

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE LA  
SEMILLA DE ACACIA JAPONESA (*Acacia melanoxylon* R.Br.) LAUREL DE  
CERA (*Morella pubescens* Humb. & Bonpl. Ex Wild. Wilbur) Y ALISO (*Alnus  
acuminata* H.B.K)**

**KATHERINE MORENO G.  
GINA ZAMBRANO B.**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL  
SAN JUAN DE PASTO  
2014**

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE LA  
SEMILLA DE ACACIA JAPONESA (*Acacia melanoxylon* R.Br.) LAUREL DE  
CERA (*Morella pubescens* Humb. & Bonpl. Ex Wild. Wilbur) Y ALISO (*Alnus  
acuminata* H.B.K)**

**KATHERINE MORENO G.  
GINA ZAMBRANO B.**

**Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Ingeniera  
Agroforestal**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO  
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGROFORESTAL  
SAN JUAN DE PASTO  
2014**

## **NOTA DE RESPONSABILIDAD**

Las ideas y conclusiones aportadas en este Trabajo de Grado son Responsabilidad de los autores.

Artículo 1 del Acuerdo No. 324 de octubre 11 de 1966, emanado del honorable Concejo Directivo de la Universidad de Nariño.

Nota de Aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

---

Firma del Presidente del Jurado

---

Firma del Jurado

---

Firma del Jurado

San Juan de Pasto, Agosto de 2014

## CONTENIDO

|                              | <b>Pág.</b> |
|------------------------------|-------------|
| INTRODUCCIÓN.....            | 8           |
| MATERIALES Y MÉTODOS.....    | 10          |
| VARIABLES EVALUADAS .....    | 12          |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... | 14          |
| CONCLUSIONES.....            | 24          |
| BIBLIOGRAFÍA .....           | 25          |

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE LA SEMILLA DE ACACIA JAPONESA (*Acacia melanoxylon* R.Br.) LAUREL DE CERA (*Morella pubescens* Humb. & Bonpl. Ex Wild. Wilbur) Y ALISO (*Alnus acuminata* H.B.K)<sup>1</sup>**

**ISOLATION AND IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI OF JAPANESE ACACIA (*Acacia melanoxylon* R.Br.) LAUREL WAX (*Morella pubescens* Humb. & Bonpl. Former Wild. Wilbur) AND ALDER (*Alnus acuminata* HBK) SEED.**

Katherine Moreno G.<sup>2</sup>

Gina Zambrano B.<sup>2</sup>

Claudia Quiroz O.<sup>3</sup>

**RESUMEN**

La semilla es el principal medio de diseminación de patógenos, por lo tanto cuando se propagan especies arbóreas con simiente contaminada, se presentan enfermedades en pre y pos emergencia de las plántulas. Teniendo en cuenta lo anterior, en el laboratorio de Sanidad Vegetal e invernadero de la Universidad de Nariño, se aislaron e identificaron hongos asociados a la semilla de *Acacia melanoxylon* R.Br., *Morella pubescens* H.&B. Ex Wild. Wilbur y *Alnus acuminata* H.B.K, de procedencia natural y comercial, se evaluó el porcentaje de contaminación de la misma y se comprobó la patogenicidad de los hongos encontrados. La identificación se basó en la metodología de Agrios (1996) y claves taxonómicas de Barnett y Hunter y para evaluar el porcentaje de contaminación se utilizó un diseño irrestrictamente al azar (DIA), en un arreglo factorial 3 x 2, donde el factor A fueron las especies forestales y factor B la procedencia de las semillas, con 6 tratamientos y

---

<sup>1</sup> Artículo presentado a la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Nariño como requisito para optar el título de Ingeniero Agroforestal.

<sup>2</sup> Egresadas, Programa de Ingeniería Agroforestal. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño, 2014; E – Mail: kathe.moreno09@gmail.com, zambrano.91@hotmail.com.

<sup>3</sup> Docente. I. AF. M. Sc. Fitopatología. Programa Ingeniería Agroforestal, Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad de Nariño. Pasto – Colombia. E – Mail: cmqo@hotmail.com

4 repeticiones, siendo la unidad experimental 3 cajas petri (10 semillas/caja Petri), los datos obtenidos fueron sometidos a análisis de varianza y pruebas de comparación de Tukey. Se presentaron diferencias significativas en cuanto a la procedencia de la semilla, encontrándose porcentajes de contaminación superiores al 90% en la obtenida de fuentes naturales; *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Myrothecium* sp., *Trichothecium* sp. y *Paecilomyces* sp. fueron los hongos identificados, comprobándose la patogenicidad de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. como causantes de pudrición en semillas y *Fusarium* sp. como agente causal del Mal del talluelo, con incidencias del 76%, 69 %, 67% para *A. melanoxylo*, *M. pubescens*. y *A. acuminta*, respectivamente.

**Palabras clave:** semillas, hongos, patógenos, contaminación, incidencia.

#### ABSTRACT

The seed is the primary means of spreading pathogens, therefore when tree species contaminated seed spread, diseases occur in pre and post seedling emergence. Considering the above, in the Plant Health Care laboratory and the greenhouse, of the University of Nariño, *Acacia melanoxylo* R.Br., *Morella pubescens* H.&B. former. Wiild Wilbur and *Alnus acuminata* HBK natural and commercial sources seed was evaluated, in order to isolate and identify the fungi present, the contamination rate was evaluated in the same and pathogenicity of fungi found was found. The identification was based on the methodology and taxonomic keys Agrios Barnett and Hunter and to evaluate the percentage of pollution demands unrestrictedly randomized design (DIA) was used in a 3 x 2 factorial arrangement, where the factor A forest species were factor B and the origin of the seeds, with 6 treatments and 4 repetitions, being the experimental unit 3 petri dishes (10 seeds / Petri dish), the data obtained were subjected to analysis of variance and Tukey comparison tests. There were significant differences in terms of seed origin, finding percentages higher than 90% in pollution obtained from natural sources; *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Myrothecium* sp., *Trichothecium* sp. and *Paecilomyces* sp. fungi were identified, proving the pathogenicity of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. to cause seed rot

and *Fusarium* sp. as a causal agent of damping-off, with incidences of 76%, 69%, 67% for *A. melanoxylo*, *M. pubescens*. and *A. acuminta* respectively.

**Keywords:** seeds, fungi, pathogens, pollution incident.

## INTRODUCCIÓN

La calidad de las semillas es un aspecto considerado actualmente como fundamental para garantizar el éxito de la obtención de material vegetal sano. (Arguedas *et al*, 1997). Sin embargo, frecuentemente, los agricultores adquieren semillas de características sanitarias desconocidas, lo que puede incidir negativamente, debido a que normalmente se evalúa el poder germinativo y vigor de la semilla a sembrar, mas no se considera su calidad sanitaria (March, *et al*, 2002.). Los patógenos de las estructuras reproductivas de especies forestales, pueden producir problemas económicamente importantes, ya que afectan su comercialización, destruyen parcial o totalmente los lotes, infectan sustratos de germinación, producen enfermedades y las diseminan de una región a otra (Arguedas y Torres, 1996; Arguedas, 1995).

Las semillas de forestales pueden ser infectadas por microorganismos causantes de enfermedades, cuando aún se encuentran en el árbol, en contacto con el suelo o bien durante su fase de vivero, transporte y almacenamiento (Arguedas *et al*, 1997). En cuanto a germinadores y viveros la enfermedad más común y de más amplia distribución es la llamada el “Mal del talluelo”, se denomina así, al grupo de síntomas producidos por una amplia gama de hongos habitantes del suelo y generalmente parásitos facultativos que se pueden diseminar en semilla y restos de cosecha. Los géneros más importantes son: *Rhizoctonia* sp., *Fusarium* sp., *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Cylindrocladium* sp. y *Botrytis* sp. cada uno de estos géneros producen síntomas característicos, como son la aparición de un necrosamiento en la parte basal del tallo y posterior muerte de la plántula, sin embargo, generalmente actúan varios en forma conjunta, por lo que se recomienda hacer aislamientos de los mismos para realizar un diagnóstico correcto (CONIF, 2002).

En la India se han identificado los géneros *Colletotrichum* sp., *Curvalaria* sp., *Fusarium* sp., y *Phoma* sp. como los principales organismos diseminados por la semillas de *Acacias* spp. (Old, *et al.* 1997), en Costa Rica para la especie *A. acuminata*, se reportan a *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp. como hongos que pueden provocar daños en las semillas (Arguedas y Espinoza, 2007), para *M. pubescens* no se han realizado investigaciones sobre afectación de hongos directamente en semilla, pero si al momento de encontrarse en etapa de vivero, ya que ellos habitan naturalmente en el suelo y causan daño a las plántulas, siendo los más comunes: *Fusarium* sp, *Phytium* sp. y *Rhizoctonia* sp., que ocasionan marchitamiento y estrangulamiento del tallo, síntomas típicos del Mal del Talluelo (Muñoz y Luna, 1999).

Es así, que la mayoría de hongos reportados como patógenos de las especies arbóreas anteriormente mencionadas, se encuentran comúnmente en las listas de hongos asociados a otros forestales como son: *E. grandis*, *Eucaliptus* spp, *Toona ciliata*, (Dayan, 1986). En Cuba se han identificado los principales hongos que afectan a *Pinus tropicalis* Morelet, se informa de 16 géneros de hongos pertenecientes a Deuteromycetes (10), a Ascomycota (1) y Basidiomycota (5). Presentes en semillas se encontraron 8 géneros de hongos: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Memnoniella* sp., *Rhizophus* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Trichoderma* sp. y *Monilia* sp.; en vivero se registraron tres géneros de hongos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Monochaetia* sp.; sobre plantaciones se registró la incidencia de hongos pertenecientes a los géneros *Ceratocytis* sp. y *Ceratocystiopsis* sp., y finalmente en madera se reportó *Pori* sp., *Pleurotus* sp., y *Lentinus* sp. (Guerra, *et al.* 2004.)

De igual manera, Lezcano, *et al.* 2007 en Perú, en las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. detectó nueve géneros fungosos (*Aspergillus* sp. , *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Cladoesporium* sp., *Trichoderma* sp., y *Pestalotia* sp.); identificados como los responsables del deterioro de las semillas.

Por lo tanto, se planteó como objetivo general de este estudio aislar e identificar los principales microorganismos fitopatógenos (hongos) asociados a las semillas *A. melanoxylon*, *M. pubescens* y *A. acuminata*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Sanidad Vegetal – GRISAV, a cargo del Grupo de Investigación de Sanidad Vegetal - GRISAV y en el invernadero, situados en la Universidad de Nariño, ubicada a una altitud de 2474 m, latitud 1° 14' 01,7" y longitud 77° 17' 37.8", sede Torobajo (Fuente: Esta Investigación).

### PRIMERA ETAPA

**Recolección:** Las semillas de las tres especies forestales (acacia, laurel de cera y aliso) se recolectaron de los árboles en pie, con edad aproximada de 4 años, ubicados en las veredas de Botana y el Encano pertenecientes al municipio de Pasto. Se cosechó directamente con la mano de ramas bajas; aumentar la eficiencia, se tiraron las vainas sobre mantas de recolección extendidas en el suelo; se tomaron aproximadamente 300 semillas por cada especie, teniendo en cuenta su madurez fisiológica. Una vez cosechada la semilla se etiquetaron y almacenaron por 10 días en empaques secos con cierre hermético, en el laboratorio de la universidad en condiciones de oscuridad, con poca humedad, y a una temperatura aproximada de 4 °C, para evitar su germinación.

La semilla de procedencia comercial, fue obtenida de una casa distribuidora de semilla certificada, afirmando ser tratada con anti fúngicos, además de reportar un 90 % de pureza.

**Esterilización de las semillas:** Previo a la siembra, se esterilizó las semillas con hipoclorito de sodio al 3 %, durante 3 minutos, seguidamente se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, procedimiento que se realizó con el fin de eliminar cualquier patógeno contaminante del ambiente.

**Siembra de las semillas:** Esta actividad se realizó en cámara de flujo laminar, en condiciones de asepsia, con el fin de minimizar el riesgo de contaminación al momento de la siembra de la simiente de cada especie forestal. Para el aislamiento de los hongos se sembraron un total de 240 semillas por especie, 120 obtenidas comercialmente y 120

recolectadas en campo, se distribuyeron 10 semillas por caja Petri con el medio de cultivo PDA, se tomó cada una de las semillas con una pinza esterilizada al calor y se la sembró en el medio de cultivo. Una vez sembradas las semillas en cada caja Petri, se llevaron a una incubadora por 15 días, a una temperatura de 20 °C (Noelting *et al.*, 2004; Besnier, 1990), con el fin de facilitar el desarrollo de los microorganismos.

**Purificación:** Una vez desarrolladas las colonias de hongos después del periodo de incubación, se procedió hacer la purificación de los mismos de acuerdo a la metodología descrita por Castaño (1998), según la cual, se toman partes del cultivo y se transfieren a cajas de Petri con medio de cultivo Sabouraud para el crecimiento de hongos. Procedimiento que se realizó por triplicado, para lograr una purificación adecuada de los hongos ayudando en su identificación y caracterización.

**Identificación:** para la identificación de los hongos, se empleó la metodología descrita por Agrios (1996) y Obreque (2004), para lo cual, se colocó una gota de azul de lactofenol sobre un portaobjetos y se añadió parte del micelio con el fin de identificar las estructuras reproductivas características de cada especie, se realizaron observaciones al microscopio con objetivo 40X.

La identificación se hizo teniendo en cuenta las características macro y microscópicas de los hongos y las claves taxonómicas internacionales de Barnett y Hunter, (1972).

## **SEGUNDA ETAPA**

**Pruebas de Patogenicidad:** La evaluación de la patogenicidad se realizó con tres géneros de hongos (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp.) siendo los más representativos, y los de mayor presencia en las tres especies evaluadas. Estas pruebas se realizaron con el fin de comprobar mediante los postulados de Koch, que estos microorganismos fueron los causantes de enfermedades tanto a la semilla como en el germinador.

**Preparación del material a inocular:** Previo a la inoculación, las semillas fueron sometidas a la escarificación mecánica y aplicación de ácido Giberélico (40 ml a 100 ppm) como tratamientos pre germinativos, para facilitar así su germinación, posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 3% según lo descrito por Castaño (1998), en cuanto al sustrato se utilizaron 2 kilogramos de turba, la cual fue desinfectada con agua hirviendo para eliminar así cualquier contaminación del ambiente. Se utilizaron 50 semillas para inocular y 25 como testigo.

**Preparación de Inóculo:** Para preparar el inóculo, se realizó un raspado de las esporas y micelio de los cultivos puros de los hongos a evaluar; se mezcló con 40 ml de agua destilada estéril, se agitó y se aplicó Tween 80 para facilitar la dispersión de esporas y su respectivo conteo. Posteriormente se tomó 1 ml del inóculo y se realizó el recuento de las esporas en cámara Neubauer, obteniendo una suspensión a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml de agua. (Castaño y del Rio, 1997; Hartung *et al.*, 1981).

**Inoculación:** Para los géneros de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. la inoculación se realizó directamente a las semillas en cámara húmeda, tal como lo describe Madia (1994), para *Fusarium* sp. se efectuó en el momento de la siembra, tanto en las semilla como en el sustrato, en un ambiente de alta humedad por el método de aspersión.

## VARIABLES EVALUADAS

**Porcentaje de semilla contaminada:** Se registró el número de semillas contaminadas en cada tratamiento, el porcentaje de contaminación se obtuvo mediante la fórmula (Pabón y Castaño, 2012):

$$\text{Contaminación (\%)} = \frac{\text{Semillas contaminadas por tratamiento} \times 100}{\text{Número total de semillas por tratamiento}}$$

**Porcentaje de germinación:** Se realizó para *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. por ser los géneros de mayor presencia en esta investigación y ser reportados como inhibidores de la germinación, para esto, se registró el número de semillas germinadas por cada especie y se determinó el porcentaje de germinación mediante la fórmula (Pabón y Castaño, 2012):

$$\text{Germinación (\%)} = \frac{\text{Semillas germinadas por especie} \times 100}{\text{Número total de semillas por especie}}$$

**Incidencia de la enfermedad:** Se determinó solo para el género *Fusarium* sp, registrando el número de plántulas afectadas en cada especie forestal, el porcentaje de incidencia se obtuvo mediante la fórmula (Pabón y Castaño, 2012):

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Plantulas afectadas por especie} \times 100}{\text{Número total de plantulas por especies}}$$

**Análisis estadístico:** Se empleó un diseño irrestrictamente al azar (DIA) en un arreglo factorial 3 x 2, donde el factor A hace referencia a las especies forestales y el factor B la procedencia de las semillas (Comercial y Natural) para un total de 6 tratamientos con 4 repeticiones y 24 unidades experimentales, siendo el T<sub>1</sub>: Acacia comercial, T<sub>2</sub>: Acacia natural, T<sub>3</sub>: Laurel comercial, T<sub>4</sub>: Laurel Natural, T<sub>5</sub>: Aliso Comercial y T<sub>6</sub>: Aliso Natural. En el análisis estadístico, para determinar el porcentaje de contaminación de semillas, se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias de Tukey al 5% de probabilidad, con ayuda de InfoStat software estadístico, versión 2013; para determinar el porcentaje de contaminación de semillas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

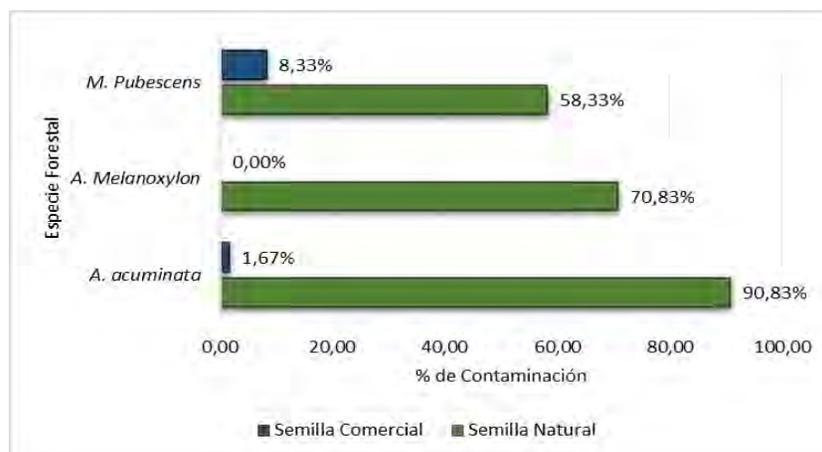
El análisis de varianza indicó diferencias significativas con un ( $p = 0.0005$ ) para la interacción especie x tipo de semilla, siendo las semillas de *A. acuminata* de procedencia natural, las que presentaron el mayor porcentaje de contaminación con un 90.83%, seguidas de *A. melanoxylon* 70.83% y *M. pubescens* 58,33%. Los porcentajes más bajos de semilla contaminada, se presentaron en la semilla de procedencia comercial, encontrándose a *M. pubescens* y *A. acuminata* con el 8.33% y 1,67% respectivamente; en cuanto a *A. melanoxylon* no presentó ningún tipo de contaminante (Figura 1). Duarte *et al.*, (2000), afirman que las semillas de varias coníferas y latifoliadas son propensas a los ataques por hongos, aunque la patogenicidad de muchos de ellos ha sido muy debatida, debido a que algunos hongos se desarrollan sobre la superficie y otros causan infecciones internas.

En cuanto a los porcentajes obtenidos para las semillas de *A. acuminata* de procedencia natural, se debe a las características de sus frutos, los cuales tienen una apariencia similar a una diminuta piña de Pino, llevando en su interior decena de semillas pequeñas y con alas aplanadas; por la falta de uniformidad tanto de frutos como de semillas se facilita la adhesión de esporas de hongos a sus superficies desiguales (Arguedas y Espinoza, 2007).

Las semillas de *A. melanoxylon* de procedencia natural, presentaron un porcentaje considerable de contaminación, debido a la presencia de una arilo de tonalidad rosa pálido que se desprende de la semilla, Mittal *et al.*, (1990) afirman que dicho arilo es característico de las diferentes especies de acacias, convirtiéndose en un albergue para el crecimiento de distintos tipos de patógenos.

En el caso de las semillas *M. pubences* de procedencia natural, presentaron una baja contaminación, posiblemente a la presencia de ceras, las cuales son consideradas como un mecanismo de defensa estructural que se presenta en plantas de algunas especies, con el fin de repeler el ataque de microorganismos (Agrios 1996).

**Figura 1.** Porcentaje de semilla contaminada por patógenos



**Fuente:** Esta investigación

En cuanto a la procedencia de la semilla, se encontró diferencias significativas con un ( $p = < 0.0001$ ), entre la semilla de procedencia natural y comercial, identificándose mayores porcentaje de contaminación en la simiente obtenida naturalmente. Por lo general en la cotidianidad, no se tienen claramente establecidas las características deseables de los árboles donde se recolectaran semillas para la obtención de material vegetal, los cuales deben ser grandes, con frutos bien formados, buen tamaño de las hojas y fitosanitariamente sanos, lo que si ocurre en semilla proveniente de semilleros certificados o autorizados para la distribución de la misma. Actualmente la calidad sanitaria de la simiente de especies forestales, es una de las características a tener en cuenta, debido a las afecciones que algunos hongos les causan, llevando incluso a pérdidas considerables tanto de semillas como de plántulas. Mittal *et al.*, (1990), afirman que el deterioro de semillas de árboles causado por hongos implica problemas que difieren en varios aspectos, por ejemplo las semillas están expuestas a diversas condiciones antes del almacenamiento, con frecuencia se recolectan semillas y se guardan en puntos de recolección o plantas de procesamiento por diversos periodos de tiempo bajo condiciones que favorecen el desarrollo de hongos antes de su utilización.

Por el contrario las semillas procedentes de la casa comercial, presentaron bajos niveles de contaminación por provenir de rodales semilleros, los cuales se encuentran en condiciones

controladas, además del tratamiento anti-fúngico a las que son sometidas. Mesen *et al.*, (1996), afirman que los rodales semilleros se forman por la selección de pies para la producción de semillas, siendo estos vigorosos, sanos y bien conformados, además se aplican fertilizantes para incrementar la cosecha y se atiende a la cubierta del suelo en la forma más conveniente.

### **Identificación de hongos**

Según las características macro y microscópicas de los hongos, se identificaron 6 géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Trichothecium* sp., *Paecilomyces* sp. y *Myrothecium* sp., siendo los de mayor presencia en las semillas de las tres especies forestales evaluadas, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., se identificaron sólo en las especies de *M. pubescens* y *A. melanoxylo*.

Las características macro y microscópicas de los hongos enumerados a continuación, coinciden con las características de los hongos encontrados en esta investigación, como se puede evidenciar en las figuras 2 y 3.

La principal característica macroscópica para la identificación del género *Aspergillus* sp. (Figura 2. a, a.1), es la coloración del micelio ya que al inicio de su crecimiento se observó una coloración blanca, posteriormente tomo un color oscuro, en cuanto a las características microscópicas se observó cabezas conidiales presentan cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutos alfileres sobre el substrato lo cual coincide por lo reportado por (Kozakiewicz, 1989).

Según Pitt (1980), el género *Penicillium* sp., (Figura 2. b, b.1), se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina con células conidiogénicas llamadas fiálides, las colonias de este género son circulares si no hay impedimento alguno para su crecimiento, mostrando el color del micelio, el cual es

generalmente blanco al inicio de su crecimiento, y tornándose verde a medida que ha madurado.

La forma y tamaño de las esporas es la característica principal para el reconocimiento del género *Fusarium* sp. (Figura 2. c, c.1), las esporas están dispersas en el micelio aéreo o en esporoquios o masas limosas (pionotos). Los macroconidios son curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda y en muchas especies con una célula basal en forma de pie. Las colonias de los distintos fusarios crecen en forma circular, sus color característico es el purpura o blanco y la textura del micelio es algodonosa. (Seifert, 2001).

**Figura 2.** Características macro y microscópicas de **a., a.1.** *Aspergillus* sp. **b., b.1.** *Penicillium* sp. **c., c.1.** *Fusarium* sp.

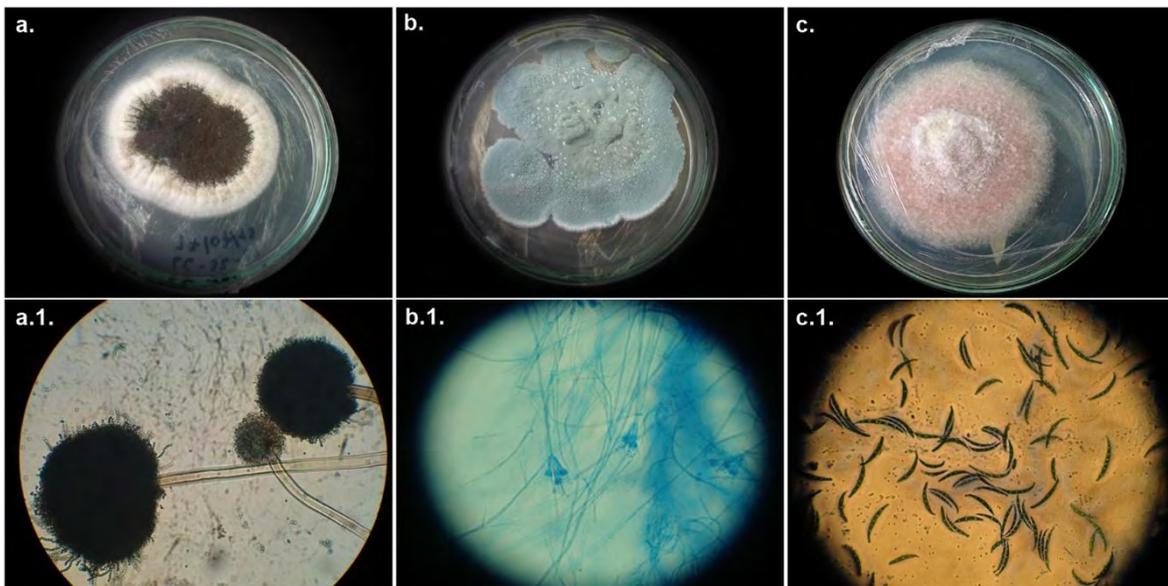


Foto: Moreno y Zambrano 2014

Con respecto a *Trichothecium* sp. (Figura 3. d, d.1), Sutton, Fothergill, y Rinaldi (1998) indican que, esta especie es un hongo filamentososo. Las colonias son planas, granuladas y polvosas, en el anverso, el color es blanco. Microscópicamente presenta hifas hialinas septadas, conidióforos y conidios visibles, siendo de dos células, suaves, de paredes

ligeramente gruesas, van de ligeramente coloreado a hialino con forma de pera, su punto de unión al conidióforo es prominentemente truncado.

En el género *Paecilomyces* sp. (Figura 3. e, e.1), se observar una red enredada de hifas aéreas que le dan textura a las colonias un poco lanosa o extremadamente algodonosa, la mayoría de las especies son de color blanco, o ligeramente coloreadas cuando el desarrollo de conidios es máximo, los conidióforos son formados en el extremo de la fialide y se agrupan normalmente en largas cadenas, estos son hialinos. Algunas especies tienden a producir colonias húmedas y cremosas, sobre todo en las etapas tempranas de crecimiento (Brown y Smith, 1957).

Por último, el género *Myrothecium* sp., (Figura 3. e, e.1), presenta esporodoquios en forma de colchón, algunas veces con setas hialinas marginales, conidióforos subhialinos o coloreados, repetidamente ramificados que producen conidias apicales subhialinas a oscuras unicelulares, ovoides a elongadas (Barnett y Hunter, 1972).

**Figura 3.** Características macro y microscópicas **d., d.1.** *Trichothecium* sp. **e., e.1.**

*Paecilomyces* sp. **f., f.1.** *Myrothecium* sp.

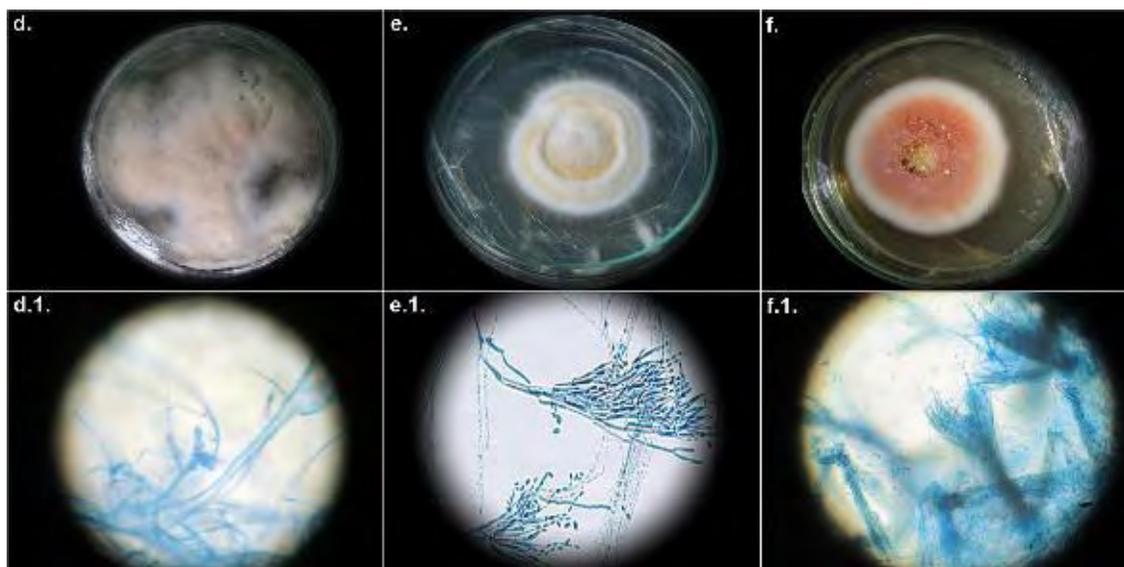


Foto: Moreno y Zambrano 2014

Según ésta investigación los hongos con mayor frecuencia en las tres especies forestales fueron *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., tanto en semillas natural como comercial, coincidiendo con la información que brindan Lezcano *et al.*, (2007) acerca de la micobiota de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv en Perú, donde *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* sp. y *Chaetomium* sp. atacaron a las semillas ortodoxas durante el almacenamiento. De igual manera Pérez *et al.*, (2005) en México, aislaron doce géneros fungosos en *Eucalyptus grandis* Hill: Maid, reportando en semilla los géneros *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Cladosporium* sp. y *Penicillium* sp.

Además de los resultados reportados por Zunini y Orrego (2013), quienes identificaron en semilla de *Toona ciliata* los géneros *Fusarium* sp. *Phomopsis* sp, *Aspergillus* sp., *Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Alternaria* sp. y *Curvularia* sp., resultados que coinciden con lo mencionado por Lazarotto *et al.* (2012), quienes trabajando con la sanidad, transmisión vía semilla y patogenicidad de hongos en semillas de *Cedrella fissillis*, identificaron los mismos géneros, además de *Pestalotia* sp. y *Rhizoctonia* sp.

Sweet (2009), reporta que la presencia de hongos como *Aspergillus* sp., al parecer depende del mal manejo que se le realiza a la semilla después de la cosecha y en el almacenamiento. Mittal y Sahrma (1980), afirma que la colonización de forma explosiva de *Aspergillus* sp. se origina cuando la humedad relativa esta sobre el 70%, desencadenando un fenómeno de brotación, de igual manera Carrillo (2003), reporta que la ubicuidad de *Aspergillus* sp. se debe a la capacidad para crecer a diferentes temperaturas sobre sustratos con diferentes contenidos de humedad.

Con respecto a *Penicillium* sp, Carrillo (2003), afirma que la mayor esporulación de este hongo ocurre en los depósitos, donde se mantienen las esporas desde una cosecha anterior, esto se corrobora con lo dicho por Martínez (2003), quien afirma que se puede aislar este patógeno de granos recién cosechados, indicando que el hongo se desarrolla en condiciones de campo.

En cuanto al género *Fusarium* sp, se presentó en la especie *A. melanoxylon* de tipo natural y en *M. pubensces*, tanto en natural como en comercial, concordando con lo reportado por Guerra *et al.*, (2004), donde las principales afectaciones en las semillas de *Pinus tropicalis* Morelet en el país de Cuba, son causadas por este género.

*Fusarium* sp., es un habitante del suelo, capaz de sobrevivir en residuos vegetales por muchos años bajo condiciones adversas, su presencia puede atribuirse al contacto de las semillas con el suelo o recipientes de cosecha contaminados por el hongo, el cual encuentra allí las condiciones ambientales adecuadas para reproducirse (Vieira *et al.*, 2003).

Referente a los géneros *Paecilomyces* sp. y *Myrothecium* sp. su incidencia fue mínima identificándose solo en la especie de *M. pubensces* de procedencia natural, el género *Trichothecium* sp. se aisló e identificó tanto para *M. pubensces* como para *A. melanoxylon*. Mittal, Anderson y Mathur, (1990), afirman que estos géneros de hongos se consideran saprofitos. Gibson (1957), encontró que las especies extremadamente comunes y numerosas de hongos de moho entre estas *Trichothecium* sp., coloniza la superficies de bellotas de *Quercus* o entra a los tejidos de la superficie sin causar la pérdida de germinabilidad de las bellotas.

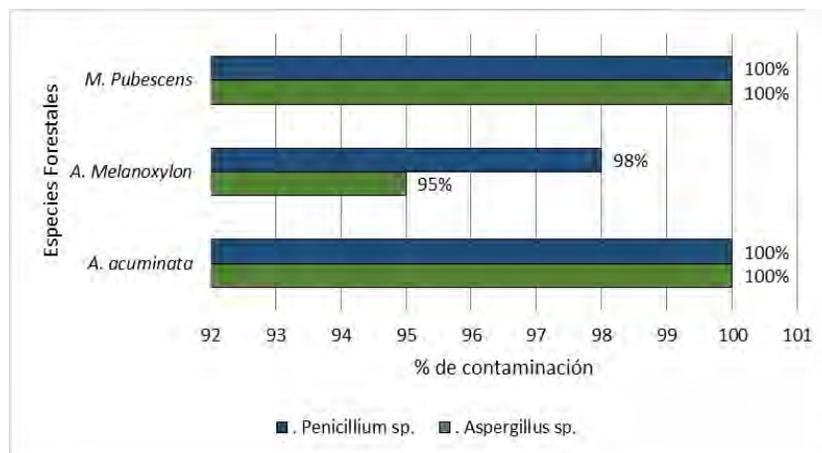
### **Pruebas de Patogenicidad**

Para comprobar la patogenicidad de los hongos encontrados se utilizaron cultivos de *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. por ser los tres géneros reportados como hongos fitopatógenos en especies forestales (Duarte *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2004; Pérez, 2005; Lezcano *et al.*, 2007; Muñoz *et al.*, 2007), además por ser los mayor incidencia en esta investigación. De igual manera se tomó en cuenta lo reportado por Moreno (1988), quien afirma que las semillas son infectadas por diversos tipos de hongos en el campo, entre ellos *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. y *Helminthosporium* sp., por otra parte, las semillas también son invadidas por hongos de este tipo, siendo *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp. los principales géneros.

Como resultados de las pruebas de patogenicidad con *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp., se encontraron altos grados de contaminación y deterioro de las semillas de las tres especies forestales, observándose la presencia de micelio característico de estas especies y hallándose una afectación del 95% y 98% de la semilla de *A. melanoxyton* con *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp respectivamente (Figura 4).

Para *M. pubensces* y *A. acuminata* se encontró el 100% de semilla afectada con los géneros *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp ( Figura 5), lo cual coincide con lo reportado Gibson (1957), quien encontró que los hongos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rizohpus* sp. de la microflora de la testa podrían, bajo condiciones favorables, invadir los tejidos de las semillas germinantes inhibiendo el desarrollo de *Pinus patula* . De igual manera Carrillo (2003), afirma que *Aspergillus* sp. produce la inhibición de la germinación junto con cambios en el color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente podredumbre de las semillas

**Figura 4.** Porcentaje de contaminación de semillas inoculadas con *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.



**Fuente:** Esta investigación

**Figura 5.** Semillas inoculadas con *Aspergillus* sp. **a.** *A. melanoxyton* **b.** *A. acuminata* **c.** *M. pubensces*. Con *Penicillium* sp. **d.** *A. melanoxyton* **e.** *A. acuminata* **f.** *M. pubensces*

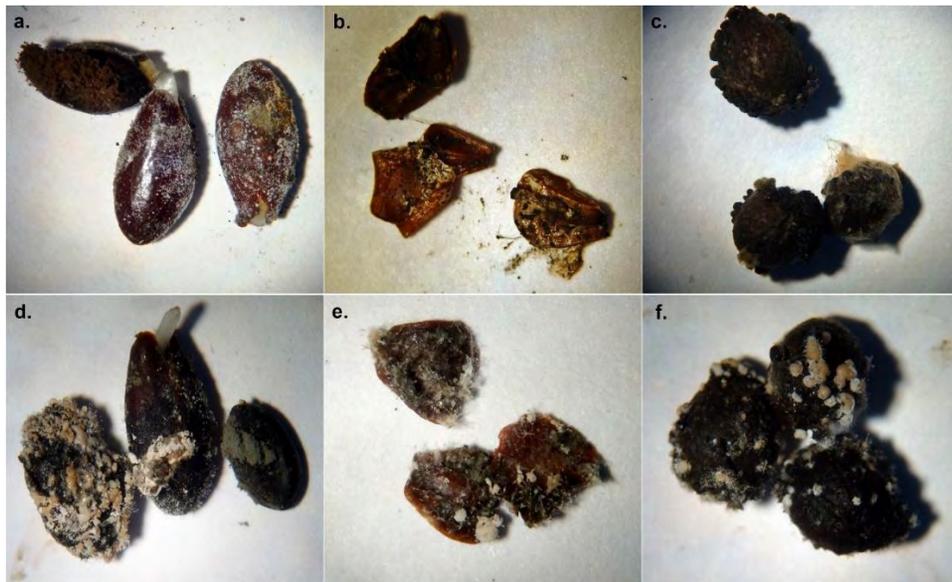
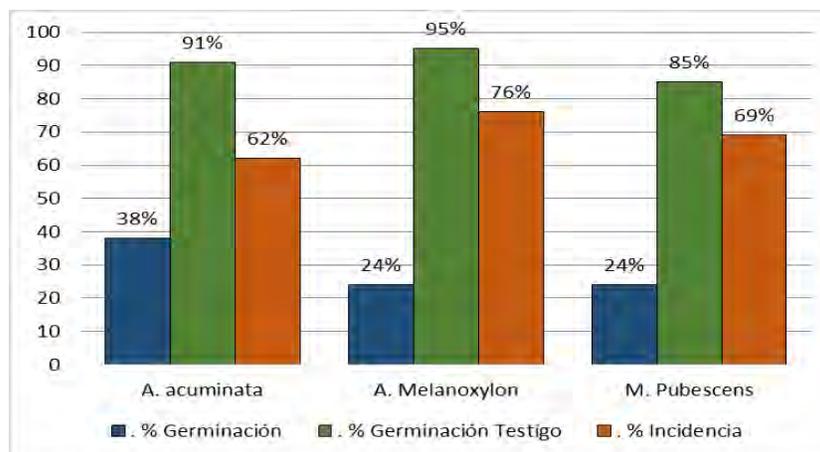


Foto: Moreno y Zambrano 2014

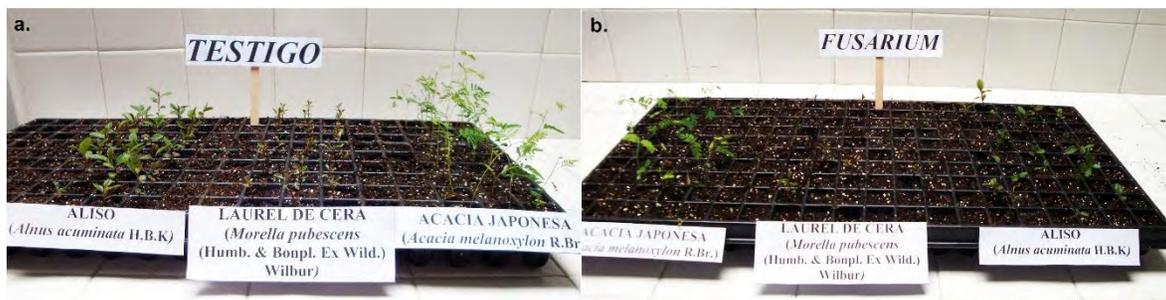
En cuanto al porcentaje de germinación evaluado en la semilla inoculada por *Fusarium* sp, se obtuvo un 24% de germinación para *A. melanoxylon* y *M. pubescens* y en *A. acuminata* un 38% (Figura 6), por el contrario los testigos correspondientes a cada una de las especies forestales evaluadas alcanzaron el 95, 85 y 91% de germinación en *A. melanoxylon* y *M. pubescens* y en *A. acuminata* respectivamente (Figura 7), permitiendo afirmar así, que *Fusarium* sp. afecta directamente la germinación de las tres especies, generando una cubierta en la superficie de las semillas, que impide su germinación (Neegaard, 1979).

Figura 6. Porcentaje de germinación e incidencia de *Fusarium* sp. en plántulas



Fuente: Esta investigación

**Figura 7.** Pruebas de patogenicidad con *Fusarium* sp. **a.** Testigo **b.** Incidencia del patógeno



**Foto:** Moreno y Zambrano 2014

Con respecto a la incidencia de la enfermedad en este caso el Mal del Talluelo, ocasionado por *Fusarium* sp., los resultados fueron: para *A. melanoxylon* del 76%, *M. pubescens* del 69% y para *A. acuminata* del 67% (Figura 6). Solano y Brenes (2012), reportan a *Fusarium* sp., como uno de los hongos que más se presenta en campo y ser el principal causante del Mal del Talluelo en la etapa temprana de muchas especies, influyendo negativamente en el crecimiento y desarrollo de las plántulas.

En *A. melanoxylon* se observó el volcamiento de algunas plántulas, además de un necrosamiento en la parte basal del tallo, síntomas evidentes del Mal de Talluelo en post-emergencia, lo que coincide con lo investigado por Pawuk (1978), quien aisló el género *Fusarium* sp. de semillas de *Pinus patula*, el cual disminuyó significativamente la germinación y aumentó el porcentaje de la enfermedad, de igual manera Saxena (1985), detectó 30 especies de hongos en las semillas *E. grandis* y relacionó la mortandad de las plántulas a la micoflora de las semillas y Michail *et al*, (1986), informaron sobre la enfermedad de los almácigos o Mal del Talluelo de post-emergencia de *Eucalyptus* spp. causada por este género de hongos.

Salas (2002), afirma que el *Fusarium* sp. resulta el principal causante del Mal de Talluelo. Se trata de un parásito facultativo que habita en el suelo, compuesto por un micelio septado, con desarrollo de clamidosporas y una multitud de conidios, el cual produce un crecimiento algodonoso blanco sobre los tejidos afectados. El hongo sobrevive en materia en

descomposición en forma de micelio o clamidosporas. Entre los síntomas característicos de infecciones causadas por este patógeno, y que lo diferencia de otros, es que se observa una coloración rojiza en los tejidos dañados o el oscurecimiento en los tejidos internos del tallo.

En cuanto a de *M. pubensces* y *A. acuminata* se encontró que las semillas no germinadas estaban cubiertas por un halo blanco, siendo otro síntoma evidentes de fitopatologías causadas por *Fusarium* sp. Según Giachino *et al.*, (2004), la enfermedad se evidencia fácilmente como un desarrollo micelial algodonoso de colores rosa claro, amarillento o blanco cuando la muestra está expuesta a condiciones de alta humedad mayores al 80% y temperaturas de 25 °C

La aplicación de los postulados de Koch permitieron corroborar que los hongos *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., aislados de semillas de *A. melanoxylon*, *M. pubensces* y *A. acuminata* e inoculados en semillas de las mismas especies inhibieron la germinación de semillas, con relación a *Fusarium* sp., que presento las misma inhibición además de reproducir los síntomas de la enfermedad conocida como el “Mal del talluelo”.

Benetti *et al.*, (2009) también verificaron la patogenicidad de *Fusarium* sp. aislados de semillas *Toona ciliata*, mostrando la asociación patogénica de este hongo y coincidiendo con los resultados de esta investigación.

## CONCLUSIONES

Los porcentajes de mayor contaminación por hongos se presentaron en las semillas provenientes de fuentes naturales, ya sea para *A. melanoxylon*, *M. pubensces*, y *A. acuminata*, comprobándose así que las semillas de estas especies forestales son un medio para la diseminación de microorganismos fitopatógenos bien sea en campo o en condiciones de almacenamiento.

Los hongos identificados en la simiente de las tres especies arbóreas, obtenidas ya sea de fuentes naturales o en casa comercial, corresponden a los géneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Fusarium* sp., *Myrothecium* sp., *Trichotecium* sp. y *Paecilomyces* sp., evidenciando la ubicuidad de estos microorganismos, los cuales una vez depositados sobre un huésped susceptible y bajo condiciones ambientales favorables causan enfermedad.

Se comprobó, la patogenicidad de *Fusarium* sp., identificándose como el agente causal del Mal del talluelo en *A. melanoxylon*, e inhibidor de la germinación de *M. pubensces* y *A. acuminata*, además del deterioro de las semillas en condiciones de almacenamiento en *A. melanoxylon*., *M. pubensces* y *A. acuminata* debido al efecto de *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., los cuales disminuyeron significativamente la viabilidad y germinación de las mismas.

#### **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por su eterno amor, a nuestras familias por su apoyo incondicional, a nuestra directora de Tesis *Claudia Milena Quiroz Ojeda*, Docente, I AF, Facultad de Ciencias Agrícolas, a nuestros Jurados, *Luis Alfredo Molina Valero* y *Hugo Ferney Leonel*, de igual manera a *German Chávez* y *Marino Rodríguez*, docentes de la Facultad de Ciencias Agrícolas, por su ayuda en el desarrollo de este trabajo, y a todos nuestros amigos y demás personas que nos brindaron su apoyo, colaboración y acompañamiento en este proceso.

#### **BIBLIOGRAFÍA**

AGRIOS, G. 1996. Fitopatología. 2º Edición, Madrid, Noriega Editores. 530 p.

ARGUEDAS, M. 1995. Enfermedades forestales en Costa Rica ITCR. Serie de apoyo académico N° 19. Cartago. Costa Rica. 5 p.

ARGUEDAS, M., & ESPINOZA, D. 2007. Problemas fitosanitarios del Jaúl (*Alnus acuminata* Kunth) en Costa Rica. Revista Forestal Mesoamericana Kurú, 4(10), pág.-32 – 41.

ARGUEDAS, M.; JIMENEZ, M. y MILLER, C. 1997. Microorganismos asociados a semillas de especies forestales en Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Ingeniería Forestal. 4 p.

ARGUEDAS, M. y TORRES, G. 1996. Problemas fitosanitarios en semillas forestales. N° 11. ITCR-CIT. Cartago. 8p.

BARNETT, H. y HUNTER, B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. APS Press, St. Paul, Minnesota. 30pag.

BENETTI, S., SANTOS, A., SOUZA, D. 2009. Levantamento de Fungos em semestres de Cedro e avaliação da patogenicidade de *Fusarium* sp. y *Pestalotia* sp. (en línea). Consultado 19 de agosto 2014. Disponible en: [www.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/9](http://www.cnpf.embrapa.br/pfb/index.php/pfb/article/view/9).

BESNIER, R. 1990. Semillas, Biología y Tecnología. España: Ediciones Mundi- Prensa.

BROWN, A., SMITH, G. 1957. The genus *Paecilomyces* bairnes and its perfect stage *Byssochlamys westling*. Transactions of the british mycological society 40.

CARRILLO, L. 2003. Los hongos de los alimentos y forrajes, Mohos y micotoxinas. Editorial Universidad Nacional de Salta, Argentina. p. 128.

CASTAÑO, J., DEL RIO L. 1997 Manual para el diagnóstico de hongos, bacterias, virus y nematodos fitopatógenos. 1ed. Manizales: Centro Editorial Universidad de Caldas, Zamorano Academic Press, 210 p.

CASTAÑO, J. 1998. Detección de microorganismos en semillas y tratamiento químico de semillas. En: Prácticas de Laboratorio de Fitopatología. Segunda edición. Manizales:

Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Fitotecnia-Escuela Agrícola Panamericana. Departamento de Protección Vegetal. pág. 79-80.

CONIF. 2002. Manual de viveros forestales. Bogotá. pág. 79.

DAYAN, M. 1986. Fungi associated with different forest tree seeds of the Forest Research Institute Seed Bank. Embryon. 2: pág. 28 – 39.

DUARTE, A., ALONSO, M., PÉREZ, P. 2000. Investigación preliminar sobre el aislamiento e identificación de microorganismos en semillas de *Pinus tropicalis* Morelet, Revista Forestal Baracoa, La Habana.

GIACHINO, V., GALLY, T., PANTUSO, F. 2004. Evaluación de ensayos de vigor en semillas de soja de distinta calidad y su correlación con la emergencia a campo. JORNACITI. 31 pág.

GIBSON, I. 1957. Saprophytic fungi as destroyers of germinating pine seeds. The East African Agricultural Journal. pag. 203-206.

GUERRA, C., CRUZ, H., VILA, I., DURATE, A., LOPEZ, M. 2004. Principales hongos que afectan a *Pinus tropicales* Morelet en Cuba. Fitosanidad, Vol 8, Num. 2, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Cuba.

HARTUNG, J.S.; BURTON, C.L. y RAMSDELL. 1981. Epidemiological studies of blueberry anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. En: Phytopathology. No. 71. pag. 449-453.

KOZAKIEWICZ, Z. 1989. *Aspergillus* species on stored products. CAB International Mycological Institute, Kew, Surrey.

LAZAROTTO, M. BRIHNO, M., BELTRAME, M., SANTOS, A., MACIEL, C., LONGHI, S. 2012. Sanidade, transmisshno via semente e patogenicidade de fungos em sementes de *Cedrella Fissilis* procedentes da regihno sul do Brasil. (en línea). Ciencia Florestal, Santa María. Consultado el 18 de Agos 2014. Disponible en: <http://cascavel.ufsm.br/revistas/ojs-2.2.2/index.php/cienciaflorestal/article/view/6617/4056>

LEZCANO, J.; NAVARRO, M.; GONZÁLEZ Y. y ALONSO, O. 2007. Determinación de la calidad de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas al ambiente. Pastos y Forrajes v.30 n.1 Matanzas. Central España Republicana, Matanzas, Cuba.

MADIA, M. 1994. Identificación de la patogenicidad de hongos hallados en semillas de *Lotus spp.* en Argentina. Cátedra de Fitopatología, Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Argentina.

MARCH, G., MARINELLI, A., ODDINO, C., KEARNEY, M. 2002. Evaluación de fungicidas “Curasemillas”. Campaña Agrícola. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal. Syngenta. Argentina.

MARTÍNEZ, E. 2003. Estudio de especies micotoxígenas del género *Penicillium*: *Penicillium verrucosum* Dierckx. Tesis de doctorado. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Madrid.

MESEN, F., GUEVARA, A., JIMENEZ, M., 1996. Guía técnica para la producción de semilla forestal certificada y autorizada. Centro Tropical y Enseñanza Oficial Nacional de Semillas. Turrialba, Costa Rica.

MICHAIL, S; EL-SAYED, A; SALEM, M. 1986. Fusarium post-emergence damping-off of Eucalyptus and its control measures in Egypt. Acta Phytopathologica et Entomologica Hum-garica. pag. 127 – 133.

MITTAL, R., ANDERSON, R., S. B. MATHUR, S. 1990. Microorganisms Associated with Tree Seeds, World Checklist 1990, Patrawa National Forestry Institute.

MITTAL, R., SHARMA, M. 1980. Chemical control of *Aspergillus niger* on the seeds of *Shorea robusta*. Indian Phytopathology pag. 597-598

MORENO, M. 1988. Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados. México DF, Universidad Nacional Autónoma de México

MUÑOZ, J., & LUNA, C. 1999. Guía para el cultivo, aprovechamiento y conservación del laurel de cera, *Myrica pubescens* H. & B. ex Willdenow (Vol. 13). Convenio Andrés Bello.

MUÑOZ, C., PÉREZ, V., COBOS, P., HERNÁNDEZ, R., SÁNCHEZ, G. y MONTOYA, R. 2007. Sanidad forestal: Guía en imágenes de plagas, enfermedades y otros agentes presentes en los bosques. Ministerio de Medio Ambiente Dirección General para la Biodiversidad. Madrid. 574 pag.

NEERGAARD, P., 1979. Seed Pathology. Vol I.II. The MacMillan Press LTD. London And Basinstoke.

NOELTING, M.; SANDOVAL, M.; ABBIATI, N. 2004. Determinación de microorganismos fúngicos en semillas de Amarantho (*Amaranthus spp.*) mediante diferentes métodos de análisis. Buenos Aires: Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

OBREQUE, M. 2004. Evaluación de Aplicaciones Preinfección del fungicida Benomilo y del Biocontrolador *Trichoderma harzianum* en el Control de *Fusarium* sp. En Proteaceas. Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Talca. Talca Chile.

OLD, K.; HOOD, I.; YUAN, Z. 1997. Diseases of tropical acacias in Australia. In: OLD, K.; LEE, S.; SHARMA, J., eds. Diseases of tropical acacias: Proceedings of an international workshop. 1996. Indonesia: CIFOR Sepecial Publication. pag 62 – 69.

PABÓN, J., CASTAÑO, J. 2012. Identificación de Hogos y Bacterias en granos de Arveja (*Pisum sativum* LINNEO). Tesis de Magister. Programa de maestría en Fitopatología. Facultad de ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Manizales Caldas.

PAWUK, W.H. 1978. Damping-off of container grown long leaf pine seedlings by seed borne fusaria. Plant Disease Report. 62: pag. 82-84.

PEREZ, O., YAÑEZ, M., ALVARADO, D., CIBRIAN, D., GRACIA, S. 2005. Hongos Asociados a Eucalipto, *Eucalyptus grandis* Hill: Maid. Fitapatoliga. Campus Montecillo. Colegio de Postgrados. 56230. Montecillo, Estado de México.

PITT, JI. 1980. The genus *Penicillium* and its teleomorphic states *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London.

SALAS, B. 2002. Plagas y enfermedades forestales en América Central. CATIE. Turrialba, Costa Rica. pág. 212-213.

SAXENA, R. 1985. Seedling mortality of *Eucalyptos* spp. Caused by micoflora. Indian phytopalogy. pag. 151 - 152

SEIFERT, K. 2001. *Fusarium* and anamorph generic concepts. Pag. 15-28 en *Fusarium* summerell BA et al, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota.

SOLANO, M., BRENES, D. 2012. Evaluación de métodos de curación de sustratos para la prevención del mal del talluelo. Revista Forestal Mesoamericana KURÚ. Costa Rica Vol.9 No. 22. ISSN: 2215-2504. Costa Rica.

SUTTON, D., FOTHERGILL, A. AND RINALDI, M. 1998. Guide to Clinically Significant Fungi, 1st ed. Williams & Wilkins, Baltimore.

SWEETS, L. 2009. Stored grain fungi. Consulta: julio de 2012. En: <http://agebb.missouri.edu/storage/disease /sgfungi. Htm>.

VIEIRA A.; MORAES T.; CARVALHO V.; FREITAS S. & BITTENCOURT A. 2003. Efeito da calagem, da colheita e da secagem na qualidade sanitaria de amendoim da seca. Pesquisa Agropecuaria Brasileira.

ZUNINI, R, ORREGO, A. 2013. Incidencia de Hongos en semillas de *Toona ciliata* y evaluación de la patogenicidad de *Fusrium* sp. y *Phomopsis* sp. Departamento de Protección Vegetal, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo Paraguay.