

Establecimiento de un protocolo para el crecimiento y multiplicación de *Setophoma terrestris* y *Fusarium* spp. provenientes de un cultivo de cebolla (*Allium cepa* L)

Establishment of a protocol for the growth and multiplication of *Setophoma terrestris* and *Fusarium* spp. from an onion culture (*Allium cepa* L)

Karol López-Courrau¹, William Rivera-Méndez², Jaime Brenes-Madriz³,
Claudia Zúñiga-Vega⁴

Fecha de recepción: 11 de diciembre de 2017
Fecha de aprobación: 2 de abril de 2018

López-Courrau, K; Rivera-Méndez, W; Brenes-Madriz, J; Zúñiga-Vega, C. Establecimiento de un protocolo para el crecimiento y multiplicación de *Setophoma terrestris* y *Fusarium* spp. provenientes de un cultivo de cebolla (*Allium cepa* L). *Tecnología en Marcha*. Vol. 31-4. Octubre-Diciembre 2018. Pág 37-48.

DOI: <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3958>



- 1 Ing. Biotecnología. Laboratorios Químicos Industriales. Costa Rica. Correo electrónico: klopez@laquinsa.co.cr.
- 2 Ing. Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Costa Rica. Correo electrónico: wirivera@tec.ac.cr.
- 3 Ing. Agrónomo. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Costa Rica. Correo electrónico: jabrenes@tec.ac.cr.
- 4 Bióloga. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Centro de Investigación en Biotecnología. Escuela de Biología. Costa Rica. Correo electrónico: czuniga@tec.ac.cr.

Palabras clave

Fusarium sp; *Setophoma terrestris*; cebolla; ajo

Resumen

La cebolla (*Allium cepa* L.) ocupa el segundo lugar de consumo de hortalizas en el mundo y en Costa Rica, en el 2015, se cultivaron 1633,6 ha aproximadamente. Este cultivo se puede ver afectado por la presencia de fitopatógenos, especialmente los hongos que atacan las raíces como *Setophoma terrestris*, que ocasiona la enfermedad conocida como raíz rosada, y el género *Fusarium* spp. que provoca la podredumbre basal. El objetivo de esta investigación consistió en establecer un protocolo para la optimización del crecimiento y la multiplicación de *S. terrestris* y *Fusarium* spp. en medio líquido, para facilitar su identificación, manipulación y trabajos experimentales posteriores. Para esto se realizó la evaluación de diferentes parámetros físicos (pH, temperatura, velocidad de agitación y fotoperiodo) y de distintos medios de cultivo. Los medios analizados para *Fusarium* spp. fueron papa dextrosa casero y comercial, avena, V8, SNA, Sabouraud dextrosa y agua. En *S. terrestris* se evaluaron papa dextrosa comercial y casero, avena, vainica, medio mínimo y agua. Las diferencias de los tratamientos se determinaron mediante un análisis de varianza y la prueba Tukey. Se concluyó que *Fusarium* spp. crece óptimamente a 30°C, pH 6, 100 rpm y oscuridad, mientras que *S. terrestris* lo hace a 28°C, pH 4, 100 rpm. En este último, el crecimiento en oscuridad afectó positivamente el incremento de biomasa, mientras que la luz continua indujo el desarrollo de estructuras reproductivas. El medio de cultivo idóneo para *S. terrestris* fue el de vainica para reproducción y papa dextrosa casero para biomasa, y para *Fusarium* spp. fue papa dextrosa casero para ambos procesos (biomasa y reproducción).

Keywords

Fusarium sp; *Setophoma terrestris*; cebolla; ajo.

Abstract

Among the vegetables, the onion (*Allium cepa* L.) is the second largest consumed crop in the world and in 2015, Costa Rica planted approximately 1633.6 ha of onion. This production is affected by the presence of phytopathogens, especially fungi that attack roots such as *Setophoma terrestris*, which causes the disease known as pink root, and the fungi of the genus *Fusarium* spp. that causes basal rot. The objective of this research was to establish a protocol to optimize the growth of both fungi (*S. terrestris* and *Fusarium* spp.) in liquid medium, in order to facilitate their identification, manipulation and subsequent experimental works. Various physical parameters (pH, temperature, stirring speed and photoperiod) were evaluated and different culture media compositions were tested. The culture media analyzed in *Fusarium* spp. were potato dextrose homemade and commercial, oats, V8, SNA, Sabouraud dextrose and water. In addition, potato dextrose commercial and homemade, oats, vainica, minimum medium and water were tested for *S. terrestris*. Differences in treatments were determined using an analysis of variance and the Tukey test. This study demonstrated that *Fusarium* spp. grows optimally at 30 °C, pH 6, 100 rpm and darkness, and *S. terrestris* does at 28°C, pH 4, 100 rpm. In this fungus, growth under darkness stimulated biomass gain whereas light incidence resulted in reproductive phase establishment. The ideal medium for *S. terrestris* was the vainica for reproduction and homemade potato dextrose for vegetative growth, meanwhile for *Fusarium* spp. homemade dextrose potato medium was optimal for both processes..

Introducción

En Costa Rica se siembran 1633,6 ha de cebolla [1] y en la zona alta de Cartago, específicamente en los cantones de Oreamuno y Alvarado, se ubica la mayoría de los agricultores. Una de las principales fitopatologías fungosas que afecta a esta hortaliza es la enfermedad de la raíz rosada, cuyo agente causal es *Setophoma terrestris*, conocido anteriormente como *Pyrenochaeta* o *Phoma* (Mycobank, accesión MB514659). Este ascomiceto infecta el sistema radical de la planta, presentando un color rosado característico, cuya tonalidad varía en función de la severidad y el tiempo transcurrido desde la infección. Las plantas continúan emitiendo raíces pero sin lograr satisfacer sus requerimientos nutricionales, lo que provoca que el follaje se torne amarillento y presente enanismo, afectando la calidad y productividad, con pérdidas en algunos casos superiores al 90% [2], [3]. Además en algunas ocasiones se confunde con la pudrición basal causada por *Fusarium* spp., que se caracteriza por su gran capacidad para colonizar el tejido deteriorado, en este caso por *S. terrestris* [4], [5]. Por lo anterior, resulta de mucha utilidad aislar adecuadamente estos patógenos para crear estrategias para su combate.

El cultivo de microorganismos en medio líquido facilita la cuantificación del material y el análisis de sus características principales [6]. Además, la producción es mayor en relación con medios semisólidos y es más económico. El objetivo de esta investigación consistió en establecer un protocolo para la optimización del crecimiento y la multiplicación en medio líquido de *S. terrestris* y *Fusarium* spp., para facilitar su identificación, manipulación y trabajos experimentales posteriores.

Materiales y métodos

El inóculo se inició con material (*Fusarium* spp. y *S. terrestris*) aislado previamente en el Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). Este se subcultivó en varias ocasiones en medio de papa dextrosa acidificado (PDA acidificado), para garantizar la estabilidad de los cultivos axénicos. Los pre-inóculos se obtuvieron de secciones de agar de los medios de 5-6 días de crecidos.

Optimización de las condiciones de crecimiento

Para determinar los parámetros óptimos de incremento del micelio se evaluaron diferentes condiciones de temperatura, pH, agitación y fotoperiodo (cuadro 1). Se empleó un inóculo estándar de secciones de medio PDA de 6 días. Para cada uno se realizaron 4 repeticiones.

Cuadro 1. Condiciones evaluadas para determinar los parámetros óptimos de crecimiento de

Condiciones	Temperatura	pH	Agitación	Fotoperiodo
	24°C	3	200 rpm	Luz
	26°C	4	150rpm	Oscuridad
	28°C	5	100rpm	Ambiente
	30°C	6		
	Ambiente (22-24°C)			

La producción de biomasa se cuantificó mediante la diferencia gravimétrica entre peso fresco y seco. En cada prueba, se evaluó durante 15 días el parámetro de interés y las demás

condiciones se mantuvieron según lo informado en la literatura, como los óptimos para cada patógeno (pH 4 para *S. terrestris*, pH 6 para *Fusarium* spp., temperatura ambiente (22-24°C) oscuridad y 100 rpm para ambos). Se utilizó medio caldo PD marca comercial Difco® en Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio. Para determinar el peso seco las muestras se secaron en una estufa a 70°C por 24 h.

Cultivo en diversos medios de crecimiento

Se evaluaron cinco medios para *S. terrestris* y seis para *Fusarium* spp. durante 15 días (cuadro 2), bajo las siguientes condiciones físicas: *S. terrestris*: pH 4, oscuridad, 100 rpm y temperatura ambiente, *Fusarium* spp.: pH 6, oscuridad, 100 rpm y temperatura ambiente. Se realizaron cuatro repeticiones y como control se utilizó agua destilada.

Cuadro 2. Medios de cultivo evaluados en *Setophoma terrestris* y *Fusarium* sp.

SETOPHOMA TERRESTRIS	FUSARIUM SP
Vaina de Judías	Papa dextrosa casero
Papa Dextrosa Casero	Papa dextrosa comercial
Papa Dextrosa Comercial	Spezieller Nährstof-farmer (SNA)
Avena	V8
Extracto Mínimo	Avena
Agua (Control)	Sabouraud dextrosa
	Agua (Control)

El medio óptimo para cada hongo se estimó con los resultados obtenidos de biomasa, también se determinó el mejor para inducir la mayor cantidad de formación de estructuras reproductoras (conidios). Posteriormente se realizaron las curvas de crecimiento en los que indicaron ser los más adecuados. Se evaluaron siete frascos Erlenmeyer para cada hongo y se cuantificó por 17 días la producción de peso fresco, peso seco y conidios viables, tomando muestras cada 3 días.

Resultados

Optimización de las condiciones de crecimiento

Temperatura:

Se determinó que la mayor producción en peso fresco de *Fusarium* spp. se produjo a 30°C, con 12,2 g y la menor producción se obtuvo a 24 °C. En cuanto a *S. terrestris* la mayor producción de peso fresco se obtuvo a temperatura ambiente con 17,2 g y la menor a 24°C con 11,3g. En cuanto al peso seco se observó que la mayor cantidad de biomasa para *Fusarium* spp. fue significativamente mayor ($p=0.000336$) bajo condiciones de 30°C y temperatura ambiente, donde se registró una biomasa de 0,3 g. Para *S. terrestris* el mayor peso seco se logró a 28°C con 0,5g, con diferencias significativas ($p=0.00000002337$) (figura 1).

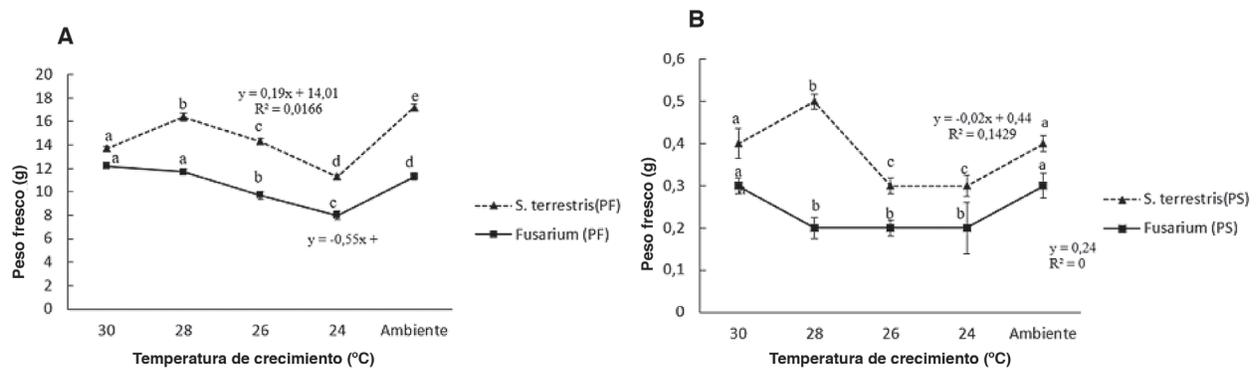


Figura 1. Datos promedio obtenidos del peso fresco (A) y seco (B) de *Setophoma terrestris* y *Fusarium* spp. a diferentes temperaturas.

pH:

La mayor producción en peso fresco de *Fusarium* spp. se dio a un pH de 6 con 10g ; a pH de 3, 4 y 5 la diferencia no es significativa ($p=0.000262$). En cuanto a *S. terrestris* el mayor peso fresco fue a pH de 4 con 17,8g y el menor a pH de 3 con 11,5g. Para el peso seco se observa que el pH no marcó diferencia, ya que los resultados obtenidos en la mayoría de los casos son de 0,2g. Para *S. terrestris* el mayor peso seco se obtuvo a pH de 4 con 0,7g (figura 2).

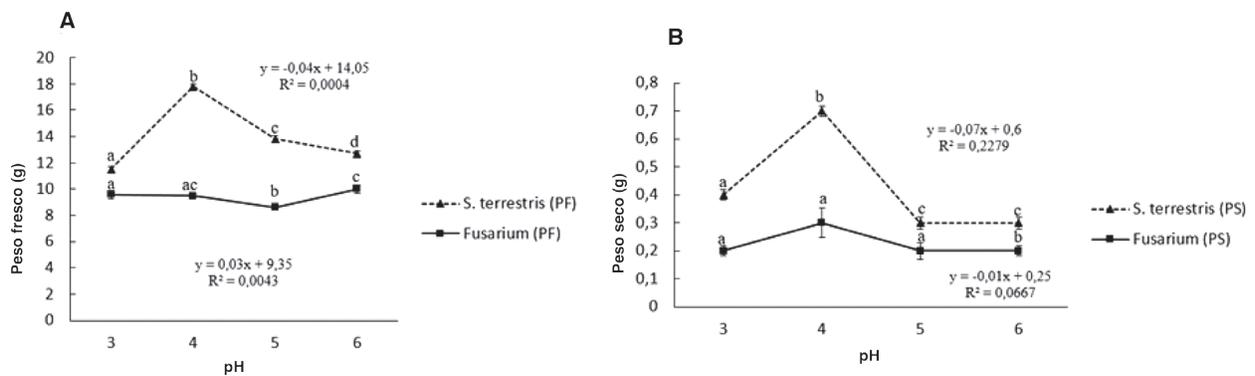


Figura 2. Datos promedio obtenidos de la biomasa correspondiente a los distintos pH utilizados, tanto de peso fresco (A) como de seco (B).

Agitación:

Se determinó que la velocidad de agitación apropiada para ambos microorganismos, tanto en peso fresco como seco es de 100 rpm, ya que con ésta se alcanzó el mayor crecimiento del micelio. A mayor número de revoluciones, disminuye la cantidad de biomasa producida por los hongos (figura 3). El análisis de varianza determinó que existen diferencias significativas en las velocidades de agitación utilizadas y todas eran relevantemente diferentes y afectaban directamente la producción de micelio (*S. terrestris* 3.53E-07; *Fusarium* 1.30E-08).

Fotoperiodo:

Para *S. terrestris* en la oscuridad se consiguió el mayor peso fresco 17,2g y seco 0,4g. El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (*S. terrestris*

$p=1.17E-05$). A nivel cuantitativo, se evidencia que la oscuridad favorece la producción del micelio (figura 4), pero a nivel cualitativo, la luz continua induce la multiplicación del hongo. En el caso de *Fusarium* spp. se obtuvieron 11,3g en la oscuridad de peso fresco y 0,3g de peso seco. Se evidenciaron diferencias significativas (*Fusarium* $p=0.000247$), el mayor contenido se logró en la oscuridad.

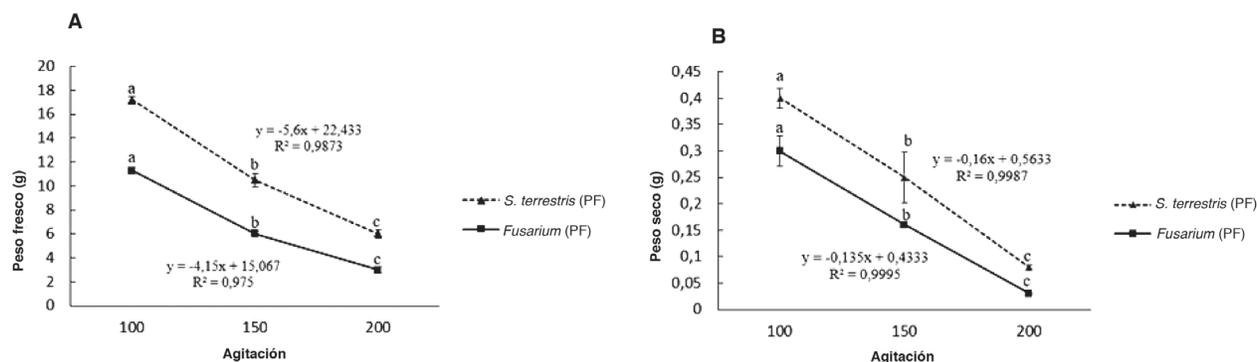


Figura 3. Datos correspondientes a la biomasa promedio obtenida tanto en peso fresco (A) como seco (B) a diferentes revoluciones de agitación.

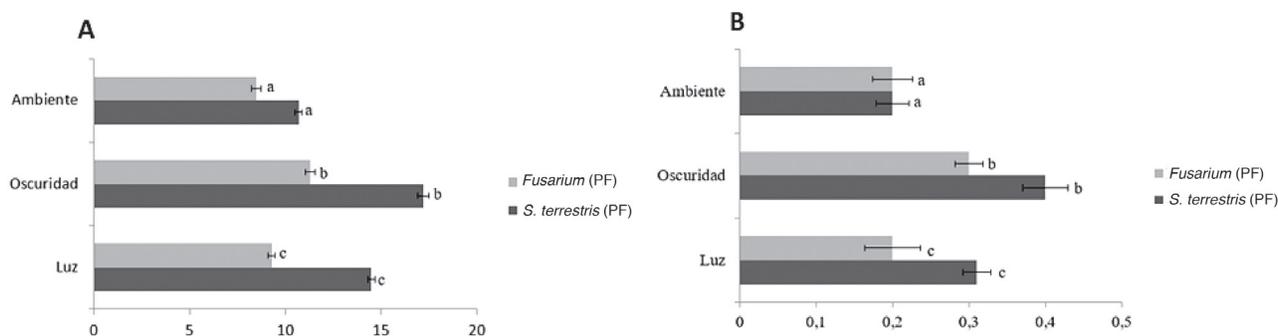


Figura 4. Resultados de biomasa promedio de peso fresco (A) y seco (B) obtenida en las pruebas realizadas bajo diferentes condiciones de fotoperiodo.

Pruebas con medios de cultivo

En los cuadros 3 y 4 se observan los resultados obtenidos de *S. terrestris* y *Fusarium* sp. con los medios evaluados.

El medio de papa dextrosa comercial en *S. terrestris* mostró pellets grandes y en *Fusarium* spp., indujo una formación heterogénea poco óptima, donde las macroconidias no estaban bien definidas. En papa dextrosa casero se favoreció el desarrollo de *S. terrestris*, con pellets más pequeños que los del comercial, donde la acumulación formó un micelio algodonoso en la capa superficial del Erlenmeyer. En el caso de *Fusarium* spp., papa dextrosa casero fue el que mostró una mayor tasa de crecimiento homogéneo con formación de pellets pequeños.

El medio avena en *S. terrestris* indujo una morfología irregular, ya que no presentaba pellets definidos. Se obtuvo un peso fresco significativamente alto de 41g, pero uno seco muy bajo

de 0.8g (cuadro 3 y 4). En *Fusarium* spp., este medio no fue tan bueno. En agua se obtuvo la respuesta esperada para un control, ya que ninguno de los dos se pudo desarrollar en este medio.

Cuadro 3. Biomasa obtenida de *S. terrestris* en los diferentes medios de cultivo evaluados

Medio	Peso Fresco	Peso Seco	Diferencia
Vaina de Judías	45.05g	1.90g	43.15g
Papa Dextrosa Casero	34.70g	1.70g	33.00g
Papa Dextrosa Comercial	17.20g	0.40g	16.80g
Avena	41.00g	0.80g	40.20g
Extracto Mínimo	26.85g	1.30g	25.55g
Agua (Control)	0g	0g	0g

Cuadro 4. Biomasa obtenida de *Fusarium* sp en los diferentes medios de cultivo evaluados

Medio	Peso Fresco	Peso Seco	Diferencia
Papa Dextrosa Casero	21.65g	0.80g	20.85g
Papa Dextrosa Comercial	11.30g	0.30g	11.00g
Spezieller Nährstoff-Farmer (SNA)	8.35g	0.45g	7.85g
V8	18.20g	0.40g	17.80g
Avena	3.50g	0.30g	3.20g
Sabouraud Dextrosa	13.00g	0.45g	12.55g
Agua (Control)	0g	0g	0g

El de vaina de judías se utilizó solo para *S. terrestris*. Se formó un pellet más pequeño y homogéneo, donde se aprovechó todo el medio y presentó un incremento micelial significativo. Este fue el que logró la mejor respuesta por la cantidad producida y las características morfológicas de la misma.

En el SNA se observó un crecimiento regular de *Fusarium* sp., pero con una morfología diferente, ya que la consistencia era gomosa y densa, con una coloración blancuzca. El Sabouraud dextrosa produjo una buena cantidad de micelio pero con una morfología heterogénea.

Curvas de crecimiento

De los medios evaluados para *S. terrestris* el compuesto por vaina de judías, fue el que presentó los mayores pesos (fresco y seco) de micelio, además de la mayor cantidad de conidias viables por mililitro (figura 5).

Para *Fusarium* spp el medio compuesto por papa dextrosa comercial fue el que presentó los mayores pesos (fresco y seco) de micelio, además de la mayor cantidad de conidias viables por mililitro (figura 6).

Para facilitar el análisis, en los cuadros 5 y 6 se resumen los resultados obtenidos para los dos patógenos, con los diferentes medios de utilizados.

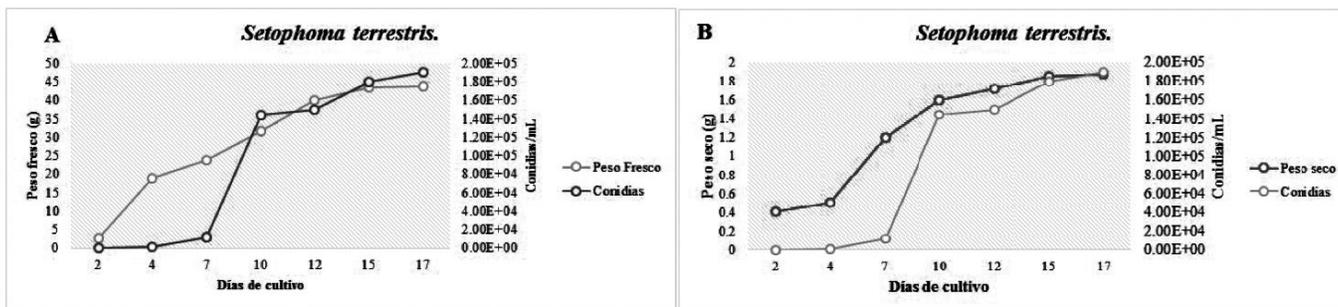


Figura 5. Muestra la relación existente entre el incremento de biomasa (peso fresco A y seco B) y la producción de conidias viables por ml en *Setophoma terrestris*, evaluado en medio vaina de judías.

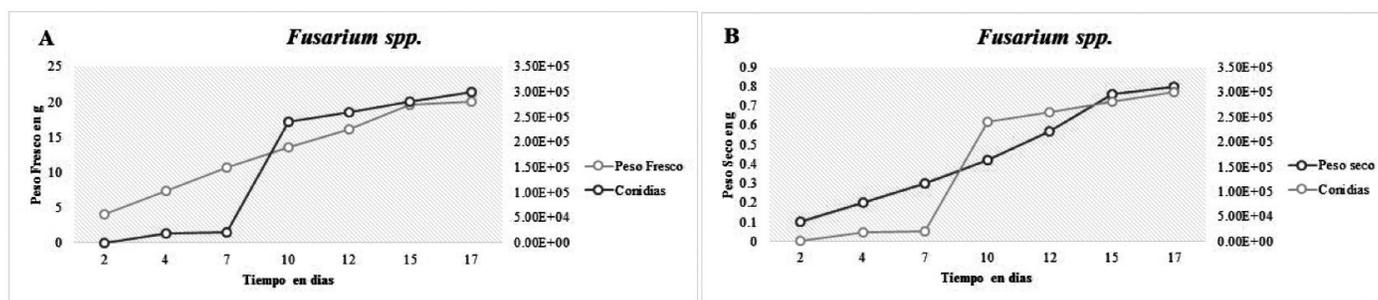


Figura 6. Muestra la relación existente entre el incremento de biomasa (peso fresco A y seco B) y la producción de conidias viables por ml en *Fusarium spp* Evaluado en medio papa dextrosa casero.

Cuadro 5. Resumen de la evaluación de los medios de cultivo utilizados en *Setophoma terrestris*.

Medio	Biomasa obtenida	Inducción de estructuras reproductoras
Vaina de Judías	+++	+++
Papa Dextrosa Casero	+++	++
Papa Dextrosa Comercial	++	++
Avena	+++	+
Extracto Mínimo	++	++
Agua (Control)	0	0

+++ Muy buena respuesta; ++ Buena respuesta; + Poca respuesta; 0 Sin respuesta

Cuadro 6. Resumen de la evaluación de los medios de cultivo utilizados en *Fusarium spp*.

Medio	Biomasa obtenida	Inducción estructuras reproductoras
Papa Dextrosa Casero	+++	+++
Papa Dextrosa Comercial	++	+
Spezieller Nährstoff-Farmer (SNA)	+	++
V8	++	++
Avena	+	+
Sabouraud Dextrosa	++	+
Agua (Control)	0	0

+++ Muy buena respuesta; ++ Buena respuesta; + Poca respuesta; 0 Sin respuesta

Discusión

Optimización de las condiciones de crecimiento

Temperatura

Los seres vivos requieren de un rango de temperatura óptimo para poder desarrollar sus funciones vitales, el cual si disminuye o aumenta puede afectar su sobrevivencia. En hongos, por debajo de la mínima no hay formación de micelio y por encima de la óptima se produce la muerte celular, por lo que es importante conocer el rango en el cual los microorganismos alcanzan la máxima velocidad de crecimiento celular, para lograr los mayores rendimientos. Este factor es uno de los más influyentes en el desarrollo de los fitopatógenos y en la expresión de los síntomas que producen. La óptima para *Fusarium* sp. fue a 30°C y la mejor esporulación se dio entre 24°C-26°C. Estos resultados indican que *Fusarium* sp posee una mayor capacidad para adaptarse a diferentes rangos de temperaturas. Watanabe [7] y Bohórquez & Díaz [8] han demostrado esta capacidad e indican que los daños causados por este patógeno suelen ser mayores en áreas tropicales y subtropicales, aumentando su incidencia en temporadas de lluvia, por las variaciones ambientales que se relacionan con la capacidad de germinación de sus conidios.

La temperatura ambiente (22-24°C) fue la óptima para el desarrollo de *S. terrestris*, siendo más sensible a los cambios de temperatura que *Fusarium* sp., lo que coincide con la literatura y se relaciona con las técnicas que se utilizan para combatirlo, como es la solarización para la desinfección del suelo [2], [9]. Se observa que *S. terrestris* es más susceptible a los cambios producidos por este factor, por lo que su presencia se centraría en ciertos rangos, mientras que *Fusarium* spp., presenta niveles más amplios, por lo que a nivel de agricultura es un fitopatógeno más problemático, con una gran variedad de hospedantes.

pH

Dentro de las características que tiene *Fusarium* sp de adaptarse a diversas condiciones, se muestra como el pH, no incide en la formación de masa micelial (peso fresco) y seco, esto quiere decir que es un hongo con particularidades, que le permiten ajustarse a diferentes condiciones agroambientales, encontrando nichos u hospederos muy variados, en los cuales se puede desarrollar. Este es uno de los más importantes en la agricultura, por los daños que provoca en el sistema radical y vascular de la planta. Se informa que la mayoría de las especies de *Fusarium* spp están capacitadas para crecer entre pH 2 a 9 y en ocasiones superiores. La influencia este factor puede variar dependiendo de la especie [10]. Para *S. terrestris*, el pH del medio es más determinante para el hongo, ya que se puede observar que a pH 4, alcanza la mayor producción de micelio y decae conforme este valor se incrementa [2].

Agitación

Se observó que la velocidad de agitación de 100rpm, es la que produce la mayor cantidad de micelio y disminuyó su producción conforme se incrementó (200rpm), lo cual puede ser consecuencia del estrés oxidativo provocado en las células [11]. Uno de los aspectos más relevantes a tener en cuenta durante el cultivo líquido con estos microorganismos, es la peculiaridad de que desarrollan diversas morfologías. A nivel macroscópico, existen dos tipos de morfología extremas: filamentosas (micelio disperso), o agregados de hifas compactos semiesféricos (pellets). Además existen morfologías intermedias, con formas más o menos agregadas de micelio en suspensión, como se obtuvo en *Fusarium* sp, donde se presentaron masas amorfas [11].

Fotoperiodo

El fotoperiodo puede generar un efecto diferente en los hongos filamentosos y se ha relacionado con la capacidad de inducir esporulación. En *S. terrestris* esto se evidenció notablemente en el tratamiento de luz continua, ya que los pellets obtenidos eran cuantitativamente mayores, en comparación con los sometidos a oscuridad y a luz ambiental. Se observó que la oscuridad favoreció la producción de biomasa pero a nivel cualitativo; la luz continua induce la multiplicación del hongo, lo que se podría explicar porque se promueve una reacción de estrés, que propicia reacciones de supervivencia, como la reproducción. Esta variable física es apropiada cuando se quiere inducir la formación de conidios.

Esta producción es mayor en la oscuridad, por lo que si el objetivo es el crecimiento, es recomendable mantener el cultivo bajo esta condición, que es la natural en que se encuentra el hongo en las raíces de sus hospederos, mientras que si lo que se busca es la multiplicación del patógeno, es preferible inducir un estrés, al exponer el material a una fuente de luz directa continua, lo que concuerda con lo reportado en la literatura [2].

Pruebas con medios de cultivo

Papa dextrosa comercial: es uno de los medios más utilizados, ya que al poseer una composición estandarizada favorece la reproducibilidad de los ensayos. La principal ventaja que presenta en relación con su equivalente casero, es el carácter translúcido, que permite evidenciar el crecimiento y la presencia de alguna contaminación. Este medio presentó una buena respuesta en *S. terrestris* pero no fue el idóneo para *Fusarium* spp.

Papa dextrosa casero: posee los mismos componentes que el medio comercial, pero al ser un extracto, su composición puede variar acorde a la variedad de papa que se utilice, la época del año, la ubicación, las condiciones ambientales y nutricionales. Esto afecta la reproducibilidad del experimento, aunque es favorable al reducir el costo en contraste con el comercial. En *S. terrestris* promovió la morfología de pellets con un acumulo de biomasa considerable. Para *Fusarium* spp. fue con el que se obtuvo mayor producción de micelio.

Avena: además de ser muy nutritivo, posee fosfato monopotásico (KH_2PO_4), que sirve como solución buffer e inductor en la producción de ácidos grasos, vitaminas y enzimas [12]. En *S. terrestris* no existió una relación lineal entre el peso fresco y seco, lo que indica que el tejido se encontraba más hidratado, estaba más extendido y menos denso en contraste con los pellets que se obtuvieron con otros medios. En *Fusarium* sp la respuesta obtenida tampoco fue la óptima.

Vaina de judías: Existe una relación al exponer un hongo fitopatógeno a un extracto de un potencial huésped, como es el frijol (*Phaseolus vulgaris*), donde se da una respuesta inmediata de patogenicidad, en la cual se estimula la producción de estructuras reproductivas para colonizar el medio, esto fue evidente y el incremento significativo de estas estructuras en pellet permite correlacionarlo con un incremento en la producción de picnidios, que a su vez liberan conidios.

SNA: este medio pobre en nutrientes, se utiliza para la identificación y mantenimiento de especies de *Fusarium* sp., porque es capaz de inducir la esporulación y un buen desarrollo de células conidiogénicas, aunque la morfología de las macroconidias obtenidas no fue tan uniforme, a diferencia de la de los microconidios, igualmente muchas especies pueden formar clamidósporas fácilmente [13].

Sabourad dextrosa: utilizado comúnmente, está compuesto de dextrosa como fuente de carbono y digerido enzimático de caseína. Sirve para el aislamiento y mantenimiento de hongos en tubo inclinado. Debido a su composición, los microorganismos crecen exuberantemente. Es

el medio estándar para observar la morfología típica, pero no fue el ideal para biomasa o para estudiar la esporulación.

V8: se encuentra entre los medios orgánicos más recomendados, por la presencia de tomate, espinacas, pepino, pimiento rojo, zanahoria, remolacha, apio y esterol, que estimula la formación de micelio y de las estructuras reproductivas [14]. La respuesta fue buena pero no la mejor.

Curvas de crecimiento

Se estima que la determinación del peso seco del micelio producido en medio líquido puede ser una medida válida de su proliferación, porque el desarrollo de las hifas no se ve restringido en ninguna dirección. En ambos se observó un crecimiento gradual del peso fresco y seco, así como de conidias intensificándose entre los 7 a 10 días de evaluación. Es importante conocer el tiempo en que los hongos incrementan la producción de conidios, si se desea usar como fuente de inóculo para futuros ensayos.

La gran cantidad de conidios viables que produce *Fusarium* spp., cerca de 30.000 /ml, lo convierte en uno de los patógenos más importantes para el sector agrícola.

En cuanto a *S. terrestris* se observó que los tejidos retienen mucha agua, porque al extraer la humedad, disminuyó aproximadamente en 40 g.

Conclusiones

Se propagaron *S. terrestris* y *Fusarium* spp. en medio de cultivo líquido, ambos produjeron diversas estructuras morfológicas, útiles para su identificación, incluidos los pellets. Se concluyó que *Fusarium* sp crece óptimamente a 30°C, pH 6, 100 rpm y oscuridad, mientras que *S. terrestris* lo hace a 28°C, pH 4, 100rpm, oscuridad (biomasa) y luz continúa para inducir la reproducción. *Fusarium* tiene la capacidad de crecer a diversas temperaturas y pH, mientras que *S. terrestris* es más sensible a las variaciones de temperatura y fotoperiodo.

Estos hongos tuvieron la capacidad de crecer en todos los medios de cultivo evaluados, pero para *S. terrestris* se determinó que su crecimiento micelial se favorece en el medio de papa dextrosa casero y su multiplicación en el de vaina de judías. Para *Fusarium* sp, se concluyó que crece significativamente mejor en el de papa dextrosa casero.

Agradecimientos

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión el financiamiento de esta investigación.

Referencias

- [1] Costa Rica-INEC. "VI Censo Nacional Agropecuario: Resultados generales". San José, Costa Rica. 2015.
- [2] E.H. de A. Maranhão and E.A. de A. Maranhão. "Factores que determinan el desarrollo de la Raíz rosada de la cebolla causada por *Pyrenochaeta terrestris*". Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônoma, Recife, vol. 5-6, pp. 264-298. 2009.
- [3] R. Macías-Duarte *et al.*, "Eficiencia de diferentes fungicidas en el control de la pudrición rosada en cebolla". Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, vol. 7, pp.1933-1943, 2016.
- [4] M. Granados. "Principales enfermedades causadas por hongos". En: Problemas fitosanitarios de la cebolla en Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José, pp. 74. 2013.
- [5] K. Retana *et al.*, "Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. Apii asociado a la marchitez del apio en Costa Rica". Agronomía Costarricense, vol. 42, pp. 115-126, 2018.

- [6] M. Flórez *et al.*, “Actividad de α -amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido”. Revista Colombiana de Entomología, vol. 31, pp. 123-126, 2005.
- [7] T. Watanabe. “Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi, Morphologies of cultured fungi and key to species”. CRC Press. 2002.
- [8] L. Bohórquez and Y. Díaz, “Evaluación de Aislamientos de *Fusarium* spp. de diferentes orígenes, frente a factores de crecimiento asociados a patogenicidad”. Tesis. Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2010.
- [9] B. Castellanos *et al.*, “Solarización y abonos verdes para el control integrado de *Pyrenochaeta* (HANSEN) en cebolla”. Bioagro, vol. 25, pp. 65-70. 2013.
- [10] D. López and M. O. López. “Influencia del pH y de los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor diagnóstico de las especies del género *Fusarium* en Cuba”. Fitosanidad, vol. 8, pp. 7-11, 2004.
- [11] M. Trujillo and N. Valverde. “El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados”. _Rev Latinoamericana de Microbiología, vol. 48, pp: 269-280, 2006.
- [12] M. Ronco. “La nutritiva y saludable avena y su aporte de beta glucanos”. Indualimentos, pp: 76-78, 2013.
- [13] I . Herrera and H. Laurentin. “Evaluación de la esporulación de *Fusarium oxysporum* f. spp. *sesami* en dos medios de cultivo y dos metodologías de inoculación en ajonjolí (*Sasamun indicum*)”. Revista Científica UDO Agrícola, vol. 12, pp: 639-643. 2012.
- [14] M. López and Y. Tomás. “Estudio de medios de cultivo sobre el crecimiento lineal y la esporulación de *Phytophthora infestans*”. Fitosanidad, vol. 3, 1999.