínTécnico N° 8, Año 3, La Libertad SV. 8pp

PROCAFE (Fundación Salvadoreña para Investigaciones del Café). 2001. Combate integrado de plagas, enfermedades, nematodos y malezas del cafeto. 1ª. Edición. San Salvador. El Salvador. 118 p.

Rivas, A. & Gómez, R. 2008. Caracterización e identificación de bacterias fitopatógenas. Agencia suiza para el desarrollo y la Cooperación (COSUDE). San Salvador. El Salvador. Centroamérica.

Roberts, D.A. & Boothroyd, C.W. 1972. Fundamentos de patología vegetal. Editorial W.H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A.

Saballos, P., 1982. Hongos en semillas. División de investigación agraria y forestal. Departamento de parasitología vegetal. La Libertad

Smith, I.M; Dunez, J; Lelliott, R.A; Phillips, D.H; Archer, S.A. 1992. Manual de enfermedades de las plantas. Ediciones mundi Prensa. España. 671 pp.

Ubeda, R. 1996. Manual de Caficultura de Nicaragua. Manejo de las enfermedades del café. Unión Nicaragüense de Cafetaleros. 89pp

Zillinsky, F.J. 1984. Guía para la identificación de enfermedades en Cereales de Grano Pequeño. CIMMYT (Centro de Mejoramiento de Maíz y Trigo, ME). México.

X. Anexos.

Anexo N° 1. Sumatoria de crecimiento cada 24 horas y los días de observación de cajas de Petri inoculadas con *Fusarium moniliforme*.

Repetición	Mediciones totales por observación.						
	29/08/2011	31/08/2011	02/09/2011	06/09/2011	07/09/2011	16/09/2011	20/09/2011
1	1.725	2.125	2.5	3.25	3.425	3.725	3.775
2	1.675	2.05	2.425	3.075	3.275	3.55	3.625
3	1.9	2.275	2.7	3.275	3.55	3.975	3.825
4	2.475	2.95	3.125	3.525	3.7	4	3.85
5	1.475	1.925	2.425	3.1	3.475	3.85	3.85
6	1.75	2.125	2.475	2.775	3.275	3.8	3.675
7	1.65	1.9	2.25	2.925	3.15	3.775	3.675
8	1.75	2.275	2.7	3.4	3.65	4.075	3.875
9	2.125	2.35	2.675	3.35	3.55	3.625	3.6
10	1.775	2.275	2.7	3.35	3.55	3.825	3.85
11	1.675	2.15	2.525	3.175	3.475	3.925	3.85
12	1.975	2.375	2.675	3.1	3.55	3.075	3.85
13	2.125	2.425	2.925	3.425	3.775	3.975	3.925
14	1.8	2.175	2.625	3.175	3.425	3.675	3.625
15	1.8	2.15	2.65	3.175	3.5	3.975	3.9
16	1.55	1.975	2.425	3.1	3.3	3.975	3.6
17	1.825	2.325	2.625	3.05	3.225	3.675	3.575
18	1.525	1.975	2.325	2.975	3.15	3.775	3.625
19	1.075	1.575	2.1	2.925	3.175	3.85	3.75
20	1.075	1.925	2.375	3	3.225	3.375	3.35
Promedios	1.73625	2.165	2.56125	3.15625	3.42	3.77375	3.7325

Anexo N° 2. Resultados mensuales de los 5 tratamientos de los ensayos 2 y3.

ENS	Rep	Septiembre					Octubre					Noviembre.							
		0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5
Ensayo 2. Estado Concha.	T2R1	4			1			3		1	1			3		1	1		
	T2R2	5						5						4				1	
	T2R3	3			2			1		2	2			1		2	2		
	T2R4	5						3		2				3		2			
	T2R5	5						5						5					
Total		22			3			17		5	3			16		5	3	1	
Ensayo 3. Estado naranjito.	T3R1	5						4			1			1			2	2	
	T3R2	5						2			2	1		0			2	3	
	T3R3	5						4				1							
	T3R4	5						5						3				2	
	T3R5	5						0			5			0			5	2	
Total		25						15			8	2		4			9	9	

Anexo N° 3. Resultados mensuales de los 5 tratamientos de los ensayos 4 y5.

Ens	Re	Agosto					Septiembre					Octubre					Noviembre													
		0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5					
Ensayo 4. Plantas 6 meses	T4 R1	1						1						1												1				
	T4 R2	1									1							1											1	
	T4 R3	1						1						1															1	
	T4 R4	1						1						1															1	
	T4 R5	1						1						1															1	
Tota		5						4			1			4				1								5				
Ensayo 5. Plantas 12 meses	T5 R1	1						1						1															1	
	T5 R2	1									1							1											1	
	T5 R3	1						1						1															1	
	T5 R4	1						1						1															1	
	T5 R5	1						1						1															1	
Tota		5						4			1			4				1								5				

(Ver cuadro N°4. Parámetros para evaluar sintomatología)