

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA

TRABAJO DE GRADUACIÓN

EVALUACIÓN DE SUSTRATOS PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE
Cladosporium uredinicola BIOCONTROLADOR DE *Puccinia horiana* Hennings,
DIAGNÓSTICO Y SERVICIO REALIZADO EN EL CENTRO DE DIAGNÓSTICO
PARASITOLÓGICO, FAUSAC, GUATEMALA, C.A.

ALBA MARILIA NOJ SURUY

GUATEMALA, MAYO DE 2017

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
ÁREA INTEGRADA**

TRABAJO DE GRADUACIÓN

**EVALUACIÓN DE SUSTRATOS PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE
Cladosporium uredinicola BIOCONTROLADOR DE *Puccinia horiana* Hennings,
DIAGNÓSTICO Y SERVICIO REALIZADO EN EL CENTRO DE DIAGNÓSTICO
PARASITOLÓGICO, FAUSAC, GUATEMALA, C.A.**

**PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

POR

ALBA MARILIA NOJ SURUY

**EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO
INGENIERA AGRÓNOMA**

EN

**SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE
LICENCIADA**

GUATEMALA, MAYO DE 2017

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

Dr. CARLOS GUILLERMO ALVARADO CEREZO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
VOCAL PRIMERO	Dr. Tomas Antonio Padilla
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. Cesar Linneo García Contreras
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
VOCAL CUARTO	P. Agr. Walfer Yasmany Godoy Santos
VOCAL QUINTO	P. Agr. Cristian Alexander Méndez López
SECRETARIO	Ing. Agr. Juan Alberto Herrera Ardón

Guatemala, Mayo de 2017

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de Graduación: **EVALUACIÓN DE SUSTRATOS PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE *Cladosporium uredinicola* BIOCONTROLADOR DE *Puccinia horiana* Hennings, DIAGNÓSTICO Y SERVICIO REALIZADO EN EL CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, FAUSAC, GUATEMALA, C.A.**, como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

ALBA MARILIA NOJ SURUY

ACTO QUE DEDICO

A:

DIOS Al creador de la vida por ser mi guía, por brindarme sabiduría y entendimiento para lograr esta meta. ¡A ti sea la honra, la gloria y el honor!

MIS PADRES Oscar Alfredo Noj y Juanita Suruy mis grandes motores, gracias por su esfuerzo día a día para lograr esta meta, por ser ejemplo de lucha, perseverancia y responsabilidad, en realidad no hay palabras para agradecer su apoyo incondicional. ESTE LOGRO ES TUYO.

MIS HERMANOS Norma, Oscar, Hamilton, William y Joselyn por el cariño y apoyo brindado en todo momento. Les deseo lo mejor para su vida, que puedan lograr cada una de las metas que se propongan.

MIS SOBRINOS Santiago y Adria Valentina por llenar mi vida de felicidad ¡Los quiero tanto!

A SERGIO GONZÁLEZ

Por ser mi amigo, mi confidente, mi amor, gracias por tu apoyo incondicional en cada momento.

MI ABUELITA Candy, gracias porque siempre estuve en tus oraciones, gracias por ser gran ejemplo de mujer luchadora, trabajadora, perseverante, gracias por esos valiosos y sabios consejos, regaños y ánimos, siempre deseaste ver este logro y sé que desde el cielo estás siendo presente, que Dios te tenga en su santa gloria.

TIOS Y PRIMOS Por sus oraciones y buenos deseos hacia mi persona, en especial a mi Tía Lety, a mis primos y primas Mayra, Wendy, Candy, Heyser,

Alexander y Hugo. A mi tía Dolores y Manuel gracias por siempre estar en sus oraciones.

MIS AMIGOS

Sayury Castillo, Roselia Solares, Josué De León, Erick Marroquín, Yasmin Silvestre, Anto Coyote, Keyla Patzán, Silvia Ajquejay, Arlin Casildo, Raúl Córdova, Estuardo Sacbaja, Alma y Juan Santos, Miguel Barrera, Rubeín Molina, Oscar Barrios, Jorge Sandoval, Isi Guerra, Daniel Juárez, Erick Cárdenas; la carga fue menos pesada gracias a ustedes, gracias por sus ánimos, consejos y por su amistad incondicional fueron buenos y grandes momentos compartidos durante mi carrera universitaria.

TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

A:

DIOS

GUATEMALA, PAÍS DE LA ETERNA PRIMAVERA

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMÍA

CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

SUBÁREA DE PROTECCIÓN DE PLANTAS

LICEO HISPANOAMERICANO

MIS DOCENTES

MIS COMPAÑEROS

MIS AMIGOS

AGRADECIMIENTOS

A:

Dios por ser mi guía e iluminarme en este camino y permitirme llegar a esta meta.

Mis padres, hermanos, sobrinos y cuñado, por el cariño y apoyo en cada momento.

Mi asesor Ing. Agr. Carlos González por el aporte de conocimiento brindado, por su paciencia, apoyo y tiempo brindado para la realización de mi investigación.

Mi supervisor asesor Ing. Agr. Gustavo Álvarez Valenzuela, por el aporte de conocimiento, apoyo, amistad y confianza brindada para la realización de este documento.

Mis compañeros de trabajo del Centro de Diagnóstico Parasitológico: Luis Centes por su apoyo y aportes de conocimientos, Roselia Solares, José Miguel, Maoly Castañeda, Antonieta Argueta, Herber Chinchilla e Ing. Agr. Carmen Santos, a pesar de que algunos días se tornaban muy difíciles siempre estuvieron para compartir buenos momentos, gracias por su amistad durante la realización de mi ejercicio profesional supervisado.

Al Centro de Diagnóstico Parasitológico, institución que me dio la oportunidad de crecer profesionalmente, en especial al Ing. Gustavo Álvarez.

A Ing. Sayury Castillo por sus valiosas observaciones y asesoría para la elaboración de este documento, además de ser una gran amiga, gracias por tu apoyo incondicional.

A la Subárea de protección de plantas (FAUSAC) que contribuyo a mi desarrollo profesional, fue una valiosa y gran experiencia, en especial a Inge. Agr. Álvaro Hernández, Ing. Agr. Gustavo Álvarez, Ing. Carlos González, Ing. Agr. Samuel Córdova y demás profesores de la subárea. A Ericka Roquel, Dinorah Tot e Irene gracias por su amistad, confianza y compañerismo.

A mis amigos Josué De León, Erick Marroquín y Roselia Solares emprendimos un camino juntos, el cual estuvo lleno de alegrías, aventuras, dificultades, e incluso enojos, pero gracias a Dios hemos culminado esta meta, les deseo muchos éxitos y bendiciones en su vida.

Así mismo a todas aquellas personas que fueron parte para la elaboración de este documento.

ÍNDICE DE CONTENIDO

CONTENIDO	PÁGINA
RESUMEN.....	xi
CAPÍTULO I.....	1
1. DIAGNÓSTICO DEL CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, FACULTAD DE AGRONOMÍA, USAC.	1
1.1 PRESENTACIÓN	3
1.2 CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO	4
1.2.1 Antecedentes.....	4
1.2.2 Ubicación	4
1.2.3 Misión	5
1.2.4 Administración	5
1.2.5 Alcances	5
1.3 OBJETIVOS	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 METODOLOGÍA.....	7
1.5 RESULTADOS	8
1.5.1 Infraestructura y equipo	8
1.5.2 Recursos humanos y físicos	9
1.5.3 Tipo de servicios	11
1.5.4 Investigaciones	11
1.5.5 Metodología de ejecución de diagnósticos	12
1.5.6 Análisis FODA.....	13
1.6 CONCLUSIONES.....	15
1.7 RECOMENDACIONES	15
1.8 BIBLIOGRAFÍA	16

CONTENIDO.....	PÁGINA
CAPÍTULO II.....	17
2. EVALUACIÓN DE SUSTRATOS PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE <i>Cladosporium uredinicola</i> BIOCONTROLADOR DE <i>Puccinia horiana</i> Hennings.....	17
2.1 PRESENTACIÓN.....	19
2.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	21
2.3 MARCO TEÓRICO	22
2.3.1 Roya blanca del Crisantemo (<i>Puccinia horiana</i> P. Hennings)	22
2.3.2 Taxonomía de <i>P. horiana</i> P. Hennings.....	22
2.3.3 Importancia económica	24
2.3.4 Control.....	26
2.3.5 Control biológico.....	26
2.3.6 <i>Cladosporium uredinicola</i>	28
2.3.7 Importancia.....	30
2.3.8 Modo de acción de <i>C. uredinicola</i>	30
2.3.9 Reproducción masiva artesanal de hongos.....	31
2.3.10 Fermentación sólida	32
2.3.11 Germinación de esporas	33
2.3.12 Cámara de Neubauer	34
2.4 MARCO REFERENCIAL.....	36
2.4.1 Ubicación.....	36
2.4.2 Cepa de <i>Cladosporium uredinicola</i> CI99VR	36
2.4.3 Cultivo de Crisantemo	37
2.4.4 Importancia económica y distribución geográfica.....	38
2.4.5 Sustratos	39
2.4.6 Fermentación sólida	40
2.5 OBJETIVOS.....	42
2.5.1 Objetivo general	42
2.5.2 Objetivos específicos	42
2.6 HIPÓTESIS.....	42

CONTENIDO.....	PÁGINA
2.7 METODOLOGÍA.....	43
2.7.1 Ensayo experimental	43
2.7.2 Descripción de tratamientos	43
2.7.3 Modelo estadístico	43
2.7.4 Preparación del sustrato	44
2.7.5 Preparación de suspensión inoculante	45
2.7.6 Inoculación e incubación.....	45
2.7.7 Variables de respuesta	46
2.7.8 Análisis estadístico	49
2.8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
2.8.1 Cantidad de conidios de <i>C. uredinicola</i> producidos por unidad de muestreo a los 8, 12 y 16 días de incubación.....	53
2.8.2 Viabilidad de <i>C. uredinicola</i> por unidad experimental	57
2.9 CONCLUSIONES.....	64
2.10 RECOMENDACIONES	65
2.11 BIBLIOGRAFÍA	66
2.12 GLOSARIO	70
CAPÍTULO III.....	73
3. SERVICIO REALIZADO EN EL CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, FACULTAD DE AGRONOMÍA, USAC.	73
3.1 PRESENTACIÓN	74
3.2 SERVICIO 1: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DE DIAGNÓSTICOS DEL CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, FACULTAD DE AGRONOMÍA, USAC.	75
3.2.1 Objetivo.....	75
3.2.2 Metodología	75
3.2.3 Resultados.....	76
3.3 PROCEDIMIENTOS PARA REALIZACIÓN DE DIAGNÓSTICO DE MUESTRAS	77
3.3.1 Recepción de la muestra	77
3.3.2 Rutas de diagnóstico	78
3.4 DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO.....	80

CONTENIDO.....	PÁGINA
3.4.1 Observación de síntomas y/o signos.....	80
3.4.2 Cortes y/o montajes para la determinación de agentes fitopatógenos	80
3.4.3 Aislamiento de esporas utilizando aguja de cristal (Goh)	81
3.4.4 Cámara húmeda.....	82
3.4.5 Análisis para determinación de Oomycetos	84
3.4.6 Cultivo trampa	84
3.4.7 Cultivo trampa a medio selectivo.....	86
3.4.8 Medio selectivo a Medio de Cultivo PDA.....	88
3.4.9 Semillas de cultivo trampa.....	88
3.4.10 Extracción de Monosporascus	89
3.5 DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO.....	91
3.5.1 Flujo bacteriano.....	91
3.5.2 Tinción de Gram.....	91
3.5.3 Cortes y/o montaje para flujo bacteriano.....	92
3.5.4 Aislamiento y purificación de bacterias	93
3.6 DIAGNÓSTICO NEMATOLÓGICO.....	95
3.6.1 Métodos de extracción de nematodos.....	95
3.6.2 Disección.....	95
3.6.3 Flotación en azúcar y centrifugado.....	96
3.6.4 Embudo de Baermann	97
3.6.5 Licuado tamizado	100
3.6.6 Nebulizadora	101
3.6.7 Fenwick modificado con flotación en acetona	103
3.7 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.....	107
3.7.1 Medio selectivo PARBPH Y PARPB	107
3.7.2 Potato dextrosa agar (PDA)	109
3.7.3 Agar agua.....	110
3.7.4 YDC.....	111
3.7.5 B KING	112

CONTENIDO.....	PÁGINA
3.7.6 Solución de suelo.....	113
3.7.7 Solución de azúcar	114
3.7.8 Evaluación	115
3.8 CONCLUSIONES.....	115
3.9 RECOMENDACIONES	115
3.10 BIBLIOGRAFÍA	116
4. APÉNDICE	117
4.1 APÉNDICE CAPÍTULO II	117
4.1.1 Supuestos del análisis de varianza.....	117
4.2 APÉNDICE CAPÍTULO III	129

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Descripción de equipo que dispone el Centro de Diagnóstico Parasitológico.....	9
Cuadro 2. Descripción de insumos que dispone el Centro de Diagnóstico Parasitológico.....	10
Cuadro 3. Descripción de reactivos que dispone el Centro de Diagnóstico Parasitológico.....	10
Cuadro 4. Análisis de fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas del CDP-FAUSAC.....	13
Cuadro 5. Descripción de los tratamientos	43
Cuadro 6. Resumen de cantidad conidios/ml de sustrato maíz quebrado (T3) a los 8, 12 y 16 días de incubación.....	54
Cuadro 7. Resumen del ANDEVA para la variable de cantidad de conidios/ml a los 8, 12 y 16 días de incubación.....	55
Cuadro 8. Comparación de medias a través de prueba de Tukey para la variable cantidad de conidios de <i>C. uredinicola</i> en el tratamiento 3, a los 8, 12 y 16 días de producción.....	56
Cuadro 9. Viabilidad a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de producción	58
Cuadro 10. Resumen del ANDEVA para la variable porcentaje de viabilidad a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de producción.....	59
Cuadro 11. Comparación de medias para la variable porcentaje de viabilidad a las 18 horas el tratamiento 3, a los 8, 12 y 16 días de producción.	59
Cuadro 12. Viabilidad a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de producción.	60
Cuadro 13. Resumen del ANDEVA para la variable porcentaje de viabilidad a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de producción.....	60
Cuadro 14. Comparación de medias para la variable porcentaje de viabilidad a las 24 horas el tratamiento 3, a los 8, 12 y 16 días de producción.	61
Cuadro 15. Resumen de resultados obtenidos del mejor sustrato para la producción de <i>C. uredinicola</i>	63

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 16. Concentraciones de reactivos y antibióticos para realizar medios de cultivo selectivo para oomycetos.....	108
Cuadro 17. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo PDA.....	110
Cuadro 18. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo agar agua.	110
Cuadro 19. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo YDC.....	112
Cuadro 20. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo B King.....	113
Cuadro 21A. Lectura para recuento de conidios, conteo a los 8 días de incubación	118
Cuadro 22A. Resumen promedio de conidios/ml por lectura para el recuento de conidios a los 8 días de incubación	120
Cuadro 23A. Lectura para recuento de conidios, conteo a los 12 días de incubación.	120
Cuadro 24A. Resumen promedio de conidios/ml por lectura para el recuento de conidios a los 12 días de incubación.....	122
Cuadro 25A. Lectura para recuento de conidios, conteo a los 16 días de incubación.	122
Cuadro 26A. Resumen promedio de conidios/ml por lectura para el recuento de conidios a los 16 días de incubación	124
Cuadro 27A. Toma de datos para porcentaje de viabilidad a los 18 y 24 horas a los 8 días.....	124
Cuadro 28A. Toma de datos para porcentaje de viabilidad a los 18 y 24 horas a los 12 días.....	125
Cuadro 29A. Toma de datos para porcentaje de viabilidad a los 18 y 24 horas a los 16 días.....	127

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Síntomas de <i>Puccinia horiana</i> P. Hennings.....	22
Figura 2. <i>P. horiana</i>	23
Figura 3. Mapa de localización de comunidades con presencia de roya blanca (<i>P. horiana</i> Henn) en el municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala.	25
Figura 4. <i>C. uredinicola</i> Conidióforos derivados de hifas y conidios.	29
Figura 5. <i>C. uredinicola</i> colonizando pústulas de <i>P. horiana</i>	30
Figura 6. Hiperparasitismo de <i>C. uredinicola</i> sobre pústulas de <i>P. horiana</i>	31
Figura 7. Método de infección directa de las esporas de hongos	34
Figura 8. Cámara de Neubauer para conteo de conidios.....	35
Figura 9. Cepa CI99VR de <i>C. uredinicola</i>	36
Figura 10. <i>D. grandiflora</i> (Ramat).	37
Figura 11. Esterilización de los sustratos naturales.	44
Figura 12. Procedimiento empleado para obtener suspensión inoculante de <i>C. uredinicola</i>	45
Figura 13. Inoculación de la suspensión de <i>C. uredinicola</i> a los tratamientos.....	46
Figura 14. A. Realización de la suspensión inoculadora.....	47
Figura 15. Reconocimiento y recuento de conidios de <i>C. uredinicola</i>	47
Figura 16. Siembra de solución de esporas en medio agar-agua al 3%.....	49
Figura 17. Tratamiento 1 + 3 ml de suspensión inoculadora, Tratamiento 2 + 3 ml de suspensión inoculadora.....	53
Figura 18. Sustrato maíz quebrado (T3) colonización y crecimiento de <i>C. uredinicola</i>	54
Figura 19. Comportamiento del crecimiento de <i>C. uredinicola</i> en el sustrato maíz quebrado.	57
Figura 20. Germinación de <i>C. uredinicola</i>	58
Figura 21. Porcentaje de viabilidad a las 18 y 24 horas en los 8, 12 y 16 días de incubación	62
Figura 22. Procedimiento para realización de cámara húmeda de muestras vegetales, para inducir a producción de estructuras fúngicas.....	83

FIGURA	PÁGINA
Figura 23. Procedimiento para la realización de cultivo trampa para oomicetos del genero <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i>	86
Figura 24. Traslado de cultivo trampa a medio de cultivo selectivo para el aislamiento de oomicetos del género <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i>	87
Figura 25. Crecimiento y desarrollo de oomicetos de medio selectivo a medio de cultivo PDA.....	88
Figura 26. Traslado de semillas de cultivo trampa a solución de suelo nutritiva para el crecimiento y desarrollo de oomicetos.....	89
Figura 27. Extracción de nematodos a través del embudo de Baermann.	99
Figura 28. Extracción de nematodos a través del licuado y tamizado.....	101
Figura 29. Extracción de nematodos a través de la nebulizadora	103
Figura 30. Extracción de nematodos de quiste a través del método de Fenwick modificado con flotación en acetona.	106
Figura 31A. Registro de ingreso de muestra	129
Figura 32A. Informe de resultados de muestra ingresada al CDP	130

RESUMEN

El Ejercicio profesional supervisado de la Facultad de Agronomía, fue llevado a cabo en el Centro de Diagnóstico Parasitológico (CDP). Se realizó el diagnóstico en dicha institución, el cual da a conocer la situación en cuanto a infraestructura, recursos humanos, mobiliario, equipo e insumos con los que cuenta el laboratorio. Así mismo se presentan las investigaciones que se llevaron a cabo durante el año 2014 dentro del CDP, las cuales fueron financiadas por instituciones gubernamentales como la Dirección General de Investigación de la universidad de San Carlos de Guatemala (DIGI) y la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), que contribuyen con el desarrollo nacional y regional en el ámbito agrícola.

La fase de investigación fue sobre *Cladosporium uredinicola*, hongo que actúa como biocontrolador de *Puccinia horiana*; su modo de acción es inhibir el crecimiento de teliosporas. Por ser hongo filamentoso tiene patrón de crecimiento en ramificación y tiene la capacidad de penetrar en sustratos sólidos. En este estudio se realizó la evaluación de sustratos naturales para la propagación masiva de *C. uredinicola* de manera artesanal, con el objetivo de obtener la mayor cantidad de conidios. Se buscó también establecer a nivel de laboratorio la viabilidad de conidios y determinar si tiene la capacidad de establecerse en campo para poder ser utilizado como control biológico.

Para ello se evaluaron tres sustratos naturales, lo cuales fueron: arroz blanco, arroz precocido y maíz quebrado con tres períodos de incubación, a los 8, 12 y 16 días. Se midieron las variables de respuesta: cantidad de conidios por mililitro y su porcentaje de viabilidad a las 18 y 24 horas en los distintos periodos de incubación.

En el ensayo experimental primeramente se estableció la metodología para la propagación de dicho agente de control biológico, se realizaron pruebas como: determinación de calibre de plástico resistente a proceso de esterilización, determinación de cantidad de agua y periodo de esterilización de sustratos, cantidad de suspensión inoculante y sellado de bolsas o unidades experimentales.

A nivel de laboratorio se concluyó que existe diferencia significativa, el maíz quebrado fue el sustrato más eficiente, inoculado con 1×10^6 conidios, en el período de incubación de 16 días se obtuvo producción de 2.1×10^7 conidios/ml o 2.9×10^7 conidios/gr, con una viabilidad de 95.59 % a las 18 horas, mientras que a las 24 horas tiene una viabilidad del 99.41%. Para los sustratos de arroz blanco y maíz quebrado no fue posible la obtención de datos para las variables de respuesta, ya que, *C. uredinicola* no germinó sobre dichos sustratos.

En cuanto al servicio realizado, se llevó a cabo un manual de procedimientos para la realización de diagnósticos en el Centro de Diagnóstico Parasitológico, con el objetivo de realizar un diagnóstico certero y así mismo garantizar el resultado de la muestra ingresada.

Dicho manual se realizó con fines de inducir a personas que laboran en el Centro de Diagnóstico Parasitológico, ya sea como laboratoristas, epesisitas, tesisistas, catedráticos, estudiantes particulares y/o cualquier otra persona que le interese trabajar dentro de dicho laboratorio. En él se incluyen los procedimientos empleados para el análisis de muestras vegetales que ingresen y/o detección de agentes patógenos que estén afectando al cultivo, así mismo se incluyen el procedimiento para la realización de medios de cultivo para agentes patógenos.



1.1 PRESENTACIÓN

El Centro de Diagnóstico Parasitológico (CDP) es una entidad no lucrativa que presta sus servicios al agro guatemalteco contribuyendo al desarrollo y la investigación agrícola y que su vez le permite proyectarse a los diferentes sectores de la sociedad nacional e internacional, contribuyendo en prestación de servicios educativos, científicos y tecnológicos así mismo fomentar experiencias que fortalezcan procesos académicos

En el siguiente diagnóstico se da a conocer la situación actual del Centro de Diagnóstico Parasitológico en cuanto a infraestructura, recursos humanos, mobiliario, equipo e insumos con los que cuenta el laboratorio

El CDP tiene la capacidad de realizar diagnósticos fitopatológicos, nematológicos, entomológico, asistencia técnica en muestreo de plagas y manejo de enfermedades, así mismo se da a conocer las investigaciones que se llevaron a cabo durante el años 2014 dentro del laboratorio las cuales fueron financiadas por instituciones gubernamentales como la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos de Guatemala (DIGI) y la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT) lo que contribuye con el desarrollo nacional y regional en el ámbito agrícola.

1.2 CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

1.2.1 Antecedentes

El Centro de Diagnóstico Parasitológico (CDP) es una entidad no lucrativa que presta sus servicios a partir de 1989, fue aprobado según los artículos de la propuesta: prestación de servicios educativos, científicos y tecnológicos y por la Junta Directiva de la Facultad de Agronomía en la Resolución No. 735-96, punto sexto del acta 46-96, con la finalidad de proyectar y ampliar las actividades de investigación de la Facultad de Agronomía y así mismo de la Universidad.

La universidad busca formas que generen recursos y que su vez le permita proyectarse a los diferentes sectores de la sociedad nacional e internacional, contribuyendo en prestación de servicios educativos, científicos y tecnológicos así mismo fomentar experiencias que fortalezcan procesos académicos e incrementando la presencia de la Universidad en la dirección de proceso que se desarrollan a nivel gubernamental.

Dado que la Universidad de San Carlos es centro de formación de profesionales y cuenta con personal calificado para el proceso de determinación de plagas y enfermedades se creó el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía que presta sus servicios de forma no lucrativa al agro guatemalteco, brindando servicios de diagnósticos para la determinación de enfermedades en los cultivos. El valor de dicho diagnóstico realizado en CDP FAUSAC es de Q. 75.00 dicha tarifa está orientada a la recuperación de fondos por parte de la Facultad de Agronomía, ya que necesita recuperar los fondos que invierte en su personal, materiales y equipo, infraestructura, depreciación de equipo entre otros.

1.2.2 Ubicación

El Centro de Diagnóstico Parasitológico (CDP) actualmente se encuentra ubicado en el tercer nivel dentro de las instalaciones de la Unidad de Vinculación y Gestión de Recursos (UVIGER), Facultad de Agronomía, de la Universidad San Carlos de Guatemala.

1.2.3 Misión

El centro de Diagnostico Parasitológico fue creado con el fin de prestar asistencia al agro guatemalteco en todos niveles, contribuyendo al desarrollo y la investigación agrícola, proporcionando la aplicación adecuada de tecnología apropiada para el manejo de plantas.

1.2.4 Administración

El Centro de Diagnóstico pertenece a la subárea de protección de plantas, área tecnológica de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos. Por lo tanto, la administración está bajo dirección del departamento de contabilidad de la universidad y de la Facultad de Agronomía. Actualmente es administrado por el Ing. Agr. Gustavo Adolfo Álvarez Valenzuela, profesor titular VIII.

Cabe mencionar que el laboratorio cuenta con equipo, material e insumos proporcionados por proyectos realizados dentro del CDP, financiados por la Dirección General de Investigación de la Universidad de San Carlos (DIGI), el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT) y financiamiento para el pago del técnico de laboratorio por la Gremial de Exportadores (GEXPORT).

1.2.5 Alcances

El centro de Diagnostico posee la infraestructura necesaria para desarrollar la actividad de diagnóstico de agentes fitopatógenos entre los que se encuentran hongos, bacterias, nematodos, artrópodos y moluscos, apoyar proyectos de investigación de las diferentes unidades de la Facultad de agronomía, así como diferentes entidades nacionales e internacionales.

Apoyo a la docencia, retroalimentación docente en función de las investigaciones y proyectos ya sea a nivel institucional o bajo proyectos de investigación con estudiantes de tesis. El laboratorio también colabora con asesoría técnica y capacitaciones en toma de muestra para las entidades que las requieran.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

- Establecer la situación actual del Centro de Diagnóstico Parasitológico

1.3.2 Objetivos específicos

- Dar a conocer la infraestructura, recursos humanos y físicos con los que cuenta el laboratorio
- Dar a conocer los servicios e investigaciones realizadas dentro del Centro de Diagnóstico Parasitológico
- Describir los procesos básicos de ingreso y análisis de muestras
- Presentar la situación y condición de funcionamiento a través de un análisis FODA del Centro de Diagnóstico Parasitológico.

1.4 METODOLOGÍA

El diagnóstico realizado en el Centro de Diagnóstico Parasitológico (DCP) de la Facultad de Agronomía, Universidad San Carlos de Guatemala, fue realizado como parte del ejercicio profesional supervisado de la Facultad de Agronomía (EPSA) efectuado de febrero a noviembre de 2014.

La obtención de información acerca del funcionamiento, aspectos positivos y puntos críticos del laboratorio fue a través de entrevistas informales dirigidas al personal relacionado con el funcionamiento del laboratorio (jefe del laboratorio, técnico de laboratorio e investigadores) y mediante revisión de literatura (tesis).

Así mismo se realizó inventario de equipo, insumos y reactivos del CDP- FAUSAC, durante el año 2014.

Se realizó un listado de las investigaciones llevadas a cabo dentro del CDP- FAUSAC durante el año 2014 a las cuales se dio apoyo durante el EPS.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Infraestructura y equipo

El laboratorio cuenta con seis áreas las cuales son: recepción, área de procesamiento de muestras, área de observación, área de transferencia, área de esterilización y bodega.

1. **Área de oficina o recepción:** en ésta se ubican el mobiliario de oficina como escritorios, archivos y almacenamiento de datos, libros de referencia y control del laboratorio.
2. **Área de procesamiento de muestras:** también conocido cuarto sucio, en esta área se realizan los procesos básicos de las muestras ingresadas como realización de cámaras húmedas, cultivos trampa, extracción de nematodos, flujo bacteriano, toma de fotografías, entre otros.
3. **Área de observación:** en este área se encuentran estereoscopios, macroestereoscopio, microscopios, cámaras fotográficas de microscopios, computadora, libro para la determinación de agentes fitopatógenos, entre otros. Área utilizada para observación de cámaras húmedas, realización de montajes y observación de agentes fitopatógenos tanto *in vivo* como *in vitro*.
4. **Área de aislamiento:** esta área el laboratorio se realiza el trabajo de inoculación y transferencia de agentes fitopatógenos a medios de cultivo nutritivos para su crecimiento y desarrollo, en este área se encuentra la cámara de flujo laminar y gabinetes, área ubicada en un lugar libre de corrientes de aire y polvo, con el propósito de evitar contaminación en los medios de cultivo.
5. **Área de esterilización e incubación:** se realiza la preparación y esterilización de medios de cultivo, esterilización de cristalería, así mismo se encuentran ubicadas en esta área las incubadoras, se cuenta con autoclave, horno microondas, horno de convección, balanzas, refrigeradoras, cristalería y lavadero.
6. **Bodega:** área utilizada para el almacenamiento de reactivos e insumos, entre otros.

1.5.2 Recursos humanos y físicos

En el Centro de Diagnóstico está conformado por dos profesores titulares, estudiantes de practica supervisada (EPS) de la Facultad de Agronomía, técnico de laboratorio, investigadores de proyectos en ejecución.

- Profesor titular de la FAUSAC y Administrador del CDP Ing. Agr. Gustavo Álvarez
- Profesor titular de la FAUSAC Ing. Agr. Samuel Córdova
- Estudiante de EPS Br. Alba Noj
- Estudiante de EPS Br. Roselia Solares
- Técnico de laboratorio P. Agr. José Escobar

El Centro de Diagnóstico Parasitológico dispone del siguiente equipo:

Cuadro 1. Descripción de equipo que dispone el Centro de Diagnóstico Parasitológico

Descripción	Cantidad
Autoclaves de 20 y 40 litros de capacidad	2
Balanza analítica	2
Cámaras de incubación	2
Cámara de flujo laminar	1
Microscopios,	3
Estereoscopio	3
Macroestereoscopio	1
Cámara fotográfica	4
Refrigeradora	3
Centrifugadora	1
Licuada	1
Horno de calor seco	1
Microondas	1
Computadoras	4
Impresora	1
Escáner	2
Maquina selladora	1

Fuente: Noj Suruy 2014

Cuadro 2. Descripción de insumos que dispone el Centro de Diagnóstico Parasitológico

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	DESCRIPCIÓN
8	Caja 6U	Toalla de papel para dispensador en rollo de 240 metros
4	Rollo	Bobina de papel kraft delgada 12"
20	Galón	Alcohol etílico al 70%
25	Galón	Alcohol etílico al 95%
5	Galón	Alcohol en gel
10	Millar	Bolsas plásticas negras 30X36
10	Millar	Bolsas plásticas transparentes 15X25X6
20	Rollo	PARAFILM 10cmx38m
25	3pack	Desinfectante en spray Lysol 90onz.
65	Cajas	Hojas de Afeitador Gillette (5unidades)
12	Caja 50U	Guantes de látex tallas "S"
10	Caja 50U	Guantes de látex tallas "M"
2	Caja 100U	Cofias
10	Caja 50U	Mascarillas tipo conchita
8	Caja 100U	Repuestos de bisturí No.11
10	Caja 100U	Repuestos de bisturí No.21
20	caja 500 u	Cajas petri 90x15mm (549 UNIDADES)

Fuente: Noj Suruy 2014

Cuadro 3. Descripción de reactivos que dispone el Centro de Diagnóstico Parasitológico

CANTIDAD	UNIDAD DE MEDIDA	DESCRIPCIÓN
13	500 g	Agar patata dextrosa (PDA)
06	1kg	Agar agar
01	500g	Extracto de Malta
02	500g	Extracto de levadura granulado
02	1kg	Hidróxido de potasio en pastillas
02	500g	Magnesio sulfato heptahidratado
02	500g	Nitrato de calcio tetrahidratado
01	500g	Potasio hidrogeno fosfato

01	1kg	Hidrogeno fosfato dipotásico
02	500g	Carbonato de calcio
01	500g	Nitrato de Sodio
03	500gr	Corn meal agar
02	100g	Lithium chloride
03	250g	Sacarosa
02	1L	Tween 20
01	1L	Tween 80
01	2.5L	Xileno
12	100mL	Azul de lactofenol
01	100mL	Gelatina glicerada

Fuente: Noj Suruy 2014

1.5.3 Tipo de servicios

- Fitopatológico: consiste en realizar análisis de agentes fitopatógenos(hongos y bacterias)
- Nematológico: en este estudio se realiza el diagnóstico de nematodos fitoparásiticos filiformes y globosos.
- Entomológico: en este se realiza lo que se refiere a insectos.
- Asistencia técnica
 - Muestreo de plagas
 - Manejo de enfermedades

1.5.4 Investigaciones

Dentro del Centro de Diagnóstico se llevan a cabo investigaciones financiadas por la Dirección General de investigación de la Universidad de San Carlos (DIGI), la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), durante el 2014 se ejecutaron las siguientes investigaciones:

- Proyecto FODECYT 27-2013 Programa primeros investigadores “Bioprospección de cepas promisoras de *Sphaerellopsis filum* y su potencial en el control de *Uromyces phaseoli* en los municipios de Nueva Santa Rosa, Casillas y Santa Cruz Naranjo del Departamento de Santa Rosa”

- Proyecto CONCYT 54-2014 CONCYT Programa master “Caracterización de plagas microbianas y de artrópodos en seis cultivos ornamentales de exportación”
- Proyecto DIGI 7.26. “Extracción y formulación artesanal de *Cladosporium uredinicola* Biocontrolador de *Puccinia horiana*”

El CDP permite la ejecución de los proyectos dentro de su laboratorio con el objetivo de obtener más equipo, materiales e insumos a través del financiamiento de estas instituciones gubernamentales, así mismo contar con la presencia de personal calificado quienes llevan a cabo las investigaciones y sean apoyo hacia la administración de dicho laboratorio.

1.5.5 Metodología de ejecución de diagnósticos

Para los servicios de diagnóstico de enfermedades en planta y suelo que ofrece el CDP lleva la siguiente metodología:

A. Recepción de muestras

La recepción de muestras se realiza en el Centro de Diagnóstico Parasitológico, que consiste en llenar una boleta de ingreso con los datos necesarios del solicitante, como: nombre del solicitante, empresa, dirección, teléfono, correo electrónico, cultivo, procedencia de la muestra, además es importante indicar los síntomas, manejo del cultivo, agroquímicos utilizados, edad del cultivo, variedades e indicar que estudios necesita que se le realicen a la muestra ingresada.

B. Registro de muestras

Consiste en obtener una base de datos en el libro de registro tanto digital como físico de las muestras que ingresen al laboratorio el cual tiene datos como: Número correlativo asignado, fecha de ingreso, solicitante y/o empresa, cultivo, procedencia, tipo de análisis solicitado, resultados y número de recibo de la muestra analizada.

C. Procesamiento de muestras

El procesamiento de las muestras ingresadas está en función al análisis solicitado ya sea fitopatológico, nematológico, bacteriológico, y/o entomológico, este procedimiento está a cargo de la persona encargada del laboratorio.

D. Emisión de resultados

El informe de resultados se lleva a cabo después de haber realizado los análisis correspondientes a la muestra ingresada, en el que lleva el nombre del patógeno, la parte utilizada para el análisis las cuales pueden ser: hojas, tallos, raíces, suelo, fruto, etc. y sus respectivas recomendaciones emitidas por la persona a cargo del Centro de Diagnóstico Parasitológico (Ing. Agr. Gustavo Álvarez).

1.5.6 Análisis FODA

Cuadro 4. Análisis de fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas del CDP-FAUSAC.

FORTALEZAS	OPORTUNIDADES
<ul style="list-style-type: none"> • Centro de referencia para instituciones gubernamentales • Actividad totalmente de servicio, accesible a todos los interesados • Infraestructura adecuada • Equipo, material e insumos adecuados para realizar los diagnósticos antes mencionados • Personal calificado • Ofrece servicio de bajo costo para el usuario • Cuenta con el respaldo de la USAC • Apoyo de equipo, material e insumos por parte de proyectos que se realizan dentro del laboratorio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Oportunidad crecimiento • Brindar asesoría técnica a pequeños y grandes productores, profesionales e instituciones. • Cobertura de proyectos de investigación estatales e instituciones privadas. • Expandirse a nivel nacional e internacional • Mayor divulgación a través de internet, panfletos, artículos, etc. • Alianzas con otras instituciones

DEBILIDADES	AMENAZAS
<ul style="list-style-type: none"> • No posee equipo especializado para diagnóstico de enfermedades causadas por virus y bacterias. • El personal técnico y de apoyo es responsable de otras actividades, además de apoyar al CDP. • La universidad puede ser cerrada y paralizar los servicios por feriados, asuetos, fenómenos políticos, internos y/o externos. • No cuenta con manuales y otros documentos necesarios para procedimientos en la realización de diagnósticos. • Poca divulgación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mayor divulgación de otros centros privados. • Cambios en las actividades de personal • Cambios de personal • No se cumple al 100% con normas de Bioseguridad dentro el CDP. • Otras instituciones estatales prestan servicios similares • Otras instituciones cuentan con equipos más especializados para el análisis y diagnóstico

1.6 CONCLUSIONES

- El Centro de Diagnóstico Parasitológico cuenta con seis áreas las cuales son: recepción, área de procesamiento de muestras, área de observación, área de transferencia, área de esterilización y bodega, así mismo cuenta con personal calificado administrado por el Ing. Agr. Gustavo Álvarez y con suficiente mobiliario, equipo, insumos para la realización de diagnósticos.
- Los servicios que ofrece el CDP son diagnósticos fitopatológicos, nematológicos, entomológico, asistencia técnica en muestreo de plagas y manejo de enfermedades.
- Dentro del laboratorio se realizaron investigaciones durante el año 2014 las cuales fueron financiadas por la Dirección General de Investigación de la universidad de San Carlos de Guatemala (DIGI) y la Secretaria Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT).
- Los procesos básicos para el diagnóstico de muestras ingresadas al CDP son: recepción de muestras, registro de muestras, procesamiento de muestras y emisión de resultados.

1.7 RECOMENDACIONES

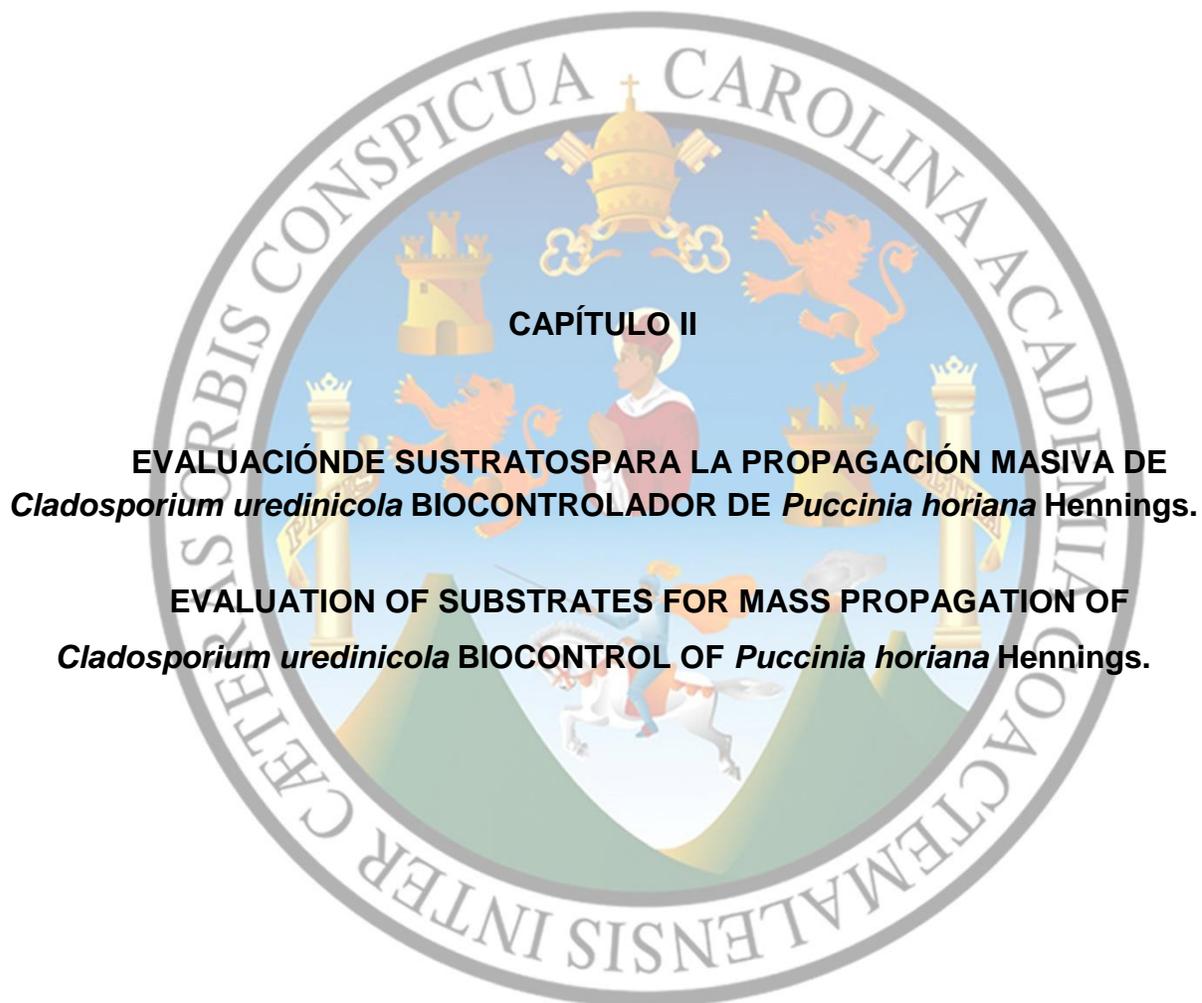
- Realización de manuales de procesamientos para la realización de diagnósticos y capacitación al personal en cuanto a normas de bioseguridad dentro del CDP-FAUSAC.
- Capacitación constante al personal del CDP-FAUSAC para prestar un mejor servicio.
- No realizar cambios del personal ya que implica realizar capacitaciones constantemente.

1.8 BIBLIOGRAFÍA

1. Mejía Ajcucun, LA. 2008. Estudio fitopatológico en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura y Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 148 p
2. Mijangos Chex, RA. 2009. Caracterización molecular y diagnóstico patológico de *Phytophthora capsici* L. en chile pimiento *Capsicum annum*, en las regiones de Salamá, Baja Verapaz, y Laguna de Retana, Jutiapa y asistencia técnica a productores, en protección vegetal, en el municipio de San Juan Comalapa, Departamento de Chimaltenango. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 86 p
3. Reyes Consuegra, LJ. 2008. Prospección de enfermedades de raíces y tallos en el cultivo de flores de corte en San Juan Sacatepéquez, Guatemala y servicios de análisis desarrollados en el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 122 p.

DOCUMENTOS DE GRADUACIÓN
FAUSAC
TESIS Y REVISIÓN

Rolando Barrios



CAPÍTULO II

EVALUACIÓN DE SUSTRATOS PARA LA PROPAGACIÓN MASIVA DE *Cladosporium uredinicola* BIOCONTROLADOR DE *Puccinia horiana* Hennings.

EVALUATION OF SUBSTRATES FOR MASS PROPAGATION OF *Cladosporium uredinicola* BIOCONTROL OF *Puccinia horiana* Hennings.

2.1 PRESENTACIÓN

La roya blanca *Puccinia horiana* (Basidiomycota: Uredinales) es una enfermedad específica del cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*), se disemina fácilmente por viento, agua o adherida a cualquier superficie. Este patógeno ocasiona lesiones en las hojas provocando pérdidas económicas para los productores de crisantemo afectando la calidad y rendimiento. Vences y Vásquez (2008) han reportado en México pérdidas hasta del 100% de cosechas de dicho cultivo.

Asia, Europa, Norte y Suramérica han reportado la presencia de esta enfermedad por lo que se ven en la obligación de aplicar medidas cuarentenarias para cultivadores y comercializadores que exportan crisantemo para tener libre acceso al mercado internacional, el crisantemo debe estar libre de la enfermedad de roya blanca.

Según Mejía (2008) la enfermedad está presente en el municipio de San Juan Sacatepéquez mayor productor de crisantemo en Guatemala con 100% de incidencia en los sitios de producción ya que el patógeno es agresivo y difícil de erradicar, por lo que recomienda un control enfocado hacia el manejo integrado del cultivo.

Recientemente Mejía (2008) y Álvarez *et al.*, (2013) reportaron la presencia de *Cladosporium uredinicola* (Ascomycota: Capnodiales) en áreas de producción de Crisantemo en San Juan Sacatepéquez, Guatemala como hiperparásito de *P. horiana*, este agente de control biológico tiene un modo de acción en el que las hifas inhiben el crecimiento de las teliosporas mostrando un colapso y necrosis de *P. horiana* y posteriormente se observa la abundante presencia de *C. uredinicola*.

C. uredinicola tiene la característica de ser un hongo filamentoso ya que tiene un patrón de crecimiento en ramificación, según Cruz Martínez (2007) este tipo de hongos se encuentran mejor adaptados para la fermentación sólida (bajos contenidos de humedad) ya que el modo de crecimiento hifal otorga el poder de penetrar en sustratos sólidos y así lograr la propagación masiva del agente hiperparásito.

En Guatemala no se han realizado investigaciones acerca de la propagación masiva del hiperparásito ya que no había existido interés y/o financiamiento para este tipo de

investigaciones, actualmente ha surgido tendencias de control biológico para disminuir la contaminación ambiental, intoxicación de agricultores, presencia de residuos químicos la cual será una alternativa para reducir dichos factores, recientemente *C. uredinicola* ha sido detectado por lo tanto en la presente investigación se evaluaron sustratos naturales para su propagación masiva.

La investigación se realizó con el objetivo de encontrar un sustrato eficaz para la propagación masiva de *C. uredinicola* como control biológico de *P. horiana* para que los productores de crisantemo obtengan tecnología de fácil empleo y alta productividad, ya que los fungicidas químicos utilizados para el control de enfermedades en su mayoría son tóxicos, generan resistencia y además la contaminación del agua, suelo y aire lo que provoca consecuencias a largo plazo para el ambiente y los agricultores. Por lo que en la actualidad hoy en día se busca producir alternativas biológicas que logren reemplazar o disminuir el uso de dichos productos.

En la evaluación de los sustratos se determinó que el sustrato maíz quebrado demostró ser la mejor opción para la producción de conidios de *C. uredinicola* el cual presento una media de producción de conidios 2.1×10^7 conidios/ml equivalente a 2.9×10^7 conidios/gr en el período de incubación de los 16 días además de presentó alto porcentaje de viabilidad muy cercano a 100% entre las 18 a las 24 horas por lo tanto cumple los requisitos establecidos para el control de calidad de formulaciones de hongos.

2.2 DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

La roya blanca *P. horiana* Hennings es una enfermedad específica del crisantemo de carácter cuarentenario, por lo que, su presencia puede afectar el comercio con los países importadores de flores y esquejes de crisantemos, dicha enfermedad se propaga con facilidad por medio del viento, agua o adheridas a cualquier superficie, esta enfermedad da lugar a lesiones en las hojas, cuando estas se encuentran severamente atacadas tienden a marchitarse, cuelgan del tallo y con el tiempo se secan por completo lo que provoca pérdidas para los productores que según Vences y Vásquez (2008) en México se han reportado pérdidas del 100% en cosechas, ya que afecta en calidad y productividad a dicho cultivo. Para el control de esta enfermedad comúnmente utilizan fungicidas sintéticos los cuales no han sido eficientes para su manejo y control. Según Mejía (2008) es un patógeno muy agresivo y difícil de erradicar, por lo tanto en esta investigación se busca establecer un sustrato eficaz para la propagación de *C. uredinicola* para ser utilizado como fungicida biológico para el control de *P. horiana*.

En áreas de producción de Crisantemo en San Juan Sacatepéquez se ha detectado la presencia de *C. uredinicola* el cual es un hiperparásito que inhibe el crecimiento de las pústulas de *P. horiana* que reduce dicha enfermedad. *C. uredinicola* por sus características tiene la capacidad de propagarse fácilmente por lo que se evaluó la propagación masiva en sustratos naturales para ser utilizado como fungicida biológico para los productores de crisantemo en San Juan Sacatepéquez, así mismo con la utilización de este fungicida biológico se busca reducir el inóculo de la roya provocado por *P. horiana*, aplicar estrategias amigable con el ambiente e incrementar rendimientos y utilidades.

2.3 MARCO TEÓRICO

2.3.1 Roya blanca del Crisantemo (*Puccinia horiana* P. Hennings)

P. horiana Hennings denominado comúnmente como roya blanca del crisantemo, es un parásito obligado, autoica y microcíclica que se disemina especialmente en material vegetal vivo, pero sus estructuras de contaminación pueden ser transportadas por el viento, agua o adheridas a cualquier superficie (Rojas 2005).

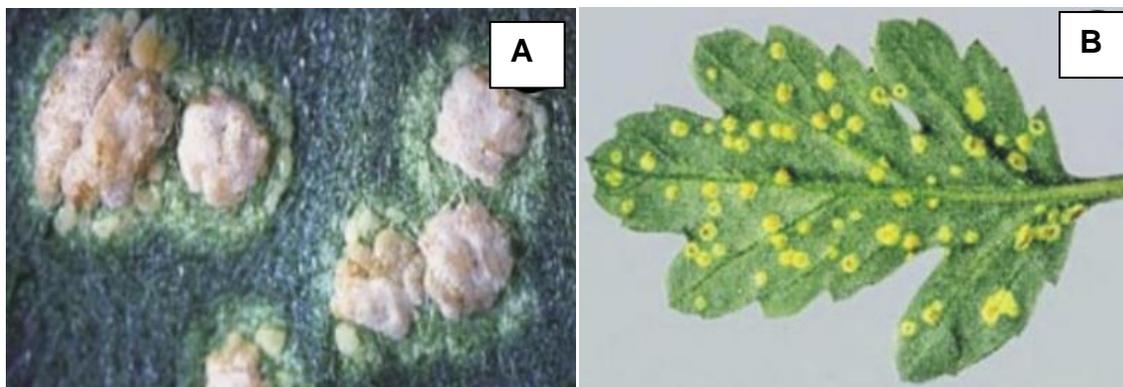


Figura 1. Síntomas de *Puccinia horiana* P. Hennings. A) Pústulas circulares causadas por *P. horiana*, B) Hoja de crisantemo afectada totalmente por roya blanca (*P. horiana*). Fuente: Rojas 2005.

2.3.2 Taxonomía de *P. horiana* P. Hennings

Reino:	Fungi
Phylum:	Basidiomycota
Subphylum:	Pucciniomycotina
Clase:	Pucciniomycetes
Orden:	Pucciniales
Familia:	Pucciniaceae
Género:	Puccinia
Especie:	<i>Puccinia horiana</i> P. Hennings (CABI 2014).

A. Biología

P. horiana Hennings, es una roya autoica, microcíclica o de ciclo corto, las teliosporas, son bicelulares, germinan y producen basidiosporas unicelulares.

Estas se dispersan con las corrientes de aire. Las teliosporas y basidiosporas pueden germinar a temperaturas comprendidas entre 1 y 32 ° C con temperaturas óptimas de 15 a 20 ° C para las teliosporas y de 13 a 18 ° C para las basidiosporas. Para estas germinaciones es indispensable una humedad relativa muy elevada (90% mínimo). En las referidas condiciones óptimas, la germinación de teliosporas y descarga de basidiosporas en la superficie de las hojas es un proceso muy rápido. Sólo con 5 horas es suficiente para que una nueva infección se establezca. El período de incubación es de 7 a 10 días, pero con temperaturas alrededor de 30 ° C puede prolongarse a 8 semanas (EPPO 2004).

B. Síntomas

Las hojas se infectan por basidiosporas transportadas por el viento, que dan lugar a lesiones pequeñas de 5mm de color verde pálido, en el envés se forman los telios, que tienen una coloración pardo clara o rosada; las lesiones aparecen deprimidas por la haz y prominentes en el envés; al producirse las basidiosporas forman una coloración blancuzca (figura 2) y con la edad se tornan de color café a rosado, la enfermedad afecta tallos y hojas y el número de pústulas depende del nivel de infección(EPPO 2004). Las hojas severamente atacadas se marchitan, cuelgan del tallo y poco a poco se secan por completo (Smith 1988, Monteverde 2006).

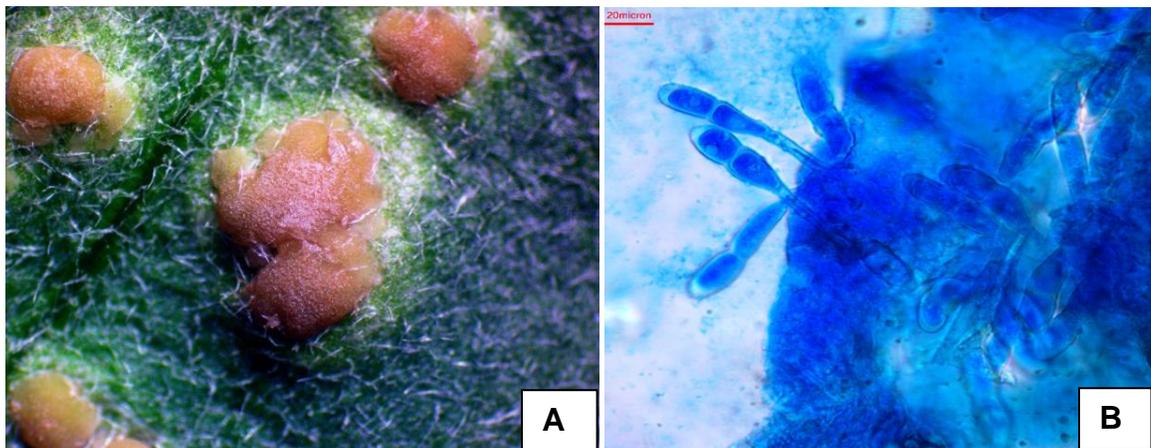


Figura 2. *P. horiana* (A) pústulas circulares (B) vista microscopia con aumento 40X.
Fuente: Centro de Diagnóstico Parasitológico (CDP) USAC 2014.

2.3.3 Importancia económica

La roya blanca del crisantemo fue descrita por primera vez en Japón en 1885. Desde entonces se ha reportado su presencia en Europa entre los años 1960 a 1966. En Sudamérica se reportó en 1980, apareciendo en Colombia en 1988, por lo cual las autoridades fitosanitarias dictan medidas de prevención y control para cultivadores y comercializadores que exportan crisantemo; por lo cual se regulan medidas de erradicación, cuarentena, prohibición de siembra en cultivos y decomiso de ramos afectados en puntos de venta, por lo tanto esta normatización debe ser cumplida para permitir el acceso a los mercados internacionales de crisantemos libres de la enfermedad roya blanca y así evitar restricciones fitosanitarias de los países compradores (Rojas 2005).

Mejía (2008) (Figura 3) realizó estudio de royas en *Crysantemum morifolium* RAMAT en San Juan Sacatepéquez, Guatemala, reporto que las zonas productoras elegidas para la toma de muestras se encontró *P. horiana* Henn con 100% de incidencia y más de 41% de severidad en la superficie infectada lo cual influye negativamente la producción de flores ocasión defoliación.

P. horiana es una enfermedad de importancia cuarentenaria y según MAGA (2014) los principales mercados internacionales para el Crisantemo son Estados Unidos (California) Ecuador y Colombia por que se deben cumplir con requerimientos fitosanitarios.

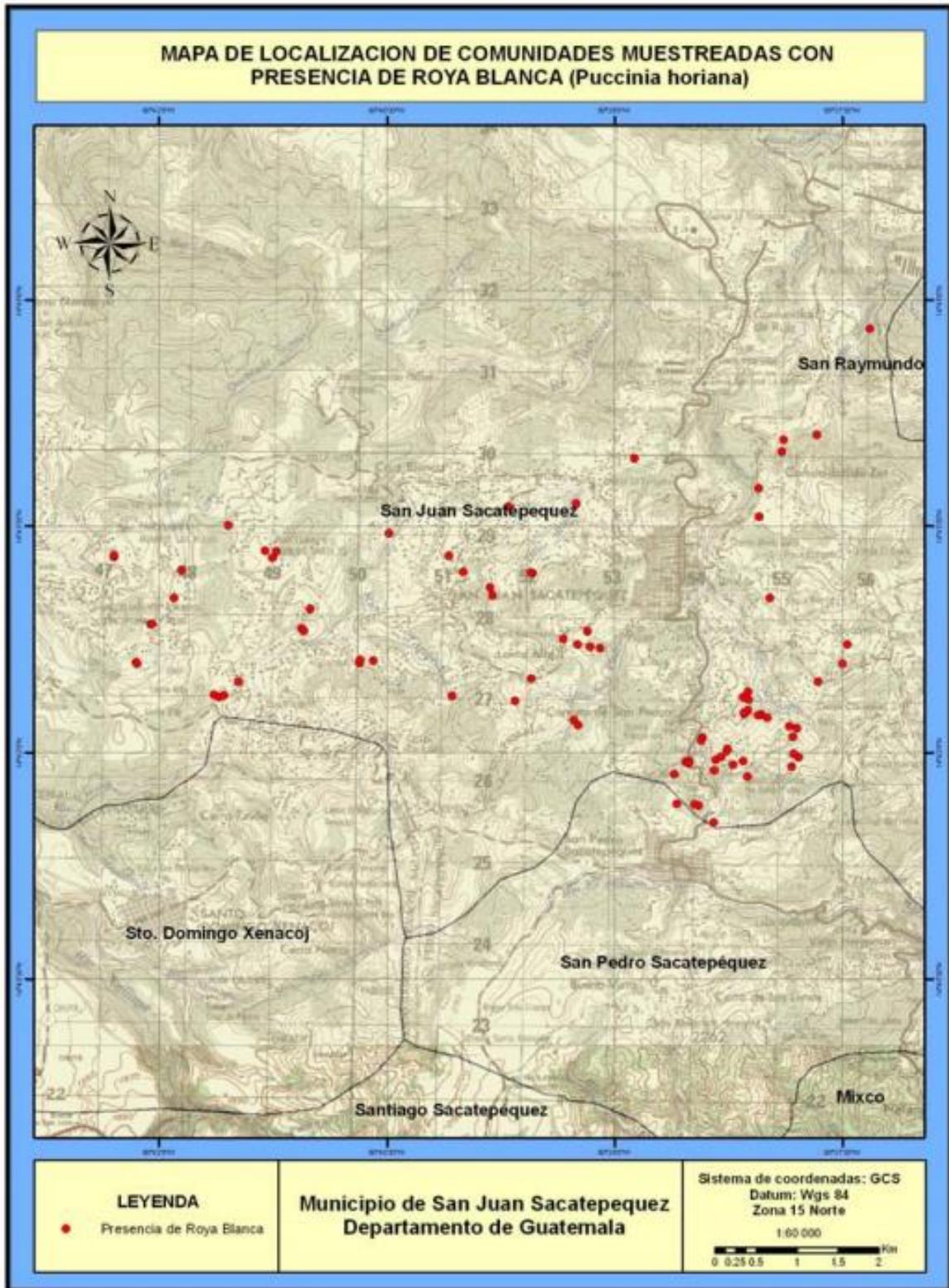


Figura 3. Mapa de localización de comunidades con presencia de roya blanca (*P. horiana* Henn) en el municipio de San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Fuente. Mejía 2008

2.3.4 Control

La roya blanca del crisantemo *P. horiana* es un patógeno muy agresivo y difícil de erradicar, por lo tanto el control debe estar enfocado hacia el manejo integrado del cultivo (Mejía 2008).

2.3.5 Control biológico

El control biológico es otra opción para el control de la roya, el control biológico se ha definido como “La acción de parásitos o patógenos para mantener la densidad de poblaciones de otro organismo a un promedio más bajo que el que existiría en su ausencia”.

Pérez *et al.*, (2003) define control biológico como el uso de parasitoides, depredadores, patógenos, antagonistas y poblaciones competidoras para suprimir una población plaga, haciéndola menos abundante y por tanto menos dañina que en ausencia de estos. Esta definición incluye a todos los organismos con capacidad de mantener y regular la densidad poblacional de organismos plaga a un nivel más bajo del que existiría en su ausencia, los cuales son considerados como agentes de combate o control biológico y están incluidos en la categoría de enemigo natural.

Baker (1987) considera que el control biológico de las enfermedades de las plantas permite reducir la cantidad de inóculo o la actividad de patógeno, a través de mecanismos producidos por una serie de organismos incluyendo a la planta.

Es ampliamente conocido que los patógenos presentes en la superficie de las partes aéreas de las plantas, son susceptibles al ataque de otros microorganismos, lo cual puede contribuir a la reducción de la incidencia de enfermedades foliares, sin embargo, para desarrollar un programa satisfactorio de control biológico es necesario el conocimiento de la biología y las necesidades ecológicas de los patógenos y sus enemigos naturales. En términos generales se considera que un organismo con capacidad de colonizar y establecerse en el filoplano (superficie de la hoja) es el mejor candidato para ser usado como agente de control biológico (Canjura Saravia 2000).

Dentro de los enemigos naturales más importantes de la roya blanca en crisantemo se encuentra el hongo hiperparásito *C. uredinicola* (Bensch *et al.*, 2012).

A. Importancia del control biológico

El uso intensivo de pesticidas para el control de enfermedades, plagas y malezas en la agricultura, ha promovido diversos problemas de impacto ambiental como la contaminación de los alimentos, el suelo, el agua y los animales, intoxicación de los agricultores, la resistencia de los agentes patógenos, plagas y malas hierbas a ciertos ingredientes activos de plaguicidas, surgimiento de nuevas enfermedades (los que se producen debido al uso de pesticidas), desequilibrio biológico, ciclo de los nutrientes y la materia orgánica alterna; la eliminación de organismos benéficos y la reducción de la diversidad biológica entre otros. Por otro lado, la protección de plantas por la medición del uso de pesticidas, tiene características atractivas como simplicidad, la previsibilidad y la necesidad de una comprensión limitada de los procesos básicos de la agro-ecosistema para su aplicación. Para el éxito de la aplicación de un fungicida de amplio espectro y el conocimiento importante de cómo aplicar el producto, con poca información necesaria sobre la ecología de las especies, interacciones biológicas, sistemas de ecología y el ciclo de nutrientes, entre otros (Bettiol 2009).

Sin embargo, sólo la sustitución de un producto químico por un biológica no es la situación adecuada, pero a pie al desarrollo de los sistemas de cultivo sostenibles para que sean menos dependientes del uso de pesticidas.

El concepto de agricultura sostenible implica una gestión adecuada de los recursos naturales, evitando la degradación de ambiente para permitir la satisfacción de las necesidades humanas de las generaciones actuales y futuras. Este enfoque cambia las prioridades de los sistemas convencionales de la agricultura en relación con el uso de fuentes no renovables, principalmente de energía, y cambia la visión en los niveles adecuados que oscilación entre la reducción de la dependencia de los productos químicos y otros insumos energéticos y un mayor uso de procesos en los sistemas agrícolas biológicos (Bettiol 2009).

2.3.6 *Cladosporium uredinicola*

A. Taxonomía e identificación de *Cladosporium*

El género *Cladosporium* fue descrito por H.F. Link en 1816 con *Cladosporium herbarum* como especie tipo. Encuestas de la historia genérica de *Cladosporium* se llevaron a cabo por De Vries en 1952 y David en 1997. Las primeras descripciones de *Cladosporium* eran indefinidas y las delimitaciones de géneros similares. Desde su introducción se han atribuido a *Cladosporium* más de 500 taxones. Debido a la circunscripción imprecisa de *Cladosporium*, no es sorprendente que numerosos hifomicetos superficialmente similares pero no relacionados han sido asignados a este género, por lo que es muy heterogénea.

Cladosporium es un hongo cosmopolita se encuentran comúnmente en la etapa de conidios (anamórfo), mientras que la etapa perfecta de hongos (teleomórfo) se forma en raras ocasiones. Sin embargo, los resultados de los estudios moleculares permitieron la clasificación de su teleomórfo a *Davidiella*. Anteriormente, este género se clasificó en el Filum Deuteromycota (hongos imperfectos), clase Hyphomycetes, orden Moniliales y familia Dematiaceae (hongos de color oscuro) (Ogórek 2012).

Ahora, debido a los grandes cambios en la taxonomía de los hongos, este género se reconoce como:

Reino: Fungi
 Filum: Ascomycota
 Clase: Dothideomycetes
 Orden: Capnodiales
 Familia: Davidiellaceae
 Género: *Cladosporium* (anamórfico)
 Especie: *C. uredinicola* Speg. 1912
 Sinónimos: *Cladosporium acaccicola* M.B. Ellis 1976
Cladosporium adianticola R.F. Castañeda 1987 (GBIF 2013)
 Teleomórfo: *Davidiella*

B. Descripción

C. uredinicola *In vivo* tiene colonias en soros muy densas, de color gris pálido oliváceo, el micelio se encuentra ocasionalmente sumergido, hifas ramificadas y tabicadas de 2-5 μm de ancho, a menudo constreñidas en los septos, tiene algunas células hinchadas de hasta 8 μm de diámetro. Conidióforos solitarios, que surgen de las hifas, están agregados o en grupos sueltos, erguidos, raramente decumbentes, a menudo algo geniculados, no ramificados o de vez en cuando ramificado con ángulo agudo de aproximadamente 30° , estrechado hacia el ápice. Los conidios son de color pálido marrón oliváceo generalmente se encuentran en cadenas ramificadas, rectas, rara vez poco curvadas, subglobosas, ovoides, limoniformes, estrechamente elipsoidales, fusiformes (Bensch *et al.*, 2012).

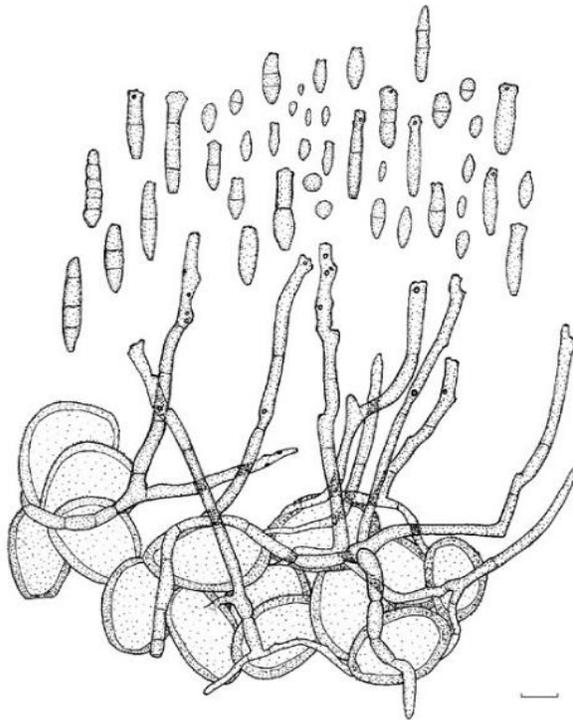


Figura 4. *C. uredinicola* Conidióforos derivados de hifas y conidios. Escala 10. Fuente: Bensch *et al.*, 2012

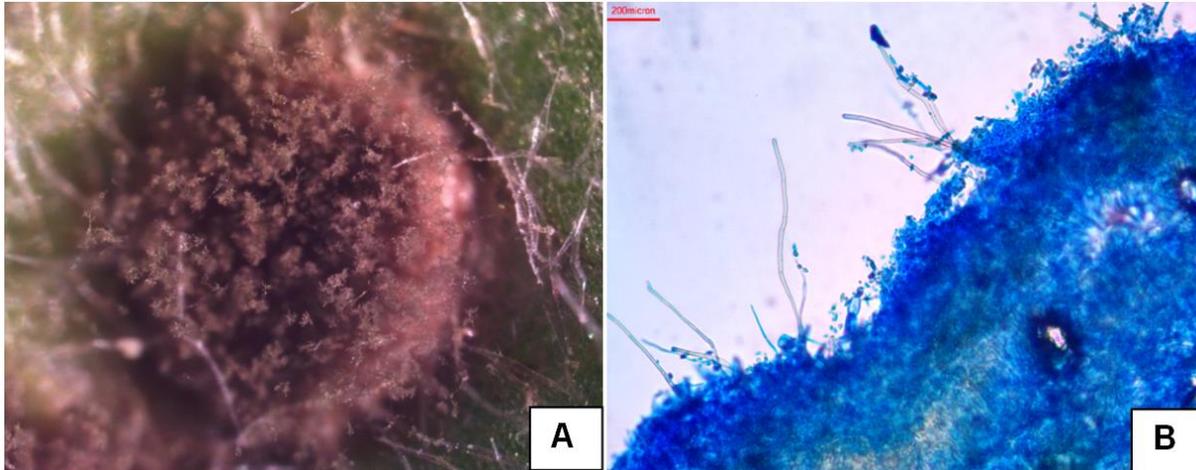


Figura 5. *C. uredinicola* colonizando pústulas de *P. horiana* (A) *C. uredinicola* con aumento 20X (B). Fuente: Centro de Diagnóstico Parasitológico (CDP) USAC 2014

2.3.7 Importancia

Según Sheta (1996) en 1976 Ellis señaló que *C. uredinicola* es un hiperparásito de *Puccinia spp.* y en 1983 J.A Taquiar reportó que *C. uredinicola* es un hiperparásito necrotrófico de esporas y micelio de *Puccinia violae*. En Orlando Florida, durante el periodo comprendido entre enero de 1994 y junio de 1995, observaron que 70 muestras de flores de corte crisantemos infectados con *P. horiana* fueron examinados por microscopio y estereoscopio (cada muestra consistió en una sola hoja o tallo o flor de la cabeza con una sola pústula de roya), de las cuales el 20% de estas muestras se encontró que tenían *C. uredinicola* hongo hiperparásito que crece en pústulas de la roya, mientras que con ningún efecto visible en los tejidos vegetales. Mientras que algunas pústulas (10%) se encontraban completamente cubiertos por *C. Uredinicola*.

En Venezuela se ha reportado como hiperparásito de royas a *C. uredinicola* y *Sphaerellopsis filum* ya que coloniza uredosoros de royas de las especies *Melampsoralarici-populina*, *Chrysomyxa abietis*, *Uromyces phaseoli* y *Puccinia melanocephala* (Colmenárez et al., 2006).

2.3.8 Modo de acción de *C. uredinicola*

Según W. Sheta (1996) un examen detallado de pústulas de *P. horiana* por microscopía de luz (40 y 65x) mostró que las teliosporas *P. horiana* fueron penetrados por hifas de *C. uredinicola*, primer informe de *C. uredinicola* sobre *P. horiana* en la naturaleza.

En México han realizado investigación en las que observaron el desarrollo de hifas de *C. uredinicola* dentro de las teliosporas de *P. horiana*, la hifa penetra por la parte apical de la teliospora y avanza hacia la segunda célula del pedicelo al llegar a la pared que divide a las dos células de la teliospora, la atraviesa y continua su desarrollo hasta llegar a la base del pedicelo, la teliospora colonizada muestra colapso y necrosis, y posteriormente se observa la presencia de abundantes conidióforos y conidios de *C. uredinicola* desarrollados sobre pústulas (García Velasco 2005).

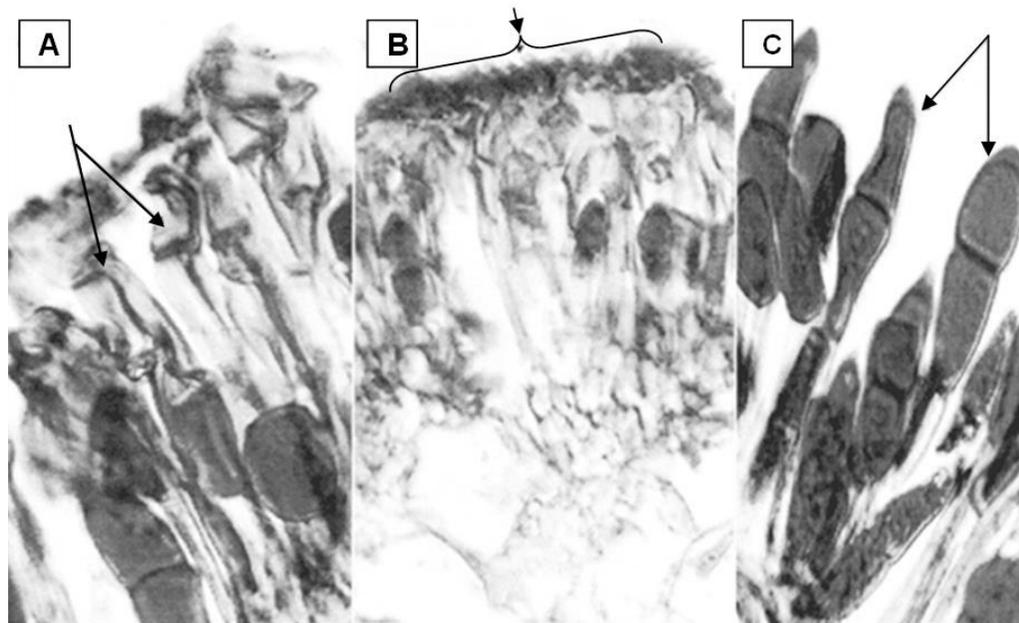


Figura 6. Hiperparasitismo de *C. uredinicola* sobre pústulas de *P. horiana* A) Micelio de *C. uredinicola* desarrollado dentro de las teliosporas; B) masa micelial del *C. uredinicola* indicada (flecha) desarrollada sobre la pústula con daños severos en las teliosporas; C) Teliosporas de *P. horiana* no parasitadas. Fuente: García Velasco 2005.

2.3.9 Reproducción masiva artesanal de hongos

Debido a que *C. uredinicola* tiene la capacidad de reproducirse masivamente por ser un hongo filamentoso, como parte del grupo de microorganismos de mayor utilización en los procesos de fermentación sólida ya que su crecimiento en forma de micelio e hifas, así como su tolerancia ante condiciones tales como baja concentración de agua y una alta presión osmótica, les proporcionan ventajas sobre otros microorganismos en la colonización de sustratos sólidos y su utilización como fuente de nutrientes para la propagación masiva (Cruz Martínez 2007).

El uso de hongos de control biológico como un componente de los programas de manejo integrado de plagas, constituye una alternativa viable para los productores ya que además de ser eficiente en el control de la plaga presenta muchos beneficios desde el punto de vista ambiental, agroecológico y de salud humana (Monzón 2001).

Para que los hongos biocontroladores estén disponibles para los usuarios deben producirse en cantidades suficientes, es decir, que se necesita implementar métodos de producción que además de obtener buenos rendimientos, proporcionen un producto de buena calidad. La producción de hongos de control biológico, se basa en la multiplicación masiva del hongo y sus estructuras reproductivas en un sustrato natural. Hasta la fecha se han evaluado diferentes tipos de sustratos naturales principalmente arroz, trigo, maíz, frijol y soya; siendo el arroz y el trigo los más utilizados actualmente (Monzón 2001).

2.3.10 Fermentación sólida

La fermentación sólida puede ser definida como el crecimiento de microorganismos (principalmente hongos) en materiales sólidos húmedos en la ausencia de agua libre. La habilidad de los microorganismos para crecer en un sustrato sólido es una función de sus requerimientos en cuanto a la actividad de agua, su capacidad de adherencia y penetración en el sustrato y su habilidad para asimilar mezclas de diferentes polisacáridos, debido a la naturaleza usualmente compleja de los mismos.

Los sustratos que tradicionalmente han sido utilizados para este procedimiento incluyen una variedad de productos agrícolas como: arroz, trigo, granos, soya y maíz entre otros. Así la fermentación sólida es un proceso en el cual un sustrato insoluble es fermentado con suficiente humedad pero sin agua libre. Este tipo de fermentación involucra interacciones de la biomasa microbiana con un sustrato sólido humedecido, en este el microorganismo puede crecer entre los fragmentos del sustrato. La biomasa microbiana dentro de la matriz consume el sustrato y secreta metabolitos y enzimas (Chávez García 2006).

2.3.11 Germinación de esporas

La penetración del hongo en el hospedero precisa del contacto y la adherencia de las esporas y/o de la primera hifa que resulta de su germinación (tubo germinativo) a la superficie del hospedero. Un posible mecanismo consiste en la excreción por parte del hongo de enzimas tales como cutinasas y estererasas que alteran la superficie del hospedero facilitando la adherencia.

En la mayoría de los hongos, la germinación de las esporas se produce de forma directa, emitiendo uno o varios tubos germinativos. El proceso de germinación de las esporas fúngicas se inicia con la hidratación y aumento de volumen de la espora, la hidrólisis de las reservas energéticas endógenas y la síntesis de proteínas y materiales estructurales de membrana y pared necesarios para la formación y elongación de los tubos germinativos. La germinación de las esporas se ve afectada por una serie de factores endógenos y exógenos. En muchas ocasiones las esporas se encuentran en un estado de dormición o de reposo metabólico, en el que la germinación se ve impedida por varios factores físicos o bioquímicos propios de la espora. La germinación de las esporas que no se encuentran sujetas a dormición se ve influida por el agua, la temperatura, la luz, la actividad microbiana y los inhibidores y estimulantes de origen diverso. Las esporas se desplazan hacia la zona de penetración, siendo en muchos casos estos movimientos orientados quimiotácticamente; tal desplazamiento finaliza con el enquistamiento de la espora y su adherencia a la superficie vegetal. Un proceso similar sucede en la elongación del tubo germinativo de muchos hongos fitopatógenos, que manifiesta una orientación en respuesta a estímulos químicos (quimiotropismo) o de contacto superficial (tigmotropismo). El crecimiento orientado del tubo germinativo requiere su adherencia a la superficie del hospedero, lo cual tiene lugar mediante la producción de una matriz extracelular de polisacáridos o glicoproteínas (Agrios 2005).

El siguiente paso en el establecimiento de la infección supone la penetración de los hongos en sus hospedadores. La penetración puede tener lugar de forma mecánica, por digestión enzimática o a través de aberturas naturales. Algunos penetran directamente a través de la superficie intacta del hospedero por medio de los tubos germinativos, por medio de apresorios o agregados hifales más complejos que reciben el nombre de cojines

de infección. La penetración también puede producirse por digestión enzimática de la cutícula y la pared celular (Agrios 2005).

A partir de la hifa que penetra en el hospedero se desarrollan las hifas primarias y varias hifas secundarias filamentosas, que son las encargadas de colonizar el tejido del vegetal por crecimiento intercelular y/o intracelular. La colonización del tejido huésped por crecimiento intercelular de las hifas ramificadas es propia de los hongos biotrofos.

La cantidad y la movilidad de esporas, pueden verse afectados por las condiciones físicas, tales como la temperatura y la humedad, por el tipo y la cantidad de exudados la planta u hospedero que produce en la superficie (Agrios 2005).

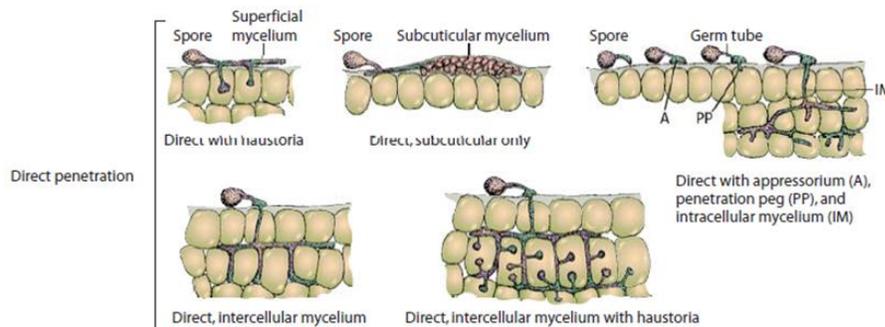


Figura7. Método de infección directa de las esporas de hongos. Fuente: Agrios 2005.

2.3.12 Cámara de Neubauer

La cámara de Neubauer de conteo es un aparato de vidrio óptico especial de precisión. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio, utilizadas principalmente para el análisis de sangre, pero también sirven para el conteo de bacterias, esporas y cualquier tipo de recuento citológico (GAB 2015.)

Cualquier experimento o estudio en el que se trabaje con células requiere que estas células estén en cantidades conocidas y adecuadas. Para cuantificar las células de una suspensión celular existen distintos métodos. A pesar de los grandes avances en la ciencia, aún hoy en día uno de los métodos más utilizados por su sencillez y bajo coste, es la observación microscópica directa y el recuento de células en cámaras de recuento celular. Dicho recuento se puede realizar tanto en el cuadrado grande central como en los

de las esquinas, dependiendo del tamaño de las células en estudio (ver figura 8) (GAB 2015).

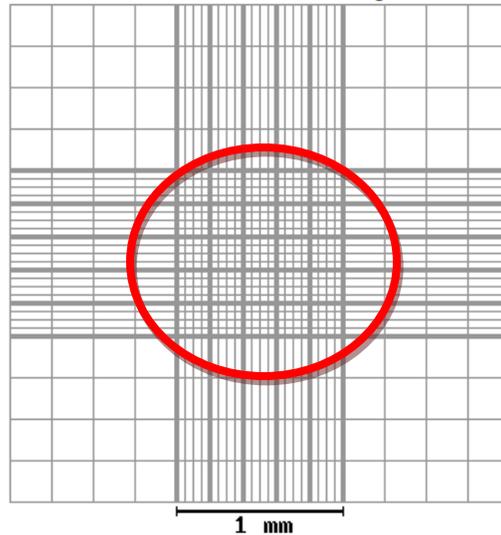


Figura 8. Cámara de Neubauer para conteo de conidios, (círculo) área utilizada para el conteo de *C. uredinicola*. Fuente. GAB 2015.

Para el recuento de conidios a través de la Cámara de Neubauer improved® se toma en cuenta para las lecturas el cuadro grande central (formado por 400 cuadros pequeños): $1\text{mm}^2/400$ cuadros que a su vez está formado por cuadros medianos (formados por 16 cuadros pequeños): $0.2\text{mm} \times 0.2\text{mm}$. Cámara que conforma un volumen útil de $0.2\text{mm} \times 0.2\text{mm} \times 0.1\text{mm} \times 25 = 0.1\text{mm}^3$ (figura 8), (GAB 2015)

A través de la siguiente fórmula se realiza el recuento y la conversión de conidios/ml

$$\frac{10 \text{ conidios}}{16 \text{ cuadros}} \times \frac{400 \text{ cuadros}}{0.1 \text{ mm}^3} \times \frac{1000 \text{ mm}^3}{1 \text{ cm}^3 (\text{o } 1 \text{ ml})} = 2.5 \text{ millones de conidios/ml}$$

Fórmula de recuento y conversión de conidios/ha

$$\frac{\text{No. De conidios}}{1 \text{ ml}} \times 0.1 \text{ mm}^3 \times 1 \times 10^{10} \text{ ha} = \text{Número de conidios/ha.}$$

2.4 MARCO REFERENCIAL

2.4.1 Ubicación

El estudio se realizó a nivel de laboratorio en el Centro de Diagnóstico Parasitológico (CDP), ubicado dentro de las instalaciones de la Unidad de Vinculación y Gestión de Recursos (UVIGER) Facultad de Agronomía, de la Universidad San Carlos de Guatemala.

2.4.2 Cepa de *Cladosporium uredinicola* CI99VR

CI99VR cepa de *C. uredinicola* detectada en áreas de producción de crisantemo en San Juan Sacatepéquez, Guatemala; su identificación basada en el nombre del hiperparásito, número de posicionamiento geográfico y nombre del productor del área donde fue detectada según el proyecto DIGI 7.26-2014 “Extracción y Formulación artesanal de *Cladosporium uredinicola* Biocontrolador de *Puccinia horiana*” (figura 9), (Álvarez *et al.* 2014).

CI99VR cepa que contenía características morfológicas (conidios oscuros formado por uno o dos células de tamaño variable, ovoides, cilíndricos, dispuestos en cadena simple o ramificada hifas ramificadas y tabicadas) del micelio y conidios correspondientes a *Cladosporium* identificación basada en las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998).

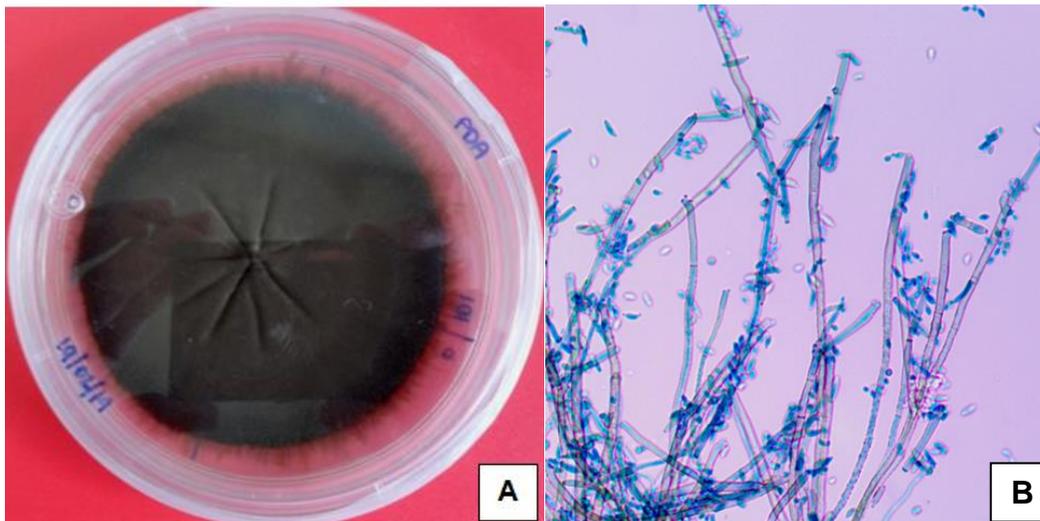


Figura 9. (A) Cepa CI99VR de *C. uredinicola* (B) Montaje en lactofenol extraído de la cepa CI99VR, se observa micelio y conidios de *C. uredinicola* con aumento 20X. Fuente: Noj Suruy 2014.

2.4.3 Cultivo de Crisantemo

El crisantemo es una planta ornamental cultivada en todo el mundo y comercialmente valiosa debido a sus numerosos híbridos, bastante apreciados por la inflorescencia, diversidad de colores, formas y durabilidad. El mejoramiento y la selección de crisantemos han sido realizados no solo con relación a la forma y color sino también a su adecuado cultivo, resistencia al frío-calor y resistencia postcosecha (Chávez García 2006).

Taxonómicamente el crisantemo se clasificó originalmente en el género de *Chrysanthemum* (del latín *Crysantemum* y este del griego *Chrysanthemom*, de *Chrysos*, oro y de *anthenom*, flor); sin embargo, recientemente la especie *Chrysanthemum grandiflora* Ramat. Se transfirió al género *Dendranthema*, por lo que su nombre científico correcto es *Dendranthema grandiflora* (Ramat) perteneciente a la familia Asteraceae (Chávez García 2006).

El crisantemo presenta tallos herbáceos y hojas alternas que pueden ser dentadas o con márgenes de distintas formas. Sus flores que son muy apreciadas por su elegancia y la variedad de sus colores, se presentan arregladas en inflorescencias llamadas botones, (figura 10), los cuales pueden ser solitarios o reunidos en corimbos. Se puede reproducir por semilla, por esqueje o por división de la planta. Existe una amplia gama de variedades catalogadas; por ejemplo, se pueden distinguir las de jardín y las variedades comerciales para flor cortadas; según la forma de cultivo en maceta. De acuerdo con el tamaño de los botones, destacan los crisantemos “pompones”, de flor pequeña, compacta, y los chinos de flores más grandes (Camargo *et al.*, 2000).



Figura 10. *D. grandiflora* (Ramat) Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

2.4.4 Importancia económica y distribución geográfica

El crisantemo es una de las especies ornamentales más cultivadas de todo el mundo. La producción es importante en varios países europeos, como los Países Bajos, Gran Bretaña y Francia; así como en Colombia, Estados Unidos y Canadá donde desde hace mucho tiempo es un cultivo industrializado y en Japón la flor del crisantemo alcanza un valor simbólico. En Europa central, Japón y Estados Unidos ha tenido siempre una gran demanda por lo que los trabajos de mejora genética son importantes y han dado lugar a numerosos cultivares con formas y colores. Después de la rosa, el crisantemo sigue siendo la flor cortada más vendida en las subastas holandesas de flores. El blanco es el color más vendido con una participación en el mercado del 40%; tiene que ver con el hecho de que los crisantemos blancos se prestan mejor para pintarse, lo que ahora se hace con colorantes ecológicos de la industria alimenticia. En segundo lugar están los crisantemos amarillos (31%), seguidos de los violetas (11%) (Camargo *et al.*, 2000).

En Guatemala la actividad productiva había sido muy estacional, prácticamente reducida a la festividad de Todos los Santos. Sin embargo, desde la diversificación de muchas formas hortícolas, el crisantemo puede actualmente ser comercializado casi todo el año como flor cortada y como planta ornamental en maceta. El sistema de producción programada a lo largo del año con cultivares multiflora ha sufrido un gran incremento en los últimos años. Para planta ornamental en maceta hay un gran aumento en la producción y demanda en formato de bola (Camargo *et al.*, 2000).

En cuanto a la importancia en Guatemala el municipio de San Juan Sacatepéquez, es considerado el principal productor de flores en Centro América, el tipo de tierra y su clima templado son los mejores aliados de sus habitantes en el cultivo de plantas ornamentales, entre las que sobresalen las rosas y los crisantemos con más de 20 variedades los cuales pueden ser exportación. Por su variedad y precios accesibles; las flores cultivadas en San Juan Sacatepéquez, se han posicionado muy bien en el mercado nacional e internacional, se estima que unas 5,000 familias viven específicamente de esa actividad (Velásquez 2009).

La Asociación de Floricultores Sanjuaneros – ASOFLORSA, se fundó el 14 de junio de 2005, sus socios se dedican al cultivo y comercialización de rosas y crisantemos de

excelente calidad, bajo buenas prácticas agrícolas y de manufactura, lo que les ha permitido posicionarse en mercados internacionales.

El cultivo y comercialización de crisantemo en San Juan Sacatepéquez se ha convertido en el icono de la economía del lugar, cuya principal peculiaridad es su carácter familiar, propiciando su continuidad de una generación a otra (Velásquez 2009).

2.4.5 Sustratos

Los sustratos empleados para la producción de microorganismos, en lo posible deben contener todos los elementos necesarios para una adecuada síntesis del material celular y para la producción de metabolitos, cuando son requeridos.

Los microorganismos involucrados en la fermentación sólida, en su mayoría hongos filamentosos, sintetizan enzimas que degradan sustancias poliméricas en compuestos fácilmente asimilables. Estos mismos microorganismos tienen la habilidad de convertir los compuestos degradados en enzimas y otro tipo de productos de utilidad (Chávez García 2006).

Los hongos filamentosos se caracterizan por ser organismos modulares, los cuales crecen por la interacción de módulos usualmente para producir un patrón de ramificación. La hifa tubular que emerge de la spora se elonga en la punta y al mismo tiempo que crece la hifa, se van formando nuevas ramificaciones, por estas y otras propiedades fisiológicas, enzimológicas y bioquímicas, los hongos filamentosos son los que se encuentran mejor adaptados para la fermentación sólida. El modo del crecimiento hifal le otorga a estos organismos el poder de penetrar en el sustrato sólido. Eso también le otorga un mayor ventaja sobre los organismos unicelulares durante la colonización del sustrato y el empleo de los nutrientes disponibles (Chávez García 2006).

- **Arroz**

El arroz es el cereal más rico en almidón, en torno al 70%. Su contenido de proteína es bajo 7.3%, pero es rico en lisina 4.1%, su contenido en cenizas es muy escaso y su aporte en macrominerales prácticamente despreciable. Así mismo, su contenido en vitaminas es muy bajo.

El arroz original es rico en aceite que a su vez es rico en vitamina E. Este aceite tiene un alto contenido de ácido linoléico por lo que se enrancia muy fácilmente. De aquí que la fracción grasa del arroz se elimine y que el grano comercial contenga cantidades mínimas de grasa (<0.6%). El contenido de energía del grano de arroz es elevado, debido a su alto contenido de almidón y la ausencia de factores anti nutricionales (Chávez García 2006).

- **Maíz**

El maíz constituye uno de los cereales muy completo, que aporta numerosos elementos nutritivos y materiales energéticos, es una destacada fuente de vitaminas del grupo B y de minerales. Posee un valor nutritivo similar al de los otros cereales, aunque se diferencia de éstos en su elevado contenido en carotenos que ningún otro cereal los contiene (DACSA 2011).

El grano de maíz difiere considerablemente en su composición química. La cubierta seminal o pericarpio se caracteriza por un elevado contenido de fibra cruda, aproximadamente el 87%, la que a su vez está formada fundamentalmente por hemicelulosa 67%, celulosa 23% y lignina 0.1%. El endospermo, en cambio, contiene un nivel elevado de almidón 87%, aproximadamente 8% de proteínas y un contenido de grasas crudas relativamente bajo (FAO 1993).

2.4.6 Fermentación sólida

La eficiencia y productividad de la fermentación sólida son afectadas por varios factores. La característica más importante es el contenido de humedad del medio, lo cual diferencia este proceso de los cultivos líquidos. El agua es esencial para el crecimiento microbiano. Dentro de los factores ambientales que afectan el crecimiento microbiano en la fermentación se encuentran:

- **Actividad de agua y contenido de humedad del sustrato**

El contenido de humedad es factor crítico en el proceso de fermentación sólida debido a que esta variable tiene influencia sobre el crecimiento, biosíntesis y secreción de diferentes metabolitos. Un bajo contenido de humedad causa reducción en la solubilidad de los nutrientes del sustrato, y alta tensión de agua. Por otro lado un alto nivel de

humedad puede causar una reducción en la producción de enzimas. Generalmente el contenido de agua del sustrato oscila entre 30 y 70%. La actividad de agua de los sustratos sólidos puede estar significativamente por debajo de 0.99, especialmente en las fermentaciones sólidas donde el agua libre permanece casi ausente. Esto tiende a favorecer a los hongos filamentosos, los cuales en su mayoría crecen bien con actividades de agua entre 0.93 y 0.98 (Chávez García 2006).

2.5 OBJETIVOS

2.5.1 Objetivo general

- Determinar un sustrato eficaz para la propagación masiva de *Cladosporium uredinicola*

2.5.2 Objetivos específicos

- Determinar que sustrato produce la mayor cantidad de conidios en periodos de incubación de 8, 12 y 16 días.
- Establecer la viabilidad de conidios de *Cladosporium uredinicola* en sustratos evaluados en los distintos periodos de incubación a las 18 y 24 horas.

2.6 HIPÓTESIS

Se espera que al menos un sustrato sea eficaz para la propagación masiva de *Cladosporium uredinicola* biocontrolador de *Puccinia horiana* P. Hennings.

2.7 METODOLOGÍA

2.7.1 Ensayo experimental

Las unidades experimentales de la investigación corresponden a sustratos naturales que se distribuyeron en un diseño completamente al azar (DCA) constituido por 3 tratamientos y 4 repeticiones.

2.7.2 Descripción de tratamientos

Se evaluaron arroz blanco, arroz precocido y maíz quebrado (cuadro 5), como unidad experimental se utilizaron bolsas de polipropileno con 50 gramos de sustrato natural e inoculadas con unidades formadoras de colonia de *C. uredinicola*.

Cuadro 5. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Sustrato natural
T1	Arroz blanco
T2	Arroz pre-cocido
T3	Maíz quebrado

Fuente: Noj Suruy 2014.

2.7.3 Modelo estadístico

El modelo estadístico para el análisis de la variable de respuesta: número de conidios producidos y viabilidad de *C. uredinicola* se describe a continuación

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

En donde:

Y_{ij} = Variable de respuesta referida a número de conidios y viabilidad de *C. uredinicola*.

μ = Media general de la variable de respuesta: número de conidios y viabilidad de *C. uredinicola*.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento desde i=1 hasta j=3

ε_{ij} = error experimental asociado con la ij-ésima unidad experimental desde i= 1 hasta j= 12

2.7.4 Preparación del sustrato

Para la fase de producción masiva de conidios de *C. uredinicola* se utilizaron sustratos naturales los cuales fueron: arroz blanco, arroz precocido y maíz quebrado.

- En un beaker de 1000 ml se colocó 500 gramos de sustrato con 350 ml de agua destilada estéril, se procedió a realizar la primera esterilización a través de la autoclave durante 20 minutos a 121°C y 20 PSI, luego se dejó enfriar.
- Se realizó el llenado de bolsas, se agregó 50 gramos del sustrato previamente esterilizado en bolsas de polipropileno resistentes a condiciones de esterilización húmeda
- Posteriormente se cerraron a través de dos dobleces y engrapado. Cabe mencionar que las bolsas no pueden quedar selladas en su totalidad ya que el hongo necesita de oxígeno para el crecimiento y producción de conidios (figura 11).
- Luego se realizó la esterilización de las unidades experimentales (bolsas con sustrato) se colocó en autoclave durante 15 minutos a 121°C y 20 PSI y se dejó enfriar por 24 horas. Procedimiento que se realizó a los tres sustratos naturales.



Figura 11. Esterilización de los sustratos naturales. A) primera esterilización de los sustratos, B) segunda esterilización de las unidades experimentales (bolsas con sustrato). Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

2.7.5 Preparación de suspensión inoculante

Se tomaron cajas petri que contenían la cepa CI99VR de *C. uredinicola*, se realizó estriados con ayuda del aza bacteriológica y 10 ml de agua destilada estéril con tween 20 al 0.1% con la finalidad de desprender los conidios de *C. uredinicola* (figura 12), el volumen obtenido se colocó en un beaker de 125 ml y se adicionó 40 ml de agua destilada estéril, posteriormente se realizaron lecturas a través de la cámara Neubauer hasta obtener concentración de 1×10^6 conidios/ml para proceder a la inoculación a los sustratos.

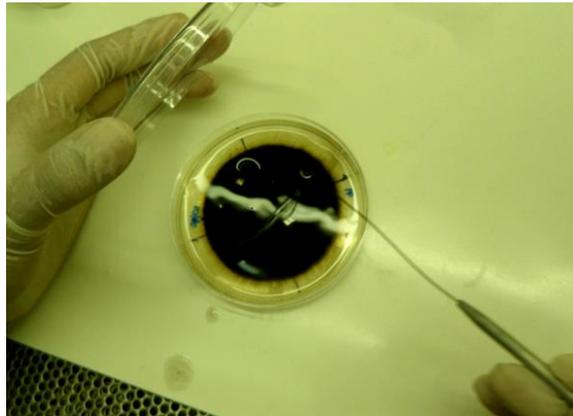


Figura 12. Procedimiento empleado para obtener suspensión inoculante de *C. uredinicola* del aislado en medio PDA. Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

2.7.6 Inoculación e incubación

Después de haber obtenido la suspensión inoculante se agregó 3 ml a las unidades experimentales (bolsas con sustrato), para ello se utilizaron jeringas de 10 ml proceso realizado en forma de inyección (figura 13), luego se agitaron las bolsas con sustrato y se homogenizó, posteriormente se incubaron a 25°C en total oscuridad para estimular la germinación de los conidios y producción de micelio, se agitaron nuevamente las bolsas a las 96 horas para estimular esporulación y así incrementar la cantidad de esporas por unidad experimental.

Las unidades experimentales se dejaron en incubación en distintos periodos los cuales fueron 8, 12 y 16 días.



Figura 13. Inoculación de la suspensión de *C. uredinicola* a los tratamientos, proceso realizado en la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia. Fuente: Noj Suruy 2014.

2.7.7 Variables de respuesta

Las variables de respuesta para el estudio de propagación masiva de *C. uredinicola* fueron las siguientes:

1. Cantidad de conidios de *C. uredinicola* producidos por unidad de muestreo a los 8, 12 y 16 días de incubación.
2. Viabilidad de *C. uredinicola* por unidad experimental
 - A las 18 y 24 horas.

A. Cantidad de conidios por unidad de muestreo a los 8, 12 y 16 días de incubación

Para la obtención de esta variable se procedió a cosechar las unidades de muestreo a los 8, 12 y 16 días de incubación, se homogenizo el producto de cada unidad de muestreo se pesaron 10 gramos y se diluyeron en 100 ml de una solución de agua destilada estéril con tween 20 al 0.1% (figura 14), luego fueron removidos los conidios, la suspensión se agitó con micro espátula por 3 minutos a manera de romper todos los agregados que pudieran existir.

La suspensión obtenida fue la dilución 1×10^{-1} de la cual se tomo 1ml que fue depositado en un tubo con 9 ml de agua destilada estéril, procedimiento que fue repetido hasta obtener una dilución de 1×10^{-3} para la realización del recuento de conidios por mililitro de suspensión pues con esta dilución fue posible el conteo de conidios.

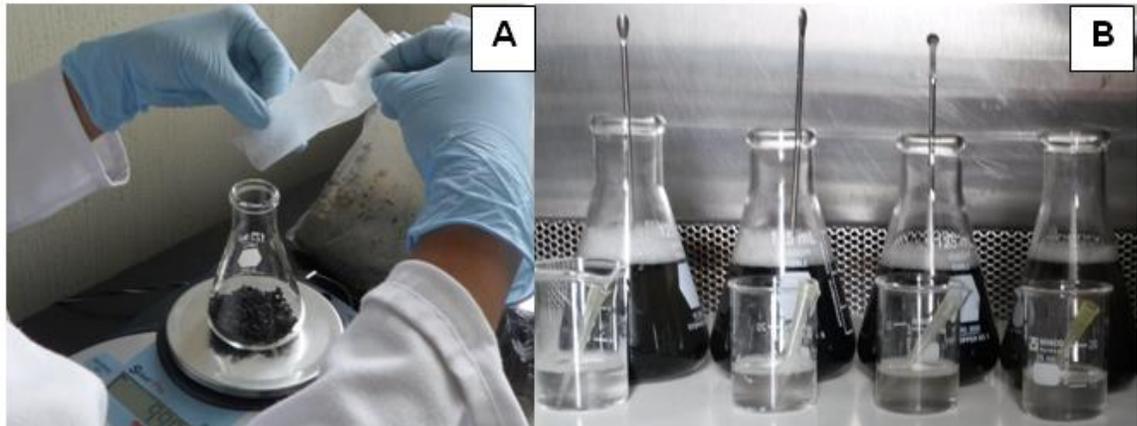


Figura 14. A. Realización de la suspensión inoculadora B. Dilución de 1×10^{-3} para realización del recuento de conidios. Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

El recuento de conidios se realizó a través de la cámara de Neubauer, se llevaron a cabo 4 lecturas (cuadro 17A a 22A) por cada unidad experimental (bolsa con sustrato), este procedimiento permitió determinar la cantidad de unidades formadoras de colonia por unidad de volumen. Para el recuento se hizo reconocimiento de conidios de color pálido marrón oliváceo generalmente se encuentran en cadenas ramificadas, rectas, rara vez poco curvadas, subglobosas, ovoides, limoniformes, estrechamente elipsoidales, fusiformes (figura 15).

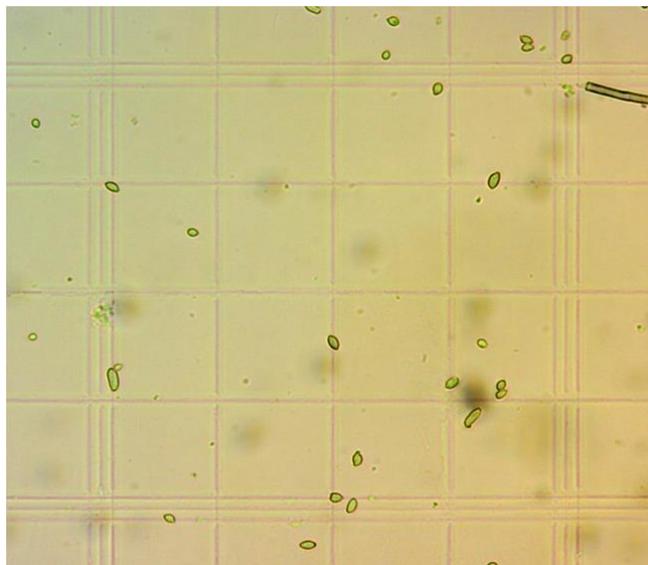


Figura 15. Reconocimiento y recuento de conidios de *C. uredinicola* a través de la cámara de Neubauer. Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

Se realizó duplicado de suspensión de conidios provenientes del recuento en la cámara de flujo laminar para evitar contaminación en la prueba de viabilidad o porcentaje de germinación de *C. uredinicola* lo cual se trabajó el mismo día de recuento de conidios.

B. Viabilidad de *C. uredinicola* por unidad experimental

Porcentaje de Viabilidad a las 18 horas y 24 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación

Para obtener este dato, se prepararon cajas de petri con agar-agua al 3% a las cuales se realizó cuadrícula y se depositaron alícuotas que contenían esporas (provenientes de suspensión de conidios) (Figura 16) las cajas se incubaron a 25°C durante 18 y 24 horas

Al momento de la lectura se agregó azul de lactofenol a cada caja para detener la germinación de esporas y la tinción de las hifas de conidios germinados.

Posteriormente se cortaron cuatro discos de agar-agua donde fueron depositadas las alícuotas, estos se colocaron sobre un portaobjetos y fueron cubiertos con un cubreobjetos. Estas láminas fueron observadas en 10 campos visuales de 40x, se tomó en cuenta los conidios germinados y no germinados.

Se registró el número de conidios germinados, aquellos cuyo tubo germinativo sea como mínimo dos veces mayor al diámetro del conidio (Cañedo y Ames 2004).

Con los datos obtenidos de conidios germinados y no germinados se calculó el porcentaje de viabilidad o germinación a través de la siguiente fórmula:

$$PV = \frac{Cg}{Ct} * 100$$

Dónde:

PV = porcentaje de viabilidad o germinación

Cg = Número de conidios germinados

Ct = Número de conidios totales



Figura 16. Siembra de solución de esporas en medio agar-agua al 3%. Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

2.7.8 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos durante la evaluación de los tratamientos (arroz blanco, arroz precocido y maíz quebrado) fueron analizados mediante una prueba de hipótesis con un nivel de confianza de 95% por medio de análisis de Varianza (ANDEVA), en la obtención de resultados fueron significativamente diferente los tratamientos, posteriormente se realizó comparaciones de medias a través de Tukey al 5% para ello se utilizó el programa INFOSTAT lo que permitió estimar la diferencia entre las medias para las distintas variables de respuesta evaluadas.

A. Cantidad de conidios de *C. uredinicola* por unidad de muestreo a los 8, 12 y 16 días de incubación

Ho: La media de cantidad de conidios a los 8, 12 y 16 días de incubación en las unidades de muestreo son iguales.

Ha: Existe diferencia significativa en la media de cantidad de conidios al menos en un periodo de incubación en las unidades de muestreo

B. Viabilidad de *C. uredinicola* por unidad experimental

Porcentaje de conidios viables de *C. uredinicola* a las 18 horas

Ho: La media de porcentaje de viabilidad de conidios de los sustratos evaluados a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación en las unidades de muestreo son iguales.

Ha: Existe diferencia significativa en la media de porcentaje de viabilidad de conidios de los sustratos evaluados a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación en las unidades de muestreo

Porcentaje de conidios viables de *C. uredinicola* a las 24 horas

Ho: La media de porcentaje de viabilidad de conidios de los sustratos evaluados a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación en las unidades de muestreo son iguales.

Ha: Existe diferencia significativa en la media de porcentaje de viabilidad de conidios de los sustratos evaluados a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación en las unidades de muestreo

Para el control de calidad de formulaciones de hongos para producción comercial debe tener porcentaje de viabilidad cercana a 100% en periodo de incubación de 24 horas, por lo tanto para la elección del mejor sustrato este debe cumplir con requisitos establecidos por Monzón (2001) es decir debe tener la mayor cantidad de conidios/gr y tener germinación cercana a 100%.

2.8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Previo a la presentación de resultados de la evaluación de tres sustratos naturales: arroz blanco (T1), arroz precocido (T2) y maíz quebrado (T3) para la propagación masiva de *C. uredinicola*, se presentan las pruebas realizadas en las cuales se estableció la metodología para dicha propagación:

1. Determinación del calibre de plástico resistente a proceso de esterilización

En esta prueba se determinó el calibre de bolsa a utilizar para la producción masiva del hongo hiperparásito, los tipos de bolsas fueron: arroba de calibre 6 simple, bolsa de arroba calibre 6 doble, plástico para forrar cuaderno simple, plástico para forrar cuaderno doble y bolsa de calibre 3 mm de 8" x 8" x 3.0 mm

A cada una de las bolsas se agregaron 50 gramos de arroz y 35ml de agua destilada, se esterilizaron por 7 minutos a 121°C, se determinó que las bolsas mencionadas en las opciones a, b, c y d no resistieron la temperatura de la autoclave pues presentaron orificios en sus estructuras, se concluyó que las bolsas adecuadas deben ser de calibre 3 mm de grosor con dimensiones 8" x 8" x 3.0 mm ya que soportaron las condiciones de esterilización húmeda y no presentaron orificios en sus estructuras.

2. Cantidad de agua y período de esterilización

Se procedió a realizar la preparación, esterilización de sustratos e inoculación de *C. uredinicola* se agregó 10ml de suspensión inoculante con concentración 1×10^6 conidios a los sustratos, sin embargo después de haber realizado la inoculación mostraron contaminación, se obtuvo como resultado: olor desagradable y una coloración amarilla, así mismo se observó que el sustrato expulsó el agua absorbida. Para ello se realizaron pruebas de cantidad de agua y tiempo de esterilización, se dejó absorber el agua por 24 horas; las pruebas fueron: 25ml de agua por 17 min, 30ml de agua por 12 min, 30 ml de agua por 17 min y 35 ml de agua por 20 min, todas las opciones fueron esterilizadas a 118°C y 20PSI. De las pruebas realizadas ninguna opción presento resultados satisfactorios, por lo que, se realizó otra prueba: se esterilizó el sustrato por 20 minutos a

121°C y 20 PSI y luego se esterilizaron las bolsas con sustrato por 15 min a 121°C y 20PSI, la cual mostró los mejores resultados en cuanto a la esterilización de los sustratos.

3. Cantidad de suspensión inoculante

Luego se realizó prueba de cantidad de suspensión inoculante en la cual se evaluaron suspensiones de 3 y 5 ml, la mejor opción fue 3mly que presento las siguientes características: no se expulsó el agua absorbida, no presento olor desagradable y ausencia de coloración amarilla.

4. Sellado de bolsas

Las bolsas con sustrato se cerraron a través de una máquina de sellado, sin embargo se observó germinación baja, por lo que, se realizó pruebas de sellado las cuales fueron: semisellado con agujero en la esquina superior y cierre con 2 dobleces y engrapado

Se observó que al momento de la incubación las bolsas con sustrato no pueden quedar selladas en su totalidad ya que el hongo necesita de oxígeno para el crecimiento y producción de conidios por lo tanto la mejor opción fue la de cierre con dos dobleces y engrapado.

Así mismo, antes de iniciar los resultados y discusión se menciona que durante el ensayo experimental realizado en los sustratos arroz blanco (T1) y arroz precocido (T2) no fue posible la obtención de datos para las variables de respuesta 1. Cantidad de conidios de *C. uredinicola* producidos por unidad de muestreo en distintos periodos de incubación 2. Porcentaje de esporas viables a las 18 y 24 horas en los distintos periodos de incubación, debido a que ambos demostraron alto contenido de humedad la suspensión inoculante añadida no fue absorbida por el grano(ver figura 17) lo que no permitió la adherencia de esporas y penetración del tubo germinativo de *C. uredinicola* al sustrato así mismo se obtuvo contaminación bacteriana inespecífica, características que se observaron durante los 6 a 16 días de incubación; según Pérez Guerra *et al.*, (2003) considera que la humedad es un factor crítico en este proceso debido ya que un alto contenido de la misma puede causar una reducción en la producción de enzimas, así mismo existe reducción de porosidad del sustrato y restringe de este modo la transferencia

de oxígeno y aumenta el riesgo de contaminación bacteriana, lo cual no permite la formación de hifa y estructuras reproductivas.



Figura 17. Tratamiento 1 + 3 ml de suspensión inoculadora (izquierda), Tratamiento 2 + 3 ml de suspensión inoculadora, se observa el exceso de humedad en el sustrato (circulo) (derecha). Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

2.8.1 Cantidad de conidios de *C. uredinicola* producidos por unidad de muestreo a los 8, 12 y 16 días de incubación

El sustrato maíz quebrado (T3) evidencio un crecimiento abundante de *C. uredinicola*, ya que a las 96 horas después de la inoculación se evidencio la colonización y presencia de micelio de color gris pálido oliváceo, micelio que se encontraba ocasionalmente sumergido, hifas ramificadas y tabicadas, luego empezó a mostrar una coloración más oscura la cual se ve influenciada a la maduración del hongo ya que demostró incremento en la cantidad de conidios por lo que cubrió el grano en su totalidad (figura 18) Pérez Guerra *et al.*, (2003) y Padmasari (2005) afirman que los hongos filamentosos se caracterizan por ser organismos modulares, los cuales crecen por la interacción de módulos usualmente para producir un patrón de ramificación y tienen la capacidad de reproducirse masivamente por medio de la fermentación sólida, lo que se observó en *C. uredinicola*. Por lo tanto se procedió a evaluar la productividad de Unidades formadoras de colonia UFC/ml o Conidios/ml en dicho sustrato en periodos de 8, 12 y 16 días de incubación.

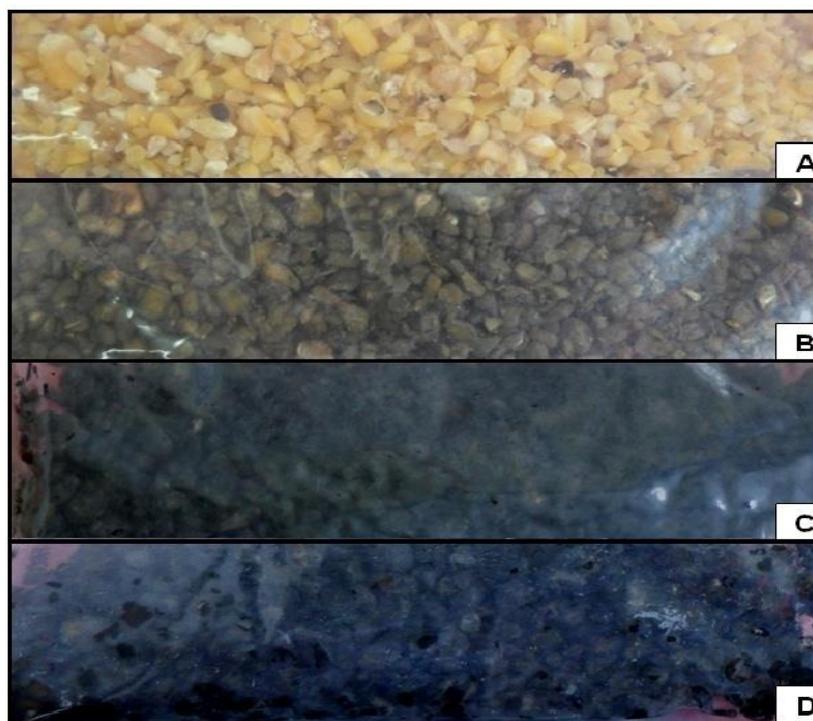


Figura 18. Sustrato maíz quebrado (T3) colonización y crecimiento de *C. uredinicola* en las unidades experimentales (bolsas con sustrato) en los diferentes periodos de incubación **A.** Testigo absoluto **B.** 8 días, colonización y germinación **C.** 12 días, maduración y **D.** 16 días, esporulación. Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

Se observa en el cuadro 6 el resumen de cantidad de conidios producidos a los 8, 12 y 16 días de incubación para el sustrato maíz quebrado (T3), cantidad que fue expresada en conidios/ml la cual varía con respecto al tiempo con tendencia a incrementarse diariamente.

Cuadro 6. Resumen de cantidad conidios/ml de sustrato maíz quebrado (T3) a los 8, 12 y 16 días de incubación.

Tratamiento 3 (Maíz quebrado)	Cantidad de conidios/ml		
	8 Días	12 Días	16 Días
Repetición 1	2384375	11921875	14406250
Repetición 2	3584375	12093750	14968750
Repetición 3	2890625	12046875	27062500
Repetición 4	4171875	11343750	27781250
Promedio	3257813	11851563	21054688
	3.26×10^6	1.19×10^7	2.11×10^7

Fuente: Noj Suruy 2014.

Según los resultados obtenidos la mayor cantidad de producción de conidios se logró a los 16 días después de la inoculación con un promedio de 2.11×10^7 conidios/ml y la producción más baja fue a los 8 días con un promedio de 8.59×10^6 conidios/ml, lo que quiere decir que la tasa de incremento por día puede ser un valor para la toma de decisiones al momento de seleccionar el periodo de incubación se obtuvo producción aceptable a partir de los 12 días de incubación con un promedio de 1.19×10^7 .

Cuadro 7. Resumen del ANDEVA para la variable de cantidad de conidios/ml a los 8, 12 y 16 días de incubación.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F	P-VALOR
TRATAMIENTO 3	1069651555029270		356550516764323.00	25.97	0.0001*
ERROR	164780302734375	2	13731691894531.30		
TOTAL	1234431853027340	5			

*Significancia estadística 5%, C.V. = 40.99%. Fuente: Noj Suruy 2014.

Según el análisis de varianza ($p < 0.0001$) existe diferencia significativa en la media de cantidad de conidios al menos en un día de incubación en las unidades de muestreo, así mismo se obtuvo coeficiente de variación de 40.99%, se realizaron pruebas para determinar si se violó alguno de los supuestos del análisis de varianza.

Se determinó que, no se violaron los supuestos de la varianza (apéndice II), sin embargo, el coeficiente de variación se debe al incremento de conidios con respecto al periodo de incubación, es decir, que son medidas repetidas en el tiempo, por lo tanto, la primera toma de datos a los 8 días se obtuvo una producción de conidios/ml menor comparado con los 16 días que se obtuvo incremento en la producción de conidios/ml, además de, que el análisis realizado a través de modelo lineal no reconoce los datos en periodo de tiempo los cuales tienden a incrementarse cada día, por lo tanto se recomienda realizar un modelo mixto el cual reducirá el coeficiente de variación y separará las varianzas para cada día de incubación (Gómez *et al.*, 2012).

Cuadro 8. Comparación de medias a través de prueba de Tukey para la variable cantidad de conidios de *C. uredinicola* en el tratamiento 3, a los 8, 12 y 16 días de producción.

TRATAMIENTO 3 (Maíz quebrado)	Media de cantidad de conidios/ml	Media de Cantidad de conidios/ha	Tukey (≤ 0.05)
16 Días	2.11×10^7	2.11×10^{16}	A
12 Días	1.19×10^7	1.19×10^{16}	B
8 Días	3.26×10^6	3.26×10^{15}	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Fuente: Noj Suruy 2014.

Al observar el cuadro 8, se evidencia que estadísticamente existe diferencia significativa en la comparación de medias de cantidad de conidios en los 8, 12 y 16 días de incubación, el mejor periodo de incubación fue a los 16 días con una producción de 2.11×10^7 conidios/ml. Según Dorta *et al.*, (1996) todos los periodos de incubación cumple en cantidad de conidios para la aplicación práctica de hongos de control biológico, el nivel requerido debe estar alrededor de 1×10^{12} conidios/hectárea y *C. uredinicola* cumple con dicho requerimiento, se obtuvo media de conidios/ha de 2.11×10^{16} a los 16 días y 1.19×10^{16} a los 12 días y a los 8 días muestra una producción de 3.26×10^{15} como se observa en el cuadro 8, sin embargo a los 8 días no se obtuvo un porcentaje de viabilidad mayor a 85% (inciso 2.8.2.1). Por lo tanto se recomienda la producción masiva de *C. uredinicola* en el sustrato natural de maíz quebrado y un periodo de incubación de 16 días.

En la figura 19 se observa el incremento exponencial en la producción de conidios/ml ó UFC/ml de *C. uredinicola* en el sustrato de maíz quebrado (T3) con respecto al periodo de incubación en el conteo de conidios realizado para los días 8, 12 y 16 mostró al inicio un crecimiento lento pero luego manifestó un incremento exponencial lo que indica que existe una tasa de crecimiento que se mantiene constante en la cantidad de conidios y que se espera duplicarse en un periodo cada vez más corto, obteniéndose $r=0.87$ lo que indica que los datos obtenidos se relacionan en 87% por lo tanto se recomienda que se evalúe la producción de conidios por periodo mayor a 16 días hasta que este alcance su máximo potencial y así observar el comportamiento de una curva de crecimiento para la producción masiva de *C. uredinicola*, ya que, en esta investigación el periodo evaluado fue de 0 a 16 días.

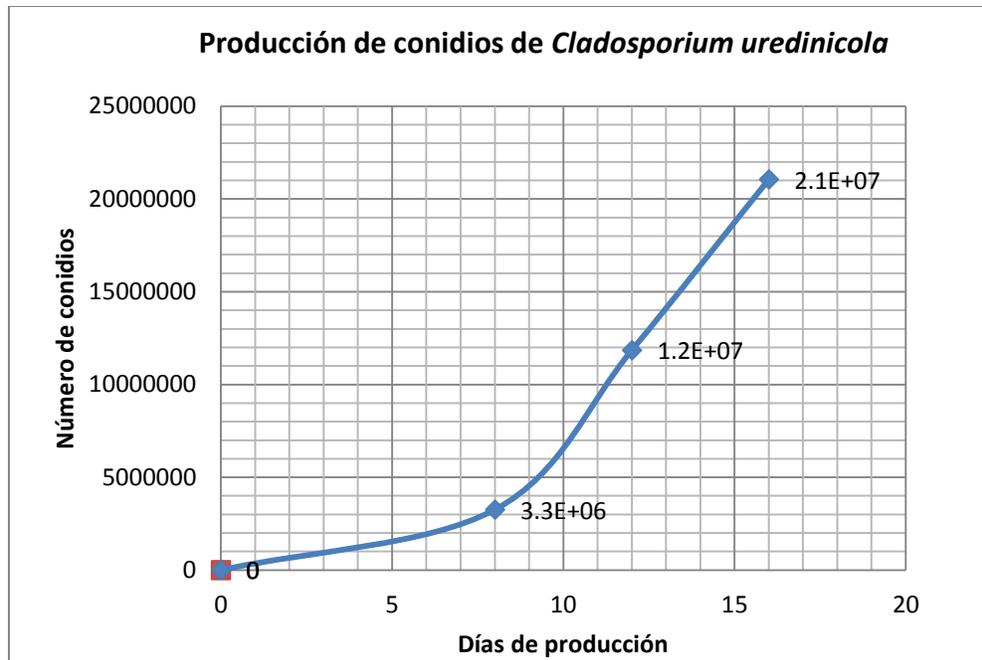


Figura 19. Comportamiento del crecimiento de *C. uredinicola* en el sustrato maíz quebrado (T3). $R=0.87$. Fuente: Noj Suruy 2014.

2.8.2 Viabilidad de *C. uredinicola* por unidad experimental

Para esta variable de respuesta se observó la germinación de los conidios de *C. uredinicola* obtenidos de sustratos naturales evaluados, sobre el medio Agar agua 3% (figura 20) se tomó en cuenta los parámetros establecidos por Pérez Guerra *et al.*, (2003) donde una germinación satisfactoria son aquellos cuyo tubo germinativo fuera dos veces mayor al diámetro del conidio, así mismo Monzón (2001) considera que un producto de buena calidad debe tener una germinación cercana a 100% en un tiempo de incubación de 24 horas, ya que en la medida en que un producto pierde viabilidad, se reduce la capacidad de establecerse en campo y se reduce así su efectividad sobre los organismos a controlar. Este parámetro se define en razón a que una vez el producto sea aplicado en campo se requiere asegurar un efecto rápido sobre la población a controlar, en este caso *P. horiana* y un periodo corto de exposición a condiciones medioambientales.

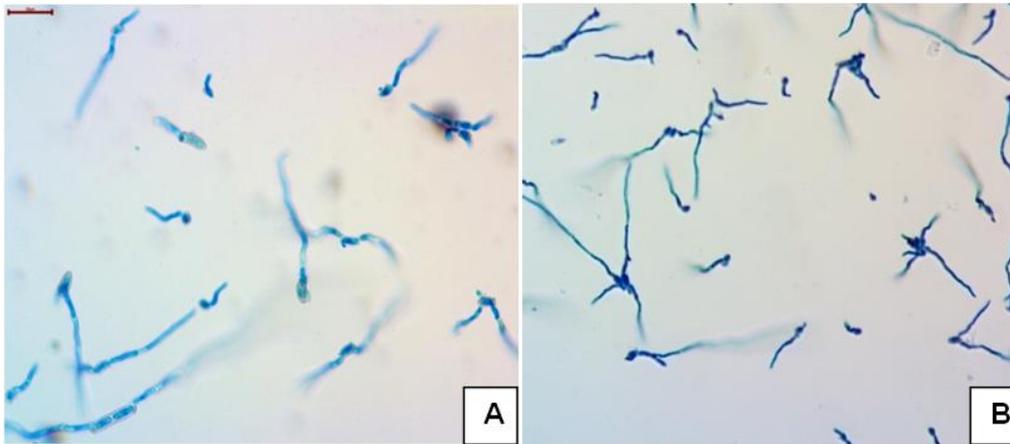


Figura 20. Germinación de *C. uredinicola*. **A.** Campo visual 40X de conidios germinados a las 18 horas a los 16 días. **B.** Campo visual 20X de conidios germinados a las 24 horas a los 16 días. Fuente: Fotografía Noj Suruy 2014.

A. Porcentaje de Viabilidad a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación

Se estableció el porcentaje de viabilidad en tres periodos de incubación para observar la capacidad de establecerse en campo en un periodo de 18 horas, debido a las condiciones medioambientales que puedan ocurrir. De 50 conidios contados entre los germinados y no germinados.

En el cuadro 9 se observa el alto porcentaje de viabilidad desde los 12 días a las 18 horas y cumple lo establecido por Monzón (2001) con germinación mayor al 85%, por lo tanto es recomendable un periodo de incubación a los 16 y 12 días.

Cuadro 9. Viabilidad a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de producción

Tratamiento 3 (Maíz quebrado)	Porcentaje viabilidad 18 horas		
	8 Días	12 Días	16 Días
Repetición 1	66.57	94.08	92.86
Repetición 2	68.49	94.86	96.67
Repetición 3	71.86	93.45	95.77
Repetición 4	66.75	91.45	97.07
PROMEDIO	68.42	93.46	95.59

Fuente: Noj Suruy 2014.

Según el análisis de varianza ($p < 0.001$) existe diferencia significativa en la media de porcentaje de viabilidad de esporas a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación en las unidades de muestreo y un bajo coeficiente de variación de 2.31% el cual indica que la viabilidad para los periodos de incubación son muy homogéneos (cuadro 10).

Cuadro 10. Resumen del ANDEVA para la variable porcentaje de viabilidad a las 18 horas a los 8, 12 y 16 días de producción.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F	P-VALOR
TRATAMIENTO 3	1827.07	2	913.54	233.10	0.0001*
ERROR	35.27	9	3.92		
TOTAL	1862.35	11			

*Significancia estadística 5% C.V. = 2.31% Fuente: Noj Suruy 2014.

En la comparación de medias para el porcentaje de viabilidad a las 18 horas existe diferencia significativa en los distintos periodos de incubación, de los cuales hay dos grupos estadísticos, el porcentaje más alto fue de 95.59 seguido de 93.46 a los 16 y 12 días respectivamente (grupo A) los cuales no son significativamente entre sí. Y el porcentaje más bajo fue de 68.42 % a los 8 días (grupo B) (cuadro 10). Por lo tanto se recomienda incubación en la propagación masiva a partir de los 12 días después de la inoculación ya que a partir de este periodo se cumple lo establecido por Monzón (2001) pues se obtendrá una germinación superior a 85%, importante para estos agentes de control biológico.

Cuadro 11. Comparación de medias para la variable porcentaje de viabilidad a las 18 horas el tratamiento 3, a los 8, 12 y 16 días de producción.

TRATAMIENTO 3 (Maíz quebrado)	MEDIA PORCENTAJE DE VIABILIDAD	Tukey (≤ 0.05)
16 Días	95.59	A
12 Días	93.46	A
8 Días	68.42	B

Medias con letra común no son significativamente diferentes. Fuente: Noj Suruy 2014.

B. Porcentaje de viabilidad a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación.

De 54 conidios contados como germinados y no germinados se observa que existe alto porcentaje de viabilidad desde los 8 días mostrados con promedio de 94.51 siendo el menor, a los 12 días 98.49 y a los 16 días 99.41 siendo más alto, como se observa en el cuadro 12.

Cuadro 12. Viabilidad a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de producción.

Tratamiento 3 (Maíz quebrado)	Porcentaje viabilidad 24 horas		
	8 Días	12 Días	16 Días
Repetición 1	97.18	99.00	99.59
Repetición 2	95.96	97.86	99.66
Repetición 3	92.49	99.02	99.23
Repetición 4	92.39	98.08	99.18
Promedio	94.51	98.49	99.41

Fuente: Noj Suruy 2014.

Según el análisis de varianza existe diferencia significativa en la media de porcentaje de viabilidad de esporas a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de incubación en las unidades de muestreo, se obtuvo bajo coeficiente de variación de 1.49% el cual indica que la viabilidad en los distintos periodos de incubación son muy homogéneos ya que la diferencia entre el mayor y el menor fue de 4.9%(cuadro 13).

Cuadro 13. Resumen del ANDEVA para la variable porcentaje de viabilidad a las 24 horas a los 8, 12 y 16 días de producción.

FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GL	CUADRADOS MEDIOS	VALOR DE F	P-VALOR
TRATAMIENTO 3	54.38	2	27.19	12.82	0.0023*
ERROR	19.09	9	2.12		
TOTAL	73.47	11			

*Significancia estadística 5%C.V. = 1.49%. Fuente: Noj Suruy 2014.

C. uredinicola tiene una alta viabilidad en el sustrato de maíz, a las 24 horas a los 16 días de incubación se obtuvo el porcentaje más alto 99.41, seguido de 98.49 a los 12 días y a los 8 días 94.51 siendo el menor (cuadro 14). En estos resultados se obtuvo una mayor viabilidad pues hubo una germinación muy cercana a 100%.

Es importante mencionar que el porcentaje de viabilidad es alto, lo que significa que el sustrato de maíz quebrado no genera sustancias que afecten negativamente la germinación de las conidios, ya que, según Michel *et al.*, (2008) existen sustratos que generan sustancias que pueden tener efecto negativo sobre las esporas y por ende no germinan.

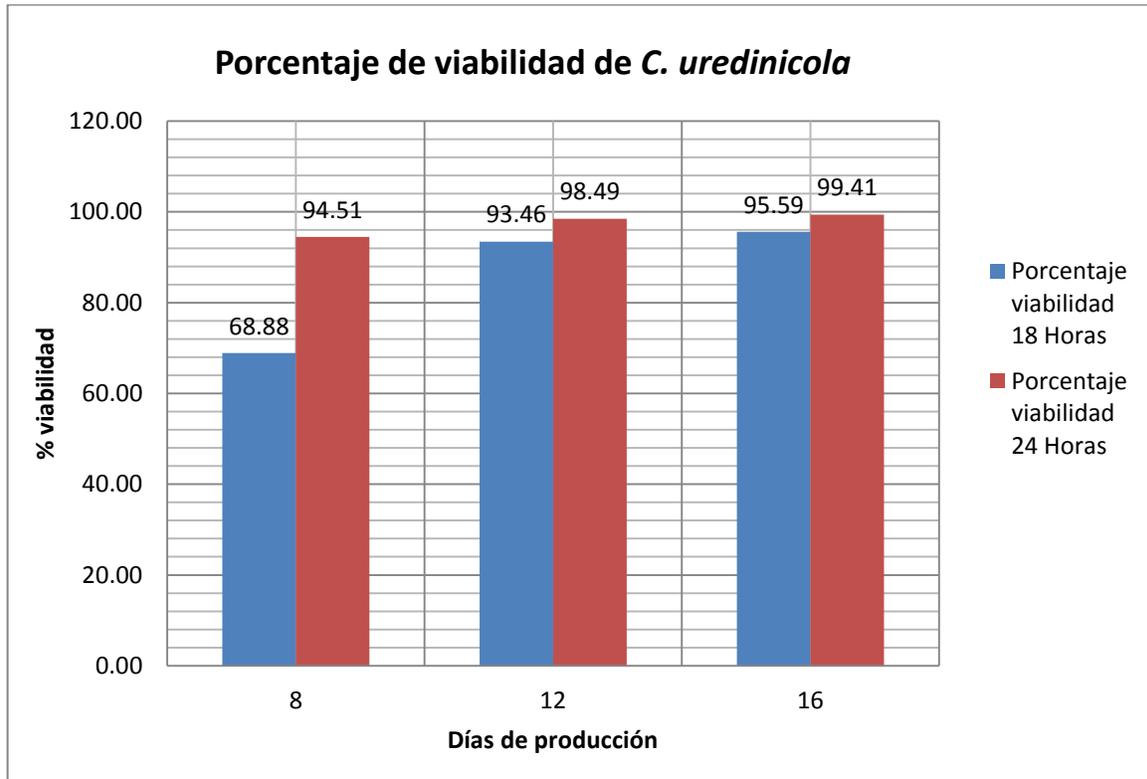
Cuadro 14. Comparación de medias para la variable porcentaje de viabilidad a las 24 horas el tratamiento 3, a los 8, 12 y 16 días de producción.

TRATAMIENTO (Maíz quebrado)	MEDIA PORCENTAJE DE VIABILIDAD	Tukey (≤ 0.05)
16 Días	99.41	A
12 Días	98.49	A
8 Días	94.51	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes. Fuente: NojSuruy 2014.

En la figura 21 se observa el comportamiento que tuvo el porcentaje de viabilidad de *C. uredinicola* sobre el sustrato Maíz quebrado (T3) con respecto a los distintos periodos de incubación, dicha gráfica indica que el periodo de 8 días no sobrepasó al 85% de viabilidad a las 18 horas sin embargo si se obtuvo un buen porcentaje a las 24 horas, con respecto a los 12 y 16 días *C. uredinicola* alcanzó excelente germinación lo que quiere decir que es apto para establecerse en campo ya que el rango de germinación oscila entre 93.46% a 99.41% a las 18 y 24 horas, por lo que la germinación para ambos periodos de incubación son aceptables ya que no muestran diferencia significativa.

Figura 21. Porcentaje de viabilidad a las 18 y 24 horas en los 8, 12 y 16 días de incubación



Fuente: Noj Suruy 2014.

Según los análisis estadísticos de los resultados obtenidos durante la evaluación de los diferentes sustratos naturales evaluados para la propagación masiva de *C. uredinicola*, en las comparaciones de medias Tukey presentaron diferencias significativas entre los sustratos en los parámetros evaluados, lo cual evidencia que el sustrato maíz quebrado demostró ser mejor opción para la producción de conidios de *C. uredinicola*, presento una media de producción de conidios de 2.11×10^7 /ml a los 16 días, comparada con los sustratos de arroz blanco y arroz precocido en los que no se obtuvo presencia de conidios del hiperparásito, además presento un alto porcentaje de viabilidad, ya que este es muy cercano a 100%, pues a las 18 horas se obtuvo 95.59 y a las 24 horas 99.41 a los 16 días (cuadro 15), por lo que cumple con los requisitos establecidos por Monzón (2001) para el control de calidad de formulaciones de hongos.

Cuadro 15. Resumen de resultados obtenidos del mejor sustrato para la producción de *C. uredinicola*

Variable de respuesta para sustrato maíz quebrado (T3)	Resultado en periodo de incubación de 16 días
Número de conidios/ml	2.11×10^7
Número conidios/gr	2.92×10^7
% viabilidad 18 horas	95.59
% viabilidad 24 horas	99.41

Fuente: Noj Suruy 2014.

2.9 CONCLUSIONES

- De los tres sustratos naturales evaluados se determinó que el maíz quebrado produce la mayor cantidad de conidios con producción de 2.11×10^7 conidios/ml a los 16 días de incubación, 1.18×10^7 conidios/ml a los 12 días y 3.26×10^6 conidios/ml a los 8 días.
- Se estableció la viabilidad de conidios de *C. Uredinicola* del sustrato de maíz quebrado para los distintos días de incubación:
 - 16 días: 95.59% a las 18 horas y 99.41% a las 24 horas
 - 12 días: 93.46% a las 18 horas y 98.49 a las 24 horas
 - 8 días: 68.88% a las 18 horas y 94.51 a las 24 horas.

2.10 RECOMENDACIONES

- Evaluar la propagación masiva en sustratos de maíz quebrado con aditivos de fuentes de carbono y evaluar su efecto en la producción de conidios de *C. uredinicola*
- Evaluar secado y almacenamiento para el producto final obtenido de la propagación masiva de *C. uredinicola* bajo condiciones naturales o cercanas a estas sin pérdida significativa de viabilidad e ineffectividad (Hernández y carrillo 1999).
- Realizar pruebas a nivel de campo del producto obtenido de la propagación masiva de *C. uredinicola* para evaluar su efecto y adaptación al cultivo de crisantemo.

2.11 BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, GN. 2005. Plant pathology. 5ed. US, McGraw-Hill. p. 81-109.
2. Álvarez, G; Santos, M; Centes, L. 2013. Bioprospección de los hiperparásitos *Cicinobolus cesatii* de Bary 1870 y *Eudarlus cacaricis* (Biv.) O.E. Erikss. 1966, sobre cultivos y plantas adyacentes en la región central de Guatemala; proyecto DIGI. Guatemala, USAC, DIGI. 63 p.
3. _____. 2014. Extracción y formulación artesanal de *Cladosporium uredinicola* biocontrolador de *Puccinia horiana*; proyecto DIGI 7.26. Guatemala, USAC, DIGI. 45 p.
4. Baker, KF; Cook, RJ. 1987. The nature and practice of biological control of plant pathogens. St. Paul, Minnesota, US, The American Phytopathology Society. 539 p.
5. Barnett, LH; Hunter, BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. St. Paul, Minnesota, US, The American Phytopathological Society. 218p.
6. Bensch, K; Braun, U; Groenewald, JZ; Crous, PW. 2012. The genus *Cladosporium* (en línea). *Studies in Mycology* 72:1-401. Consultado 6 mar 2014. Disponible en <http://www.readcube.com/articles/10.3114/sim0003?locale=en>
7. Bettiol, W; Morandi, M. 2009. Biocontrol de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna, Brasil, Quebra-Cabeça Soluções em Artes Gráficas. 337 p.
8. CABI, UK. 2014. Invasive species compendium (en línea). UK. Consultado 4 mar 2014. Disponible en <http://www.cabi.org/isc/?compid=5&dsid=45806&loadmodule=datasheet&page=481&site=144>
9. Camargo-Ricalde, SL; García-García, V; Muciño-Mares, RM. 2000. ¿Que es la fitopatología? hongos fitopatógenos del crisantemo (*Dendranthema moifolium* (Ramat) Tzvelev) un estudio de caso. *ContactoS* 37: 9-22.
10. Canjura Saravia, EM. 2000. Reproducción masiva de *Verticillium* sp. hiperparasito de la roya en café *Hemileia vastatrix*. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 8 -15.
11. Cañedo, V; Ames, T. 2004. Manual de laboratorio de hongos entomopatógenos (en línea). Lima, Perú, Centro Internacional de la Papa (CIP). Consultado 14 Jun 2014. Disponible en <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>
12. Chavéz García, MP. 2006. Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis Microbiol. Ind. Bogotá, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 113 p.

13. Colmenárez, C; Montilla, JO; Nass, H. 2006. Ocurrencia de *Sphaerellopsis filum* en uredosoros de la roya de la caña de azúcar en diferentes localidades de Venezuela (en línea). Venezuela. Consultado 9 mar 2014. Disponible en <http://www.sovefit.com.ve/boletines/19-2/Documento7.pdf>
14. DACSA, ES. 2011. Características generales del maíz (en línea). España. Consultado 18 mar 2014. Disponible en <http://maiz.dacsa.com/spa/mundo-maiz/caracteristicas-y-tipos-de-maiz/caracteristicas-generales-del-maiz.html>
15. Doelle, H; Mitchell, D; Rolz, C. 1992. Solid substrate cultivation. Great Britain, Elsevier Applied Science. 466 p.
16. Dorta, B; Ertola, RJ; Arcas, JA. 1996. Characterization of growth and sporulation of *Metarhizium anisopliae* in solid substrate fermentation. Enzyme and Microbial Technology 19(6):434-439.
17. EPPO, US. 2004. *Puccinia horiana* (en línea). París, Francia, European and Mediterranean Plant Protection Organization, Bulletin OEPP/EPPO 34:209-211. Consultado 4 mar 2014. Disponible en [https://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Puccinia_horiana/pm7-27\(1\)%20PUCCHN%20web.pdf](https://www.eppo.int/QUARANTINE/fungi/Puccinia_horiana/pm7-27(1)%20PUCCHN%20web.pdf)
18. FAO, IT. 1993. Composicion química y valor nutritivo del maíz (en línea). Roma, Italia, FAO, Deposito de Documentos de la FAO. Consultado 18 mar 2014. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/t0395s/t0395s03.htm>
19. _____. 1995. Variantes en la composicion del grano (en línea). París, Francia, Depósito de documentos de la FAO. Consultado 14 mar 2014. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/t0818s/T0818S0b.htm#Variantes>
20. GAB Sistemática Analítica, ES. 2015. Cámara Thoma y Neubauer improved para el recuento de levaduras (tiraje) (en línea). España. Consultado 18 abr 2015. Disponible en http://shop.gabsystem.com/data/descargas/Camara%20thoma%20neubauer_Esp.pdf
21. García Velasco, EZ. 2005. Antagonsismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. causante de la roya blanca del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) (en línea). Sociedad Mexicana de Fitopatología 23(109). Consultado 14 mar 2014. Disponible en <http://www.socmexfito.org/2014-01-08-17-34-56/2013-06-19-02-38-35/001-vol-23/109-revista-smf/2005/001/370-antagonismo-de-cladosporium-sp-contra-puccinia-horiana-henn-causante-de-la-roya-blanca-del-crisantemo-dendranthema-grandiflora-tzvelev>
22. García Ubeda, IE. 2010. Plan comprensivo para el casco urbano del municipio de San Juan Sacatepéquez, ciudad de Guatemala, Guatemala. Tesis Arq. Guatemala, USAC. 84 p.

23. GBIF (The Global Biodiversity Information Facility, DK). 2013. *Cladosporium uredinicola* Speg. 1912 (en línea). Dinamarca. Consultado 8 mar 2014. Disponible en <http://www.gbif.org/species/2620664>
24. Gómez, S; Torres, V; García, Y; Navarro JA. 2012. Procedimientos estadísticos más utilizados en el análisis de medidas repetidas en el tiempo en el sector agropecuario. Revista Cubana de Ciencia Agrícola 46(1).
25. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, GT). 2014. Informe semanal de comportamiento de precios de los principales productos agropecuarios (en línea). Guatemala. Consultado 23 ene 2015. Disponible en [http://web.maga.gob.gt/download/03-09-enero-2014-s\(2\).pdf](http://web.maga.gob.gt/download/03-09-enero-2014-s(2).pdf)
26. Cruz Martínez, LC. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis Microbiol. Ind. Bogotá, D.C., Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 123 p.
27. Mejía Ajcucun, LA. 2008. Estudio fitopatológico en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura y Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 148 p.
28. Michel Aceves, AC; Otero Sánchez, MA; Martínez Rojero, RD; Rodríguez Moran, NL; Ariza Flores, R; Barrios Ayala, A. 2008. Producción masiva de *Trichoderma harzianum* Rifai en diferentes sustratos orgánicos. Guerrero, México, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-Guerrero). 14(2) 185-19.
29. Monteverde, G. 2006. Plan de acción para roya blanca (*Puccinia horiana* P. Hennings) del crisantemo (en línea). Costa Rica. Consultado 8 mar 2014. Disponible en https://www.sfe.go.cr/intranet/documentos/planes_de_accion/Plan_de_accion_Roya_Blanca.pdf
30. Monzón, A. 2001. Producción y uso de hongos entomopatógenos. Costa Rica, CATIE. 113p.
31. Ogórek, SL. 2012. Characteristics and taxonomy of *Cladosporium* fungi. Mycology Lekarska 83 p.
32. Padmasari, Y. 2005. Fungal mats in solid – state fermentation. Tesis PhD. Wageningen, The Netherlands, Wageningen University. 157 p.
33. Pérez Guerra, N; Torrado, A; López, C. 2003. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation (en línea). Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry 2(3):343-350. Consultado 7 dic 2014. Disponible en

http://www.researchgate.net/publication/228612186_Main_characteristics_and_applications_of_solid_substrate_fermentation

34. Rojas Vega, JP. 2005. Roya blanca el crisantemo *Puccinia horiana* (en línea). Colombia, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Consultado 10 mar 2014. Disponible en <http://www.ica.gov.co/getattachment/1e58698b-b79b-4829-9255-415955c924b3/Publicacion-5.aspx>

35. Sheta, W. 1996. Detection of *Cladosporium uredinicola* in pustores of chrysanthemum white rust (*Puccinia horiana*) (en línea). Plant Disease 80:599. Consultado 7 mar 2014. Disponible en https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Abstracts/PD_80_0599A.htm

36. Smith, I; Dunez, J; Lelliott, R. 1988. Manual de enfermedades de la planta. España, Grafo. 661 p.

37. Velásquez, L. 2009. San Juan Sacatépequez, tierra de las flores (en línea). Guatemala, Inversion y Desarrollo con Luis Velásquez. Consultado 5 mar 2014. Disponible en <http://www.inversionydesarrollo.net>

38. Vences, C; Vázquez, LM. 2008. Inoculación *in vitro* de la roya blanca (*Puccinia horiana* Hennings) en crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev). Agronomía Mesoamericana 19(1):81-85.

30. Rolando Barrios



2.12 GLOSARIO

Anamórfico	Fase imperfecta o asexual de hongos ascomicetos y algunos basidiomicetos (royas) en la que se producen conidios.
Autoica	Hongo parásito capaz de completar su ciclo de vida sobre un único huésped.
Cámara de Neubauer	Aparato de vidrio óptico especial y de precisión. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio, sirven para el conteo de bacterias, esporas y cualquier tipo de recuento citológico.
Cámara de flujo laminar	Es una cabina en la que se emplea un extractor para forzar el paso del aire y todas las partículas que este contiene a través de un filtro HEPA y proporcionar aire limpio o estéril a la zona de trabajo. Su función es mantener el área de trabajo libre de partículas, (estado aséptico) especialmente de posibles contaminantes (bacterias u hongos), que puedan acceder al cultivo vegetal.
Cepa	En microbiología y genética, una variante genotípica de una especie o, incluso, de un taxón inferior usualmente propagada clonalmente, debido al interés de la conservaciones de sus cualidades definitorias
Conidio	También llamado conidiospora, esporas asexuales no móviles y estructuras reproductivas de los hongos.
Cosmopolita	Ser, especie animal o vegetal aclimatado a todos los países o que puede vivir en todos los climas.
Germinar	Brotar, crecer y/o desarrollarse.

Hifas	Elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos. Están constituidos por una fila de células alargadas envueltas por pared celular que reunidas forman el micelio.
Inoculación	Introducir una cantidad específica de una sustancia que contiene un microorganismo específico en un medio de cultivo.
Micelio	Masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo. Dependiendo de su crecimiento se clasifican en reproductores aéreos o vegetativos.
Microcíclica	Tipo de roya que presenta solo las fases III y IV correspondientes a teliosporas y basidiosporas.
Patogenicidad	Capacidad de un agente infeccioso de producir enfermedad en un huésped susceptible.
Soro	Elementos circulares cuyo color varía desde el verde al marrón a medida que maduran. Dentro de los soros se encuentran los esporangios constituidos por un pedúnculo y una cabezuela. En el interior de cada esporangio se desarrollan células reproductoras asexuales llamadas espora.
Teleomórfico	Fase ascógena, perfecta o sexual en los ascomicetos, en la que se producen ascas.
Tween 20	Polisorbato, no iónico tensoactivo y emulsionante, se utiliza para permitir la dispersión de esporas del hongo en agua.
UFC	Unidades formadoras e colonia, esporas o conidios que tienen la capacidad de germinar y formar colonias de un medio de cultivo o sustrato.



3.1 PRESENTACIÓN

El centro de Diagnostico Parasitológico (CDP) fue creado con el fin de prestar asistencia al agro guatemalteco contribuyendo al desarrollo y la investigación agrícola, proporcionando tecnología apropiada para el manejo de plantas. Dentro de los diagnósticos que ofrece el CDP son los siguientes:

- Fitopatológico: análisis de determinación de hongos u oomycetos
- Bacteriológico: análisis para la determinación de géneros de bacterias
- Nematológico: análisis para la determinación y conteo de población de nematodos.

El siguiente manual se realizó a partir de la necesidad de obtener documentos y/o manuales en el CDP, ya que, en el diagnóstico realizado durante el ejercicio profesional supervisado en dicha institución se encontró este aspecto como una debilidad, por lo tanto este documento servirá para inducir al personal que labora en el CDP, ya sea como laboratoristas, epesisita, tesistas, catedráticos, estudiantes particulares, y cualquier otra persona que le interese trabajar dentro de dicho laboratorio, es indispensable contar con un manual que presente de manera formal y sistemática los procedimientos, así mismo que tengan las herramientas básicas para trabajar en la realización de diagnósticos u otro método o técnica que se trabajan dentro del laboratorio. De tal manera en él se incluyen los procedimientos empleados para el análisis de muestras vegetales que ingresen y/o detección de agentes patógenos que estén afectando al cultivo.

Incluye la metodología del manejo del material vegetal para lograr aislar e identificar el agente causal, así mismo se incluyen el procedimiento para la realización de medios de cultivo para agentes patógenos.

3.2 SERVICIO 1: MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA REALIZACIÓN DE DIAGNÓSTICOS DEL CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO, FACULTAD DE AGRONOMÍA, USAC.

3.2.1 Objetivo

- Elaborar un manual de procedimientos para la realización de Diagnósticos del Centro de Diagnóstico Parasitológico, Facultad De Agronomía, USAC.

3.2.2 Metodología

La obtención de información acerca de los procedimientos para la realización de diagnósticos del Centro de Diagnóstico Parasitológico, fue a través de inducción recibida al previo a ingresar como estudiante del ejercicio profesional supervisado, de la Facultad de Agronomía, inducción llevada a cabo durante el mes de noviembre del 2013.

A si mismo se realizó entrevistas informales dirigidas al personal relacionado con el funcionamiento del laboratorio (jefe del laboratorio, técnico de laboratorio e investigadores) y mediante revisión de literatura.

3.2.3 Resultados

A. DERECHOS Y OBLIGACIONES LABORATORISTAS DEL CDP-FAUSAC

Los responsables de laboratorio tendrán a su cargo el resguardo del material, equipo y reactivos, así mismo deberán mantener actualizados los inventarios correspondientes.

Es obligación del laboratorista portar la bata, guantes, cofía y mascarilla, para cumplir con las normas de bioseguridad para el laboratorio.

Preparar con la debida oportunidad los materiales, equipos y reactivos que sean necesarios para las actividades programadas del CDP, con excepción de aquellas actividades destinadas exclusivamente para los tesistas.

Inspeccionar, limpiar y guardar adecuadamente el quipo y materiales a su cuidado. De igual forma llevará el control para la reposición oportuna de material y equipos dañados, destruidos o faltantes.

Podrán permitir la entrada a los laboratorios solo a aquellas personas que presenten el programa de trabajo de laboratorios autorizado por el coordinador del CDP.

Coordinar y supervisar las actividades de tesistas o personas externas al CDP.

TESISTAS Y EPESISTAS

Los tesistas podrán realizar sus trabajos de investigación y/o actividades relacionadas en el laboratorio, siempre que tengan la aprobación del coordinador del CDP, y que se hayan programado sus actividades por semestre.

Tienen la obligación de utilizar preparar, lavar, limpiar y guardar el material que requieran en el desarrollo de sus actividades. Podrán emplear el equipo especializado únicamente para estudios previamente autorizadas por el responsable del laboratorio y/o coordinador del laboratorio. Además el alumno será supervisado continuamente por el asesor y/o el profesor del estudio en cuestión.

3.3 PROCEDIMIENTOS PARA REALIZACIÓN DE DIAGNÓSTICO DE MUESTRAS

3.3.1 Recepción de la muestra

A. Objetivo

Cumplir con los requisitos para el ingreso de la muestra y así mismo garantizar los resultados de la misma.

B. Procedimiento

- **RECEPCIÓN:** El técnico de laboratorio o recepcionista de muestras debe verificar al momento del ingreso de la muestra, que ésta se encuentre en condiciones adecuadas, es decir que estas estén debidamente preservadas y que el tiempo entre el muestreo y la recepción en el laboratorio sea menor o igual a 48 horas. Posteriormente, el responsable deberá evaluar la muestra para el análisis, considerándose como muestra apta, aquella que no presente signos evidentes de deshidratación y/o descomposición, además la muestra debe ser representativa en cantidad de lo contrario la muestra será rechazada o bien se solicitará suficiente muestra al solicitante.
- **INFORMACIÓN:** Llenar una boleta de ingreso con los datos necesarios del solicitante, como: nombre del solicitante, empresa, dirección, teléfono, correo electrónico, cultivo, procedencia de la muestra, además es importante indicar los síntomas, manejo del cultivo, agroquímicos utilizados, edad del cultivo, variedades e indicar que estudios necesita que se le realicen a la muestra ingresada (figura 31A).
- **REGISTRO:** Al tener la boleta de ingreso debe registrarse el ingreso en el libro de registro del laboratorio, esto le dará un número correlativo que identificarán la muestra.
- **ALMACENAMIENTO:** El laboratorio debe tener parte de la muestra conservada en caso de que el procesamiento y/o resultado no sea el adecuado y deba realizarse nuevamente.
- **PROCESAMIENTO:** Las muestras deben ser procesadas como máximo dentro de 48 a 72 horas posteriores a la recepción de estas, conservándolas durante este periodo a una temperatura de $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

El análisis de las muestras deberá seguir un procedimiento de análisis general estándar de diagnóstico, el cual estará en función de la enfermedad o plaga señalada en la solicitud de análisis, conforme al procedimiento específico definido para cada patógeno.

Una vez que sea determinado el agente causal del problema, se informara al coordinador del CDP-FAUSAC, quien dará el visto bueno, y posteriormente realizaran recomendaciones en el informe final de la muestra ingresada (figura 32A).

3.3.2 Rutas de diagnóstico

Para la elaboración de un diagnóstico se pueden seguir las siguientes rutas en base a:

- Tipo de muestra
- Síntomas de la muestra
- Requerimiento del usuario

- Tipo de muestra

Muestra de suelo

- Determinación de oomycetos
- Extracción de nematodos filiformes
- Extracción de nematodos de quiste

Muestras de tejido vegetal

Hojas

- Determinación de agentes fitopatógenos (hongos)
- Determinación de género de bacterias

Tallos

- Determinación de agentes fitopatógenos (hongos)
- Determinación de género de bacterias

Raíces

- Determinación de oomycetos
- Extracción de nematodos

Planta completa

- Determinación de agentes fitopatógenos (hongos)
- Determinación de género de bacterias
- Determinación de oomycetos
- Extracción de nematodos filiformes
- Extracción de nematodos de quiste

3.4 DIAGNÓSTICO FITOPATOLÓGICO

Este análisis consiste en la determinación de hongos y oomycetos.

3.4.1 Observación de síntomas y/o signos

- El analista debe realizar una inspección visual general de la muestra vegetal estableciéndose inicialmente si cumple o no con el tipo de muestra necesario para el análisis.
- La muestra debe observarse en estereoscopio en búsqueda de síntomas y/o signos del patógenos
- Si la muestra tiene signos del patógeno se procede a realizar cortes y/o montajes del agente patógeno.
- Para el reconocimiento de patógenos se debe clasificar a través de claves de descripción taxonómica del patógeno encontrado, a los cuales se debe tomar fotografías para realizar una base de datos del diagnóstico realizado.
- Si la muestra no tiene signos de patógenos se debe proceder a realizar cámara húmeda para el desarrollo del mismo.

3.4.2 Cortes y/o montajes para la determinación de agentes fitopatógenos

A. Objetivo

Seleccionar y aplicar las técnicas adecuadas para realizar cortes y/o montajes para la determinación del agente fitopatógeno.

B. Materiales

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Azul de lactofenol
- Agujas de disección
- Hojas de afeitar

C. Procedimiento y/o métodos para aislar hongos

Método de la cinta scotch

- Levantar el hongo del hospedero a través de cinta adhesiva
- Colocar una gota de agua o colorante en el portaobjetos

- La cinta adhesiva se debe colocar sobre la gota de colorante y se observa en el microscopio óptico para observar estructuras

Corte de estructuras

- Realizar cortes transversales de las estructuras (picnidios, peritecios, pústulas, acérvulos, etc.) utilizando hojas de afeitar
- Agregar una gota de colorante (azul de lactofenol) sobre un portaobjetos, se coloca el corte del hongo y luego se coloca el cubreobjetos
- Observar en el microscopio y se procede a la clasificación del agente fitopatógeno a través de claves taxonómicas que se encuentran en el Centro de Diagnóstico Parasitológico CDP-FAUSAC

Método de raspado

- Colocar en un portaobjetos una gota de colorante (azul de lactofenol)
- Observar los síntomas y signos del material vegetal enfermo, raspar con agujas de disección, de preferencia que los signos del material enfermo sean micelios.
- Colocar el micelio extraído a través de un raspado en la gota de colorante y se procede a colocar el cubreobjetos
- Se observa en el microscopio y se clasifica el hongo fitopatógeno a través de claves taxonómicas.

3.4.3 Aislamiento de esporas utilizando aguja de cristal (Goh)

A. Objetivo

Aplicar técnica para aislamiento y purificación, mediante las observaciones de las condiciones óptimas de desarrollo para poder identificar el patógeno.

B. Materiales

- Medio de cultivo agar-agua al 3%
- Aguja de disección
- Bisturí
- Mechero
- Medio de cultivo PDA

C. Procedimiento

- Se toma una caja petri con medio de cultivo agar-agua al 3%
- Con ayuda de una aguja de disección fina previamente esterilizada, se transfieren las estructuras deseadas (conidios, picnidios, acérvulos, etc.) a la caja petri con medio de cultivo.
- La caja petri se coloca bajo el lente del estereoscopio y con una aguja de vidrio esterilizada con alcohol se arrastran los conidios, a manera de estriados para su diseminación y dispersión.
- Una vez los conidios son arrastrados se sellan las cajas petri con parafilm y se incuban a 26°C, por 24 a 48 horas.
- Luego de 24 o 48 horas se procede a realizar cultivos monosporicos en los medios de cultivo para su desarrollo los cuales pueden ser Agar papa dextrosa PDA, extracto de malta, etc. se realiza extracción de bocados de agar-agua al 3%, cada bocado debe contener un conidio germinado
- Se identifica y sella la caja petri y se incuban a 26°C, para observar el crecimiento del cultivo monosporico.

3.4.4 Cámara húmeda**A. Objetivo**

Inducir la presencia de signos para posterior identificación del patógeno.

B. Materiales

- Cajas plásticas transparentes
- Cajas de petri
- Alcohol etílico al 95%
- Alcohol etílico al 70%
- Agua destilada
- Etiquetas

C. Procedimiento

- Desinfectar las cajas plásticas y cajas petri con alcohol etílico al 95% y colocar las cajas petri (boca abajo) sobre la base de la caja plástica transparente
- Agregar agua destilada alrededor de las cajas petri, luego cerrar la cámara húmeda

- El material vegetal se debe lavar, secar y desinfectar con alcohol etílico al 70% y luego se debe colocar sobre las cajas petri
- Se debe identificar con el número correlativo de la muestra y la fecha de realización de la misma
- La cámara húmeda se debe mantener cerrada y a una temperatura de 20°-25°C
- Las muestras deben ser revisadas diariamente de forma visual y al estereoscopio para observar el posible desarrollo de estructuras fúngicas hasta encontrar el agente patógeno que afecte al cultivo.
- Si el patógeno se ha desarrollado, se debe identificar mediante cortes y/o montajes a través de claves taxonómicas.

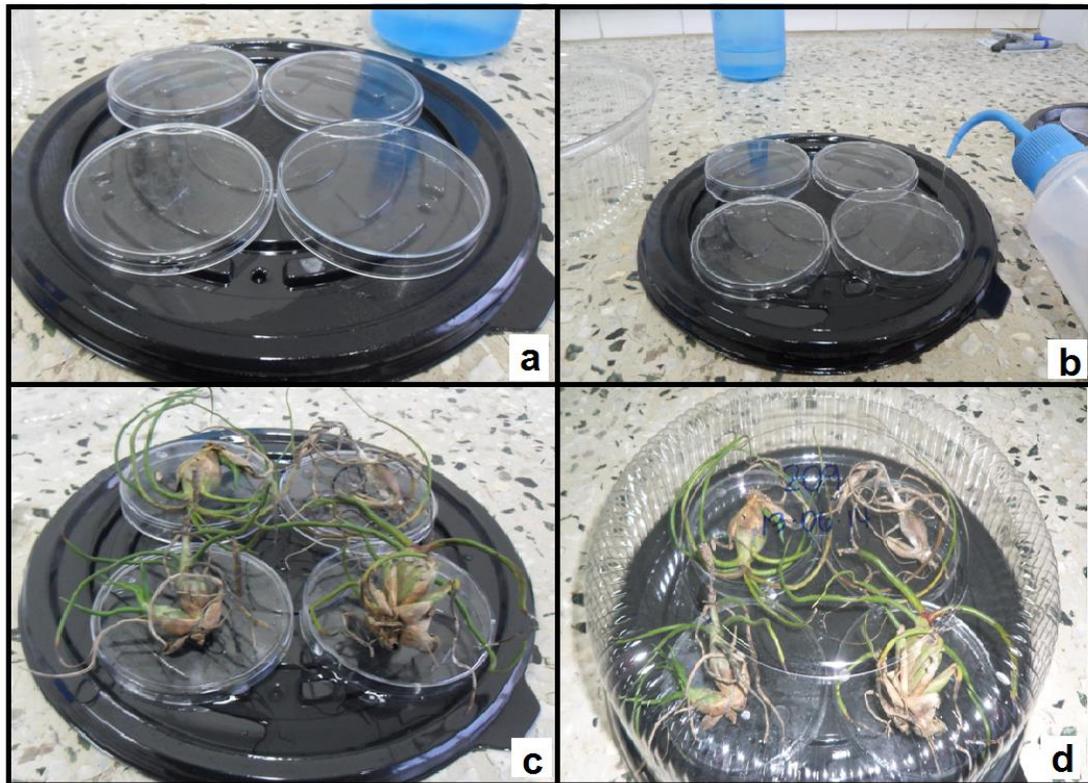


Figura 22. Cámara húmeda. **a.** cajas petri desinfectadas **b.** agregar agua estilada alrededor de las cajas petri, **c.** material vegetal desinfectado, **d.** identificación de cámara húmeda. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.4.5 Análisis para determinación de Oomycetos del género *Pythium* y *Phytophthora*

Para la realización de este diagnóstico se debe llevar a cabo una serie de pasos o métodos los cuales servirán para identificar la presencia de oomycetos, los cuales son:

- Cultivo trampa
- Cultivo trampa a medio selectivo
- Medio selectivo a medio de cultivo PDA
- Semillas de cultivo trampa

A. Objetivo

Indicador de la presencia de oomycetos del género *Pythium* y *Phytophthora* de la muestra deseada.

3.4.6 Cultivo trampa

A. Materiales

- Manzana
- Tijeras
- Perforador
- Pinzas
- Cajas de petri o vidrios de reloj
- Mechero
- Alcohol etílico al 70%
- Alcohol etílico al 95%
- Hipoclorito de sodio 0.3%
- Agua destilada
- Pipeta Pasteur
- Material vegetal

B. Procedimiento

- Lavar el material vegetal con suficiente agua
- Se desinfecta el material vegetal el cual consiste en los siguientes pasos:
Realizar un tren de desinfección, colocar 6 cajas de petri o vidrios de reloj y agregar cada una

- Agua destilada
 - Hipoclorito de sodio al 0.3%
 - Agua destilada
 - Alcohol etílico al 70%
 - Agua destilada
- El material vegetal se debe trasladar por cada una de las cajas de petri utilizando pinzas debidamente esterilizadas (empapar la pinza en alcohol etílico al 95% y luego flamear) cada vez el material vegetal se traslade de una caja petri a otra.
 - Secar el material desinfectado con papel absorbente estéril
 - Luego que el material este desinfectado se debe cortar en trozos de 2-5mm de longitud
 - Realizar 4 perforaciones paralelas de 1 cm de profundidad a la manzana e introducir el material vegetal y agregar una gota de agua destilada a cada una de las perforaciones utilizando una pipeta Pasteur.
 - Colocar sellador alrededor de la manzana, identificar el cultivo trampa con el número correlativo de la muestra, material utilizado (raíces o suelo) y fecha en que se realizó, e incubar a temperatura ambiente
 - Observar diariamente de 1 a 7 días los síntomas del cultivo trampa, dicho cultivo debe presentar lesiones firmes los cuales deben rodear las perforaciones con inoculo, dichas lesiones deben ser color marrón, lo que indica posible presencia de oomycetos, de lo contrario se tomara como resultado negativo de presencia de oomycetos.
 - Si el cultivo trampa muestra resultado positivo se debe proceder a realizar siembras del cultivo trampa a medio selectivo

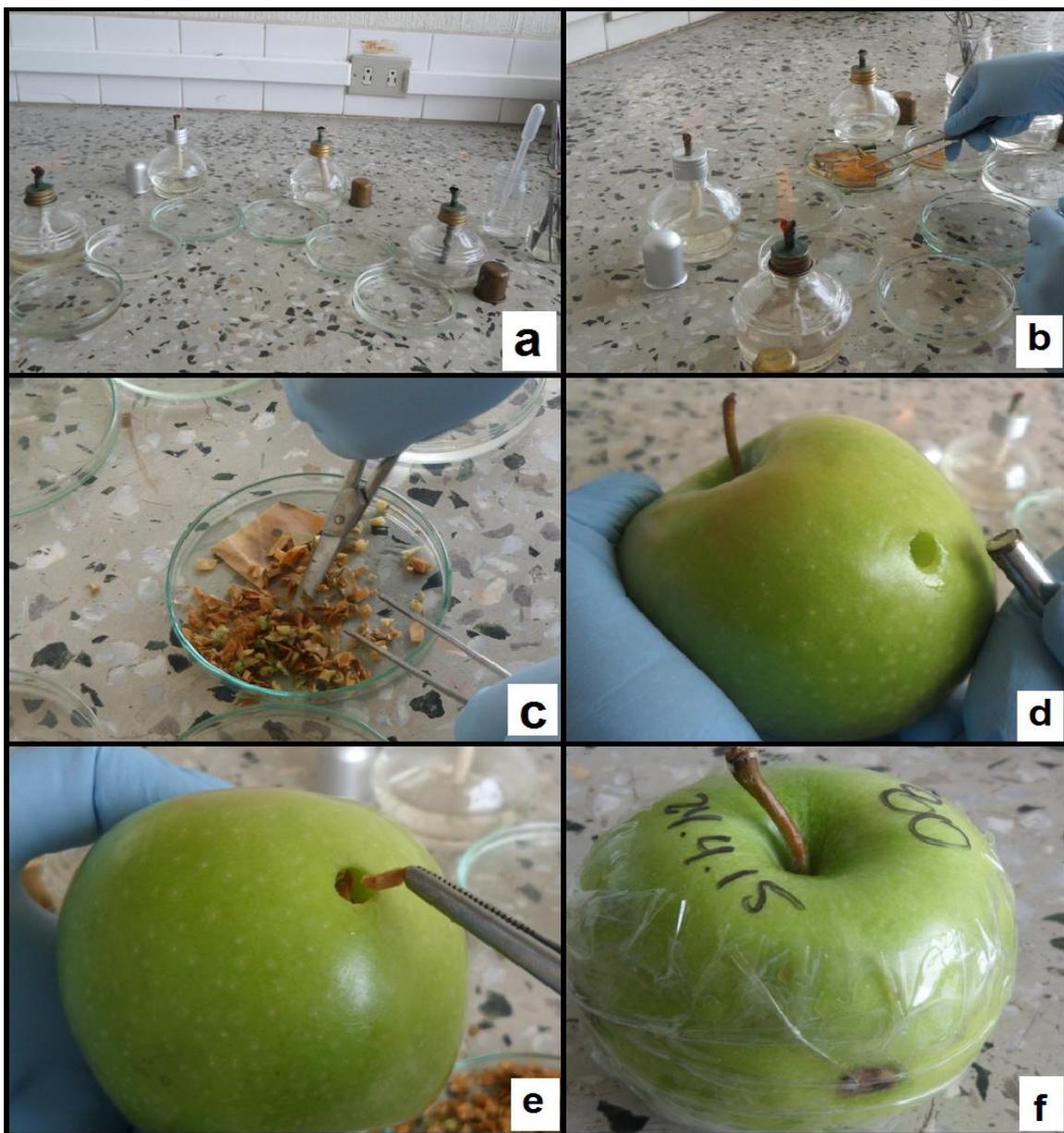


Figura 23. Cultivo trampa, **a.** tren de desinfección, **b.** desinfección del material vegetal, **c.** cortar el material vegetal desinfectado, **d.** perforar el cultivo trampa **e.** agregar el material al cultivo trampa, **f.** sellar el cultivo trampa e identificar. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.4.7 Cultivo trampa a medio selectivo

A. Materiales

- Cultivo trampa
- Medio selectivo PARPBH y PARPB
- Bisturí
- Pinzas

- Papel estéril
- Alcohol etílico al 95%
- Mechero

B. Procedimiento

- Se corta en cuatro pedazos el cultivo trampa (manzana)
- Se toman 10 trocitos (aproximadamente de 2mm x 2mm) en donde la lesión este avanzando de cada uno de los puntos en los que se le agrega el material al cultivo trampa.
- Se colocan los trocitos sobre papel absorbente estéril
- Posteriormente se colocan 5 trocitos en cada medio selectivo PARPBH y PARPB
- Se incuban los medios a 28°C y se observa diariamente.

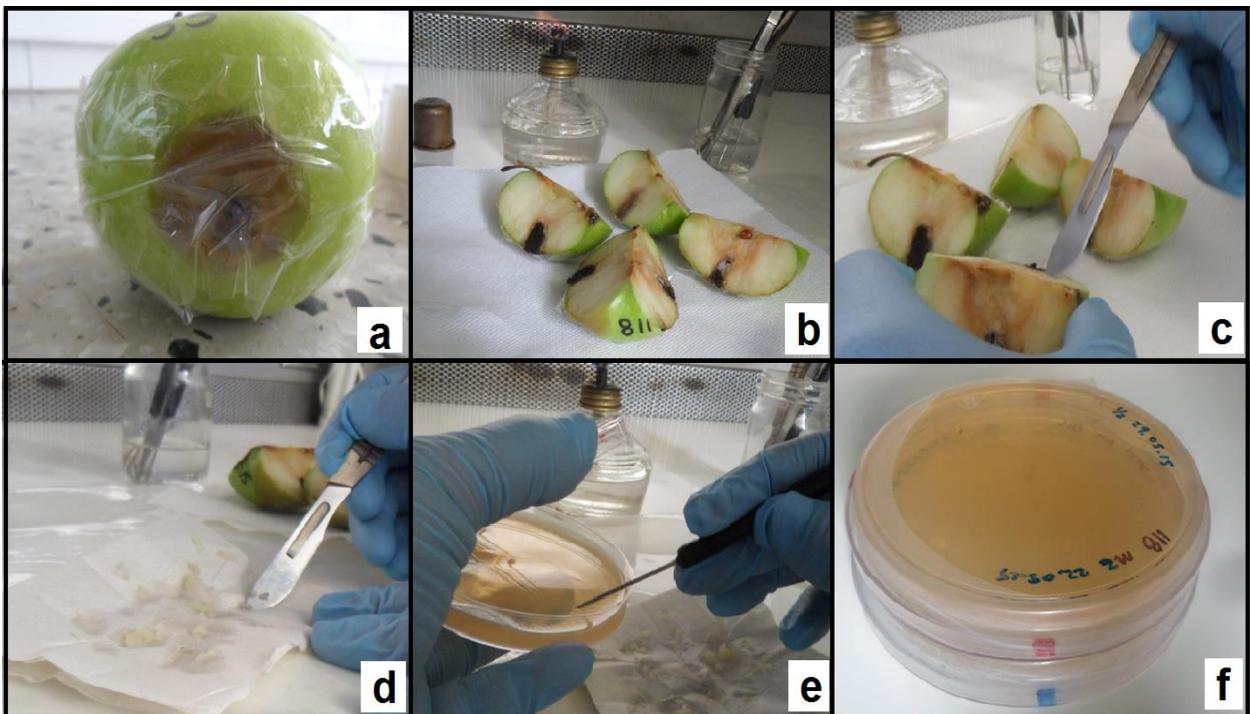


Figura 24. Traslado de cultivo trampa a medio de cultivo selectivo. **a.** cultivo trampa, **b.** cultivo trampa en cuatro pedazos, **c.** trozos de la lesión, **d.** cultivo trampa en papel absorbente, **e.** siembra en medio de cultivo selectivo, **f.** identificar e incubación. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.4.8 Medio selectivo a Medio de Cultivo PDA

A. Materiales

- Medio selectivo PARBH y/o PARB con siembras del cultivo trampa
- Medio de cultivo PDA
- Bisturí
- Mechero
- Marcadores

B. Procedimiento

- De los medios selectivos PARPBH y PARPB si se observa resultado positivo en cuanto al crecimiento micelial, se procede a realizar la siembra de punta de hifa de la cepa a medio de cultivo PDA (Potato dextrosa agar)
- Se incuba a 26°C y se observa diariamente el patrón de crecimiento y posteriormente realizar montajes para clasificar la especie de dicho patógeno.



Figura 25. Medio selectivo a medio de cultivo. **a.** medio selectivo (resultado positivo) **b.** siembra punta de hifa a medio de cultivo PDA, **c.** crecimiento y desarrollo de micelio de oomicetos. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.4.9 Semillas de cultivo trampa

A. Materiales

- Semilla de cultivo trampa
- Pinzas
- Solución de suelo
- Cajas petri
- Marcadores

B. Procedimiento

- Se toman las semillas del cultivo trampa (manzana) y se colocan en cajas petri con solución de suelo nutritivo.
- Se debe identificar, colocar información de fecha en que se realizó el traslado del cultivo trampa a solución de suelo y la fecha en que se realizó el cultivo trampa
- Se observan diariamente si hay crecimiento de micelio de oomycetos del género *Pythium* o *Phytophthora* en las semillas, realizar montajes para la identificación del patógeno.

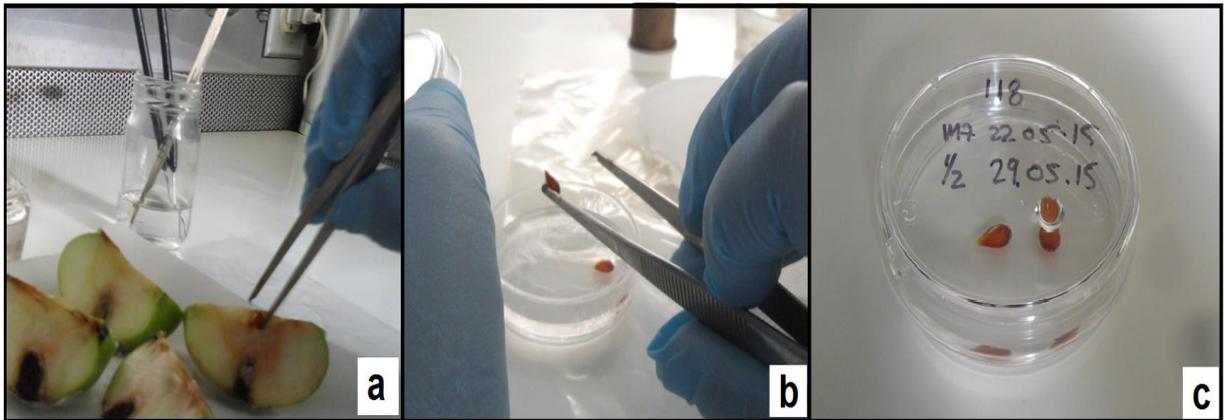


Figura 26. Semillas de cultivo trampa, **a.** semillas de cultivo trampa, **b.** traslado de semillas de cultivo trampa a solución de suelo nutritiva **c.** identificación. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.4.10 Extracción de *Monosporascus*

A. Objetivo

Observar y cuantificar las poblaciones de ascosporas en una muestra de suelo

B. Materiales

- Tamiz No. 35, No. 200 y No. 500
- Solución de azúcar
- Centrifuga
- Piseta
- Muestras de suelo

C. Procedimiento

- Secar el suelo por un periodo de 8 a 15 días
- Pasar el suelo seco por el tamiz No. 35 y pesar 50 gr de suelo tamizado
- Colocar en un beaker 400 ml de agua del grifo y agregar 50 gr de suelo
- Colocar el contenido del beaker en un recipiente de plástico y mezclar el suelo
- Dejar descansar la muestra por espacio de un minuto.
- Pasar el contenido del recipiente por el tamiz No. 35 (500 μm) y dejar caer el agua filtrada en otro recipiente de plástico. Descartar el contenido del tamiz.
- Pasar el contenido del recipiente por el tamiz No. 200 (75 μm) y dejar caer el agua filtrada en otro recipiente; coleccionar cuidadosamente los residuos del tamiz (aproximadamente 50 ml, usando una piseta con agua del grifo) y colocar en un beaker de 250 ml. Se realiza el mismo procedimiento con el tamiz No. 500 (25 μm)
- Homogenizar el contenido del beaker de 250 ml y colocar en los tubos de ensayo de la centrifugadora (debe ser misma cantidad para los tubos y así mantener equilibrio).
- Colocar los tubos de ensayo en la centrifugadora por 4 min a 4500 rpm, se debe descartar el sobrenadante.
- Agregar 10 ml de solución de azúcar y mezclar con el suelo del fondo del tubo (sedimento).
- Colocar nuevamente los tubos de ensayo a la centrifuga por 2 minutos
- El sobrenadante obtenido en los tubos debe filtrarse en un tamiz No. 500 y lavar abundantemente con agua del grifo usando una piseta. Coleccionar 20 ml de lo retenido en el tamiz.
- Proceder al conteo de poblaciones de ascosporas utilizando una cámara de conteo.

3.5 DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

A. Objetivo

Seleccionar y aplicar las técnicas adecuadas de asilamiento y obtención de cultivos puros de bacterias fitopatógenas.

3.5.1 Flujo bacteriano

A. Objetivo

Clasificar género de bacterias fitopatógenas

B. Materiales

- Material vegetal con afecciones vasculares
- Tubos de ensayo
- Agujas de disección
- Navaja
- Agua destilada

C. Procedimiento

- Cortar el cuello de raíz de plantas con síntomas de bacterias
- Agregar agua a un tubo de ensayo
- Colocar el tallo en el tubo de ensayo
- Observar el flujo bacteriano

3.5.2 Tinción de Gram

A. Objetivo

Determinar el tipo de bacteria Gram positiva o Gram negativa a través de la tinción de Gram

B. Materiales

- Material vegetal enfermo
- Aza bacteriológica
- Portaobjetos
- Mechero
- Cristal violeta
- Safranina

- Lugol

C. Procedimiento

- Realizar un macerado en la zona de avance de la muestra con síntomas de bacterias
- Con la aza bacteriológica frotar el macerado en el portaobjetos
- Se procede a teñir la misma con cristal violeta (lograr cubrir el frote con suficiente colorante), se deja actuar el colorante por 1 minuto
- Al transcurrir el minuto, se debe enjuagar el portaobjetos con agua corriente (el agua no debe caer directamente sobre el frote de la muestra, debe caer sobre la parte superior del portaobjetos, además se debe colocar la lámina inclinada hacia abajo)
- Aplicar lugol durante 1 minuto
- Pasado el minuto, el frote se decolora con alcohol etílico al 95% hasta quitar completamente el líquido azul.
- Lavar con agua para quitar los residuos de decolorante y esperar a que seque la lámina al aire libre o con la ayuda de la llama de un mechero (no debe colocarse sobre la llama directamente)
- secar la lámina, se procede a teñir nuevamente, utilizando safranina y dejar actuar por 1 minuto, se procede a enjuagar la lámina con agua, se escurre el agua sobrante y se seca de la forma anteriormente descrita
- Luego se agrega una gota de aceite de inmersión sobre el frote y se observa en el microscopio
 - Bacterias Gram + (Gram positivas) se tiñen de color púrpura- violeta
 - Bacterias Gram – (Gram negativas) se tiñen de color rojizo-rosado

3.5.3 Cortes y/o montaje para flujo bacteriano

Esta técnica nos ayuda a confirmar si en el tejido vegetal afectado existe la presencia de bacterias fitopatógenas, posteriormente se realiza un cultivo y purificación de bacterias para posterior clasificación

A. Objetivo

Observar la presencia de bacterias a través de un corte en el tejido vegetal como control de calidad en el aislamiento y purificación bacteriana.

B. Materiales

- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Hojas de afeitar
- Agua destilada estéril
- Goteros
- Material vegetal

C. Procedimiento

- En la zona de avance de la muestra vegetal con síntomas de bacterias se toma aproximadamente 1x 0.5 cm y se realiza un corte transversal
- Colocar el corte transversal sobre la gota de agua destilada estéril
- Colocar el cubre objetos
- En el microscopio observar el flujo bacteriano

3.5.4 Aislamiento y purificación de bacterias**A. Material y equipo**

- Asa bacteriológica
- Bisturí
- Agua destilada estéril
- Asa bacteriológica
- Pinzas
- Mechero
- Cajas petri
- Papel estéril
- Agua destilada estéril
- Alcohol etílico al 95%
- Hipoclorito de sodio

- Medios de cultivo (PDA o B King)
- Material vegetal enfermo

B. Procedimiento

- Tomar trozos de material vegetal enfermo de aproximadamente 1cm² con síntomas de bacterias fitopatógenas
- Trasladar el material y equipo a la campana de flujo laminar
- Se debe realizar la desinfección del material enfermo, para ello se debe preparar las soluciones en cajas petri para realizar la desinfección del material vegetal de la siguiente manera.
 - Agua destilada estéril
 - Hipoclorito de sodio al 0.3%
 - Agua destilada estéril
 - Alcohol etílico al 70%
 - Agua destilada estéril
- El tejido vegetal se coloca en cada uno de las cajas petri por 30 seg. utilizar pinza previamente desinfectada
- Secar el material vegetal desinfectado en papel esterilizado para retirar los excesos de humedad.
- Macerar el tejido previamente desinfectado a través de un mortero y pistilo y así obtener una suspensión bacteriana
- Con el asa bacteriológica previamente esterilizada, se toma una gota de suspensión bacteriana y se procede a realizar un estriado en el medio de cultivo
- Se sellan las cajas y se incuban a 28°C durante 24 a 48 horas.
- Pasadas las 24 o 48 horas se debe realizar la purificación de colonias de bacterias, nuevamente con el asa bacteriológica se debe tocar la colonia de bacteria de interés desarrollada en el medio anterior, se procede a realizar un estriado (4 a 6 rayas) con el fin de obtener una colonia de bacterias purificadas
- Identificar con fecha y número correlativo de la muestra

- Se sellan las cajas y se incuban a 28°C hasta obtener un cultivo de bacterias para poder clasificar por medio de características culturales, macroscópicas y microscópicas de algunas bacterias fitopatógenas.

3.6 DIAGNÓSTICO NEMATOLÓGICO

3.6.1 Métodos de extracción de nematodos

A. Objetivo

Identificar y cuantificar las poblaciones de nematodos que afecten al cultivo.

La extracción de nematodos se debe realizar de muestras obtenidas las cuales pueden ser: suelo, raíces, hojas, tallos, etc. La extracción deberá realizarse de inmediato o bien se puede conservar a temperaturas bajas (5 a 8°C) en un plazo no mayor de siete días.

Las principales técnicas usadas para la extracción de nematodos son las siguientes:

1. Disección (material vegetal)
2. Flotación en azúcar
3. Embudo de Baerman
4. Cámara Nebulizadora
5. Licuado y tamizado
6. Fenwick modificado con flotación en acetona

3.6.2 Disección

A. Objetivo

Observar y cuantificar nematodos endoparásitos sedentarios (globosos) los cuales forman agallas o quistes dentro de tejido vegetal: bulbos, raíces, tubérculos, semillas, etc.

B. Materiales

- Agujas de disección
- Portaobjetos
- Cubreobjetos

- Lactofenol claro
- Material vegetal (bulbos, raíces, tubérculos, semillas, etc)

C. Procedimiento

- Se debe cortar material vegetal en pedazos pequeños
- Se observa en el estereoscopio y se abre o separa el tejido con agujas de disección finas hasta localizar nematodos, se puede teñir el material lo cual favorece la observación de los especímenes.
- Si se desea saber el género y especie de los nematos observados se realiza lo siguiente:
 - Se extraen los nematodos observados y se colocan sobre un portaobjetos
 - Se realiza un corte perineal y luego se coloca un cubreobjetos
 - Se observa en microscopio.
 - Luego se procede a la identificación de género de nematodos a través de claves taxonómicas que se encuentran en el CDP-FAUSAC

3.6.3 Flotación en azúcar y centrifugado

Este método también se conoce como flotación en azúcar, tamizado-centrifugado, doble flotación en azúcar etc. El método permite concentrar una gran cantidad de nematodos en pequeña cantidad de agua. Además de ser un método rápido, se recuperan nematodos lentos como los Criconematidos. Este método es adecuado solo para muestras de suelo y recuperación de nematodos filiformes.

A. Objetivo

Observar y cuantificar nematodos filiformes fitoparásiticos y no fitoparásiticos

B. Materiales

- Beaker de 1000 ml y 250ml
- Tamiz no. 35, 200 y 500
- Tubos de ensayo
- Solución de azúcar
- Piseta
- Cámara de conteo de nematodos
- Muestra de suelo

C. Procedimiento

- Colocar en un beaker 400 ml de agua del grifo y agregar suelo hasta aforar 500ml
- Colocar el contenido del beaker en un recipiente de plástico, mezclar el suelo y deshacer los grumos
- Dejar descansar la muestra por espacio de un minuto.
- Trasladar el contenido del recipiente por el tamiz No. 35 (500 μm) y dejar caer el agua filtrada en otro recipiente de plástico. Descartar el contenido del tamiz.
- El contenido del recipiente se debe trasladar por el tamiz No. 200 (75 μm) y dejar caer el agua filtrada en otro recipiente; coleccionar cuidadosamente los residuos del tamiz, usando una piseta con agua del grifo y colocar aproximadamente 50 ml en un beaker de 250 ml, se realiza el mismo procedimiento con el tamiz No. 500 (25 μm).
- Homogenizar el contenido del beaker de 250 ml y colocar en los tubos de ensayo de la Centrifugadora (debe ser misma cantidad para los tubos para mantener equilibrio).
- Colocar los tubos de ensayo en la centrifugadora por 5 min a 4500 rpm
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar 10 ml de solución de azúcar a cada tubo de ensayo y mezclar con el suelo del fondo (sedimento).
- Colocar nuevamente los tubos de ensayo a la centrifuga por 30 segundos (por la diferencia de concentración entre la solución de azúcar y los nematodos estos no pueden permanecer en contacto con la solución concentrada de azúcar por más de un minuto por que se corre el riesgo de una plasmólisis).
- El sobrenadante obtenido en los tubos debe filtrarse en un tamiz No. 500 y lavar abundantemente con agua del grifo usando una piseta. Coleccionar 20 ml de lo retenido en el tamiz.
- Proceder al conteo de poblaciones de nematodos utilizando una cámara de conteo.

3.6.4 Embudo de Baermann

Este método es usado para la extracción de nematodos de suelo y material vegetal, método adecuado para nematodos filiformes activos.

La recuperación de los nematodos también se dificulta, pues su movilidad se reduce debido a la falta de oxígeno en el agua y la obstrucción del movimiento por otros materiales. La capacidad del embudo es reducida y las muestras son poco representativas.

A. Objetivo

Extraer y cuantificar nematodos filiformes activos

B. Materiales

- Embudo de Baermann
- Pinzas
- Aros de tubo PVC
- Papel filtro
- Beaker de 25 -50 ml
- Rejilla
- Pedazo de manguera de hule

C. Procedimiento

- Preparar una canasta con papel filtro detenido con aros de tubo PVC, evitando que el papel filtro se rompa y evitar que el papel no quede colgando hacia afuera de la canasta.
- Preparar el embudo de plástico, en el extremo adherir un pedazo de manguera de hule la cual se debe cerrar con pinzas.
- Llenar el embudo con agua y abrir las pinzas para eliminar aproximadamente 20ml de agua con el objeto de evitar que queden burbujas de agua.
- Colocar 50-100 gr de suelo o 10-25 gr de material vegetal (raíces, tallos, semillas). El material vegetal debe ir en trozos de 0.5 cm.
- Ajustar con agua el volumen requerido dentro del embudo, de tal forma que quede sumergido aproximadamente 0.5 – 1 cm del fondo de la canasta. El nivel del agua debe mantenerse constantemente agregando el agua necesaria lentamente, para prevenir la excesiva evaporación puede colocarse la tapadera de una caja de petri invertida sobre la canasta
- Identificar la muestra con número correlativo y fecha de realización

- Después de 24 horas o 48 horas puede tomarse 20 ml del agua del embudo abriendo las pinzas.
- Realizar conteo e identificación de nematodos.

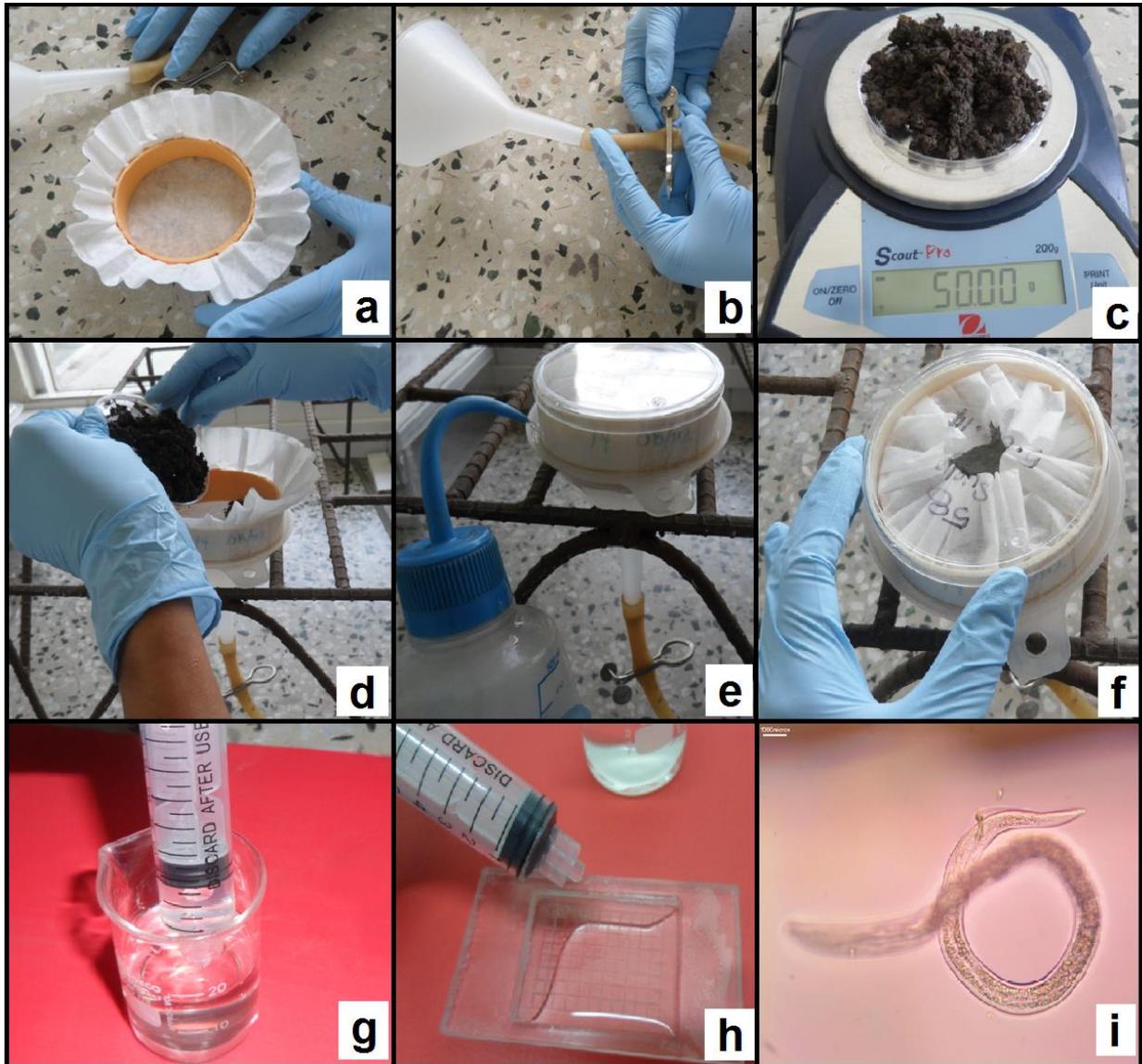


Figura 27. Extracción de nematodos a través del embudo de Baermann. **a.** canasta con papel filtro, **b.** embudo de Baermann, **c.** pesar el material, **d.** material sobre canasta y embudo de Baermann **e.** agua requerida dentro del embudo, **f.** identificar la muestra, **g.** 20 ml de agua del embudo de Baermann **h.** conteo e identificación de nematodos (**i**). Fuente: Noj Suruy 2014.

3.6.5 Licuado tamizado

A. Objetivo

Obtener y cuantificar nematodos a partir de extracción de material vegetal como raíces, hojas, tallos, frutos, bulbos, etc.

B. Materiales

- Licuadora
- Tamiz no. 35, 200 y 500
- Beaker de 250 ml.
- Tubos de ensayo
- Solución de azúcar
- Piseta
- Cámara de conteo de nematodos
- Muestras vegetales

C. Procedimiento

- Lavar el material vegetal, si fuera necesario. Si el material vegetal es muy grande debe seccionarse en porciones pequeñas (aproximadamente 1cm)
- Se coloca la muestra vegetal en la licuadora, agregar agua y cubrir la muestra,
- Licuar la muestra primero a velocidad lenta durante 30 segundos, se deja descansar 30 segundos y luego a velocidad media por 30 segundos.
- Pasar el contenido en tamiz No. 35, 200 y 500 colocar uno sobre otro, luego se aplica agua a presión fuerte sobre el tamiz No. 35.
- Se debe descartar lo retenido en el tamiz No. 35, utilizando piseta, coleccionar lo retenido en el tamiz No. 200 y 500 y se coloca en un beaker de 250 ml.
- Se prepara un embudo de Baermann mencionados en la técnica anterior, el contenido se debe verter cuidadosamente.
- Se puede dejar reposar por 24 horas o bien hay otras opciones como filtrar en el momento o el contenido obtenido del tamiz No. 200 y 500 se procede a centrifugar con azúcar.
- Del contenido filtrado por cualquiera de las opciones mencionadas se toman 20 ml y se procede a realizar la clasificación y conteo de nematodos.

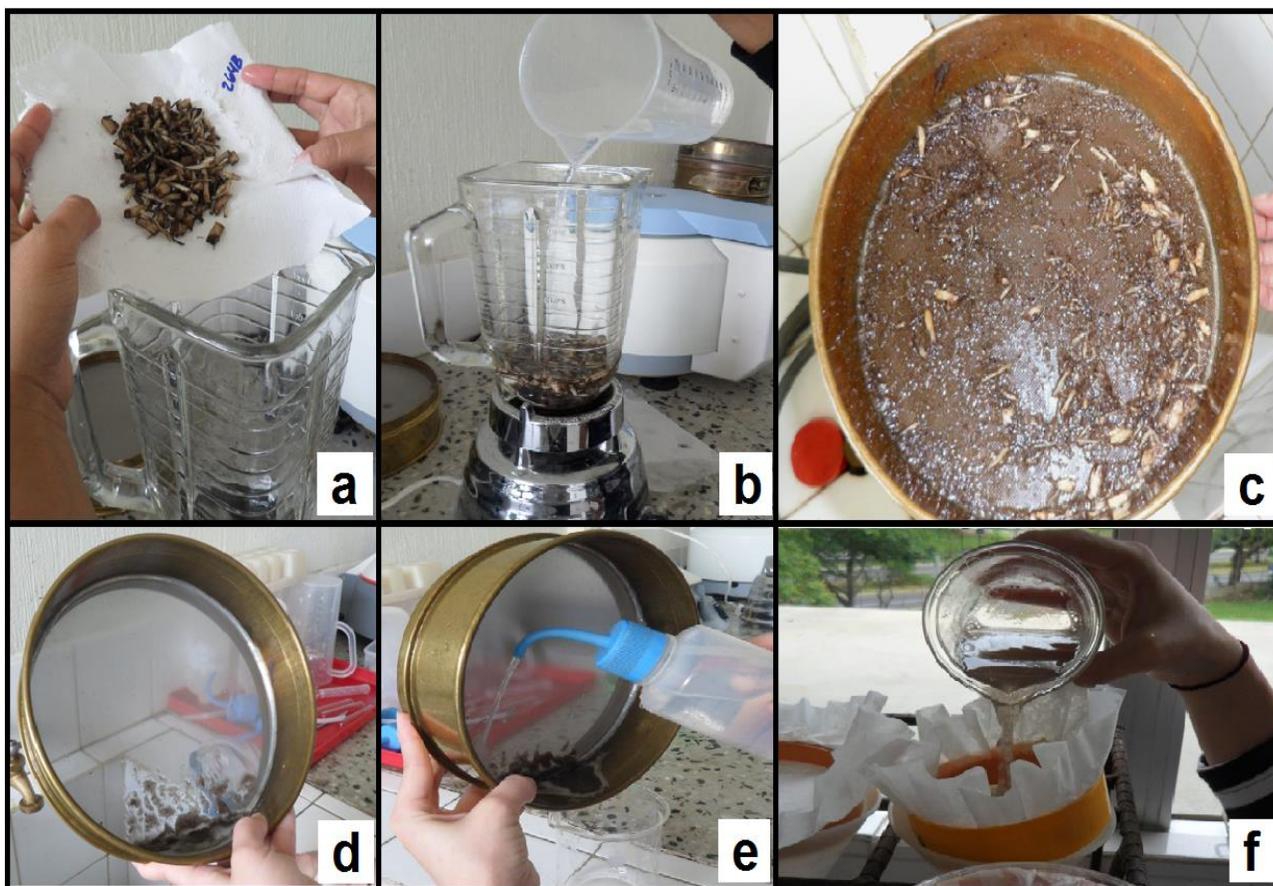


Figura 28. Extracción de nematodos a través del licuado y tamizado. **a.** muestras vegetales en licuadora, **b.** agregar agua, **c.** filtrar la muestra en tamices, **d.** coleccionar el contenido del tamiz **e.** colocar en un beaker de 250 ml, **f.** contenido coleccionado colocar en embudo de Baermann. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.6.6 Nebulizadora

También conocida como neblinera, embudos (llovizna-embudos), esta técnica es un refinamiento de la técnica de embudos de Baermann, sustituye el agua dentro del embudo por llovizna la cual cae constantemente sobre el embudo. Puede utilizarse para muestras de tejido vegetal.

A. Objetivo

Obtener y cuantificar nematodos filiformes por medio de esta técnica

B. Materiales

- Embudos de Baermann
- Tubos de ensayo
- Papel filtro

- Nebulizadora
- Beaker de 25ml

C. Procedimiento

- Se preparan la técnica de embudos de Baermann con la excepción de utilizar pinzas y manguera de hule.
- Se colocan los embudos en una rejilla y en la parte inferior tubular del embudo se coloca un tubo de ensayo de 20 cm de longitud, de tal forma que el agua que deslice por el embudo caiga directamente al tubo de ensayo.
- Se coloca el material vegetal o suelo en la canasta del embudo.
- Se identifica con número correlativo y tipo de muestra utilizada, el intervalo de la llovizna debe ser 1.5 a 3 min por 8.5-15 min de descanso.
- Se incuba de 1-5 días
- El volumen de agua que cae a los tubos de ensayo irá en aumento hasta llenarse
- Luego de cumplir con la incubación, se retiran los tubos de ensayo cuidadosamente, y se dejan en reposo 1-2 horas.
- Luego se desecha cuidadosamente el agua más superficial con la ayuda de una pipeta, no debe permitirse que los nematodos que están en el fondo se pongan en suspensión.
- Y se toman 20 ml del agua del fondo que queda en el fondo del tubo de ensayo.

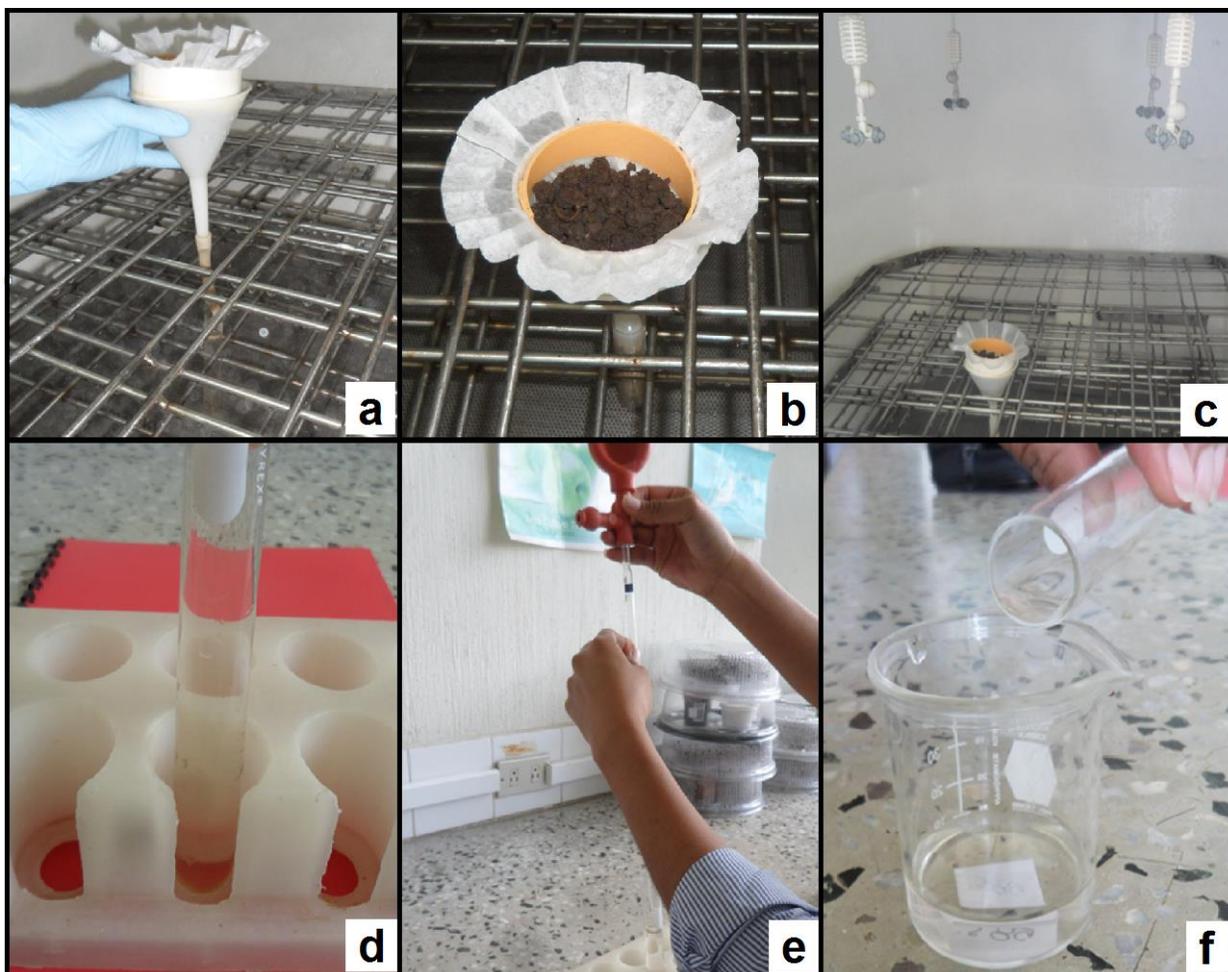


Figura 29. Extracción de nematodos a través de la nebulizadora. **a.** embudo de Baermann, **b.** pesar la muestra y colocar la muestra sobre embudo de Baermann, **c.** embudo en la nebulizadora, **d.** retirar el tubo de ensayo y dejar reposar, **e.** desechar el agua más superficial con una pipeta, **f.** coleccionar 20 ml de agua del fondo del tubo de ensayo. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.6.7 Fenwick modificado con flotación en acetona

A. Objetivo

Realizar un procedimiento adecuado para la extracción de nematodos de quiste al igual que su identificación

B. Materiales

- Sistema embudo de matraz (Fenwik)
- Tamiz No. 35 y 200
- Beaker de 250 ml.

- Embudo de 10 cm de diámetro
- Papel filtro
- Acetona
- Piseta
- Erlenmeyer de 25 ml
- Pincel número 10
- Recipiente de plástico
- Muestras de suelo

C. Procedimiento

- Colocar la muestra de suelo en papel periódico a modo que quede bien distribuida, romper terrones si los hubiera en la muestra y dejar secar durante un periodo de 8 días a temperatura ambiente bajo sombra esto para evitar la solarización del suelo (no someterla a calentamiento).
- Preparar un sistema embudo–matraz (EM) de lámina galvanizada, de aproximadamente 9 litros de capacidad, el cual está conformado por: embudo galvanizado con soporte para el embudo, matraz galvanizado con rampa de reflote y tamiz de No. 35 en la parte superior para recolección de materiales gruesos y un soporte de metal para otro tamiz No. 200 para coleccionar el material de flotación donde se arrastran los quistes y materia orgánica.
- Colocar 500ml de agua en un beaker de 1,000 ml, aforar con suelo seco, hasta que el nivel del agua alcance 800 ml, lo que nos equivale a 300 gr de muestra de suelo necesario para el análisis.
- Mezclar los 800 ml de suelo y agua del beaker de 1,000 ml en un recipiente de plástico conteniendo aproximadamente 1 L de agua.
- Verter el contenido sobre el tamiz de No. 35 el cual está colocado y acoplado en la parte superior del embudo del sistema EM y se hace pasar una corriente de agua a presión, para permitir el arrastre del suelo hacia el fondo del matraz.

- En el fondo del sistema EM, se acumularan las partículas de suelo más pesadas y en la parte superior, en la rampa del matraz, sale debido a su menor densidad materia orgánica y quistes, los que serán recolectados en el tamiz No. 200.
- En un embudo de 10 cm de diámetro, se coloca papel filtro y con ayuda de una piseta con agua se recolecta la mezcla de materia orgánica y quistes contenidos en el tamiz No. 200 para ser depositada sobre el papel filtro y poder así proceder a secar el material obtenido de la filtración del sistema EM.
- El material recolectado sobre el papel filtro se seca a temperatura ambiente a la sombra, por espacio de aproximadamente 6 a 12 horas.
- Posteriormente la muestra deshidratada, se disgrega con ayuda de un pincel de cerda semi gruesa, número 10, y se vacía dentro de un erlenmeyer de 125 ml.
- Se agregara acetona de grado industrial hasta la mitad del erlenmeyer, se agita fuertemente, y luego se concluye llenar con acetona hasta el borde del erlenmeyer.
- Se deja reposar durante un período de 30 a 60 segundos, quistes y materia orgánica flotan en el borde del erlenmeyer
- Los quistes y la materia orgánica se colectan con un pincel y se depositan en capsulas de aluminio, la cual permite su flotación y separación.
- Se procede a la observación y separación de quistes en el estereoscopio.
- Posteriormente se realizan montajes o cortes perineales para su determinación, mediante a claves taxonómicas del CDP.

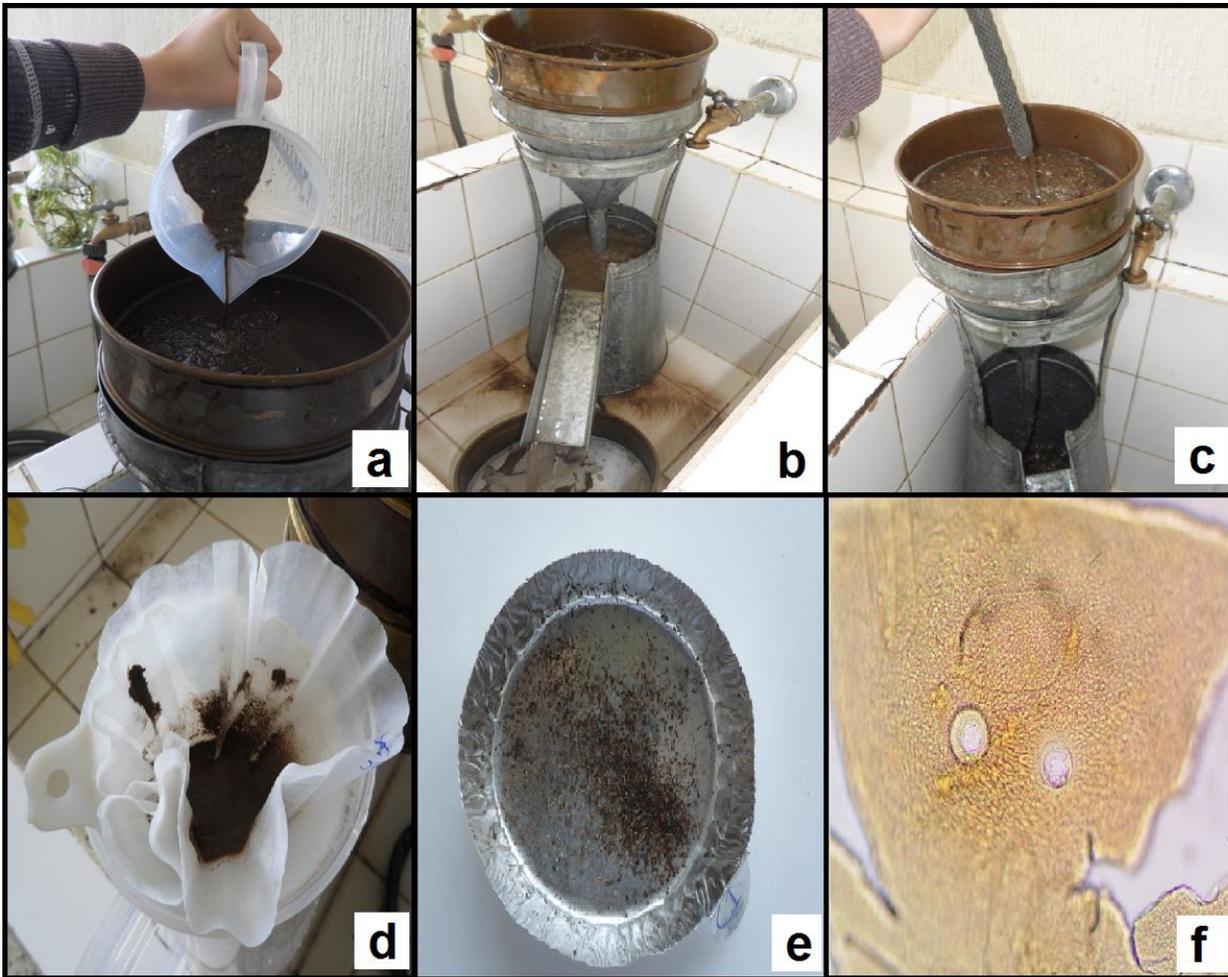


Figura 30. Extracción de nematodos de quiste a través del método de Fenwick modificado con flotación en acetona. **a** y **b.** muestra sobre el embudo de Fenwick, **c.** agregar agua presión, **d.** colecta de contenido del tamiz y secar, **e.** realizar la flotación con acetona, **f.** conteo e identificación de nematodos de quiste. Fuente: Noj Suruy 2014.

3.7 PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

- **MEDIOS DE CULTIVO**

3.7.1 Medio selectivo PARBPH Y PARPB

El aislamiento de las especies de *Phytophthora* a partir del suelo y raíces de plantas infectadas es bastante difícil, debido fundamentalmente la interferencia que ejercen otros hongos de crecimiento más acelerado, como es el caso de especies del género de *Pythium*. Para solucionar este problema Masago H. *et al.* (1997) idearon un medio selectivo para *Phytophthora* capaz de inhibir el crecimiento de las especies de *Pythium*

Componentes de medio PARPBH

- Corn meal agar
- Antibioticos
 - Pimaricina
 - Ampicilina
 - Rifampicina
 - PCNB
 - Benomyl
 - Hymexasol

Componentes de medio PARPB

- Cornmeal agar
- Antibioticos
 - Pimaricina
 - Ampicilina
 - Rifampicina
 - PCNB
 - Benomyl

A. Objetivo

Obtener un medio selectivo para el desarrollo y crecimiento de oomycetos del género *Pythium* y *Phytophthora*

B. Materiales

- Antibióticos
- Cornmeal agar
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 500ml
- Tapones
- Papel kraft
- Hilo de cáñamo

C. Procedimiento

- Pesar los antibióticos y medio corn meal agar con las siguientes concentraciones:

Cuadro 16. Concentraciones de reactivos y antibióticos para realizar medios de cultivo selectivo para oomycetos

Reactivo / Antibiótico	1L Agua destilada
Pimaricina	0.40 ml
PCNB	0.10 gr
Ampicilina	0.15 gr
Rifampicina	0.02 gr
Benomyl	0.02 gr
Hymexasol	0.069 ml
Cornmeal agar	17 gr

Fuente: Noj Suruy 2014

- Pesar los antibióticos y medio corn meal agar para 350 ml
- Tomar 320 ml de agua destilada y colocar en un erlenmeyer de 500ml
- Colocar el medio corn meal agar en el erlenmeyer
- Agitar el erlenmeyer con el contenido y colocar en el microondas por intervalos de 30 segundos para disolver el medio con mayor facilidad

- Luego de debe tapar el erlenmeyer con tapones de algodón y gaza, sobre el tapón se coloca papel kraft y se sella con hilo de cáñamo a través de un nudo.
- Se procede a esterilizar el medio de cultivo en autoclave por 15 min a 121°C y 20 PSI
- Luego de esterilizar el medio de cultivo se lleva a la cámara de flujo laminar para agregar los antibióticos
- Antes de agregar los antibióticos al medio de cultivo se debe disolver en 5ml de agua destilada estéril cada uno de los antibióticos sólidos y agitarse utilizando una micro espátula
- Luego de disolverse los antibióticos se agregan al medio de cultivo, se agita el medio y se procede a verter a las cajas petri.
- Las cajas petri con medio se sellan con parafilm, se identifican con nombre del medio y fecha de realización y posteriormente se llevan a la refrigeradora.

Nota: se deben realizar 350 ml de medio (70% de capacidad), debido a que, al momento de esterilizar el medio tiene un punto de ebullición, el cual, si se agrega más de la cantidad propuesta en el erlenmeyer este se derrama.

3.7.2 Potato dextrosa agar (PDA)

A. Objetivo

Obtener un medio de cultivo para el crecimiento y desarrollo para todo tipo de hongos

B. Materiales

- Potato agar dextrosa (PDA)
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 500ml

C. Procedimiento

- Pesar los reactivos con las siguientes concentraciones:

Cuadro 17. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo PDA

Reactivo	1L Agua destilada
Potato dextrosa agar (PDA)	39 gr

Fuente: Noj Suruy 2014

- Tomar 350 ml de agua destilada y colocar en un erlenmeyer de 500ml
- Colocar el medio PDA para 350 ml en el erlenmeyer
- Agitar el erlenmeyer con medio de cultivo y se coloca en el microondas por intervalos de 30 segundos para que se disuelva el medio con mayor facilidad
- Luego de debe cerrar el erlenmeyer con tapones de algodón y gaza, sobre el tapón se coloca papel kraft y se sella con hilo de cáñamo a través de un nudo.
- Se procede a esterilizar el medio en autoclave por 15 min a 121°C y 20 PSI
- Luego de esterilizar el medio se lleva a la cámara de flujo laminar para proceder a verter el medio de cultivo a las cajas petri.
- Las cajas petri se sellan con parafilm, se identifican con nombre del medio de cultivo y fecha de realización y posteriormente se llevan a la refrigeradora.

3.7.3 Agar agua

A. Objetivo

Obtener un medio de cultivo para realizar aislamientos de punta de hifa y/o cultivos monosporicos.

B. Materiales

- Medio Agar agar
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 500ml

C. Procedimiento

- Pesar los reactivos con las siguientes concentraciones:

Cuadro 18. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo agar agua.

Reactivo	1L Agua destilada
Agar agar	30 gr

Fuente: Noj Suruy 2014

- Se coloca el medio agar agar en un erlenmeyer con agua destilada
- Agitar el erlenmeyer con medio de cultivo y se coloca en el microondas por intervalos de 30 segundos para que se disuelva el medio con mayor facilidad
- Luego de debe tapar el erlenmeyer con tapones de algodón y gaza, sobre el tapón se coloca papel kraft y se sella con hilo de cáñamo a través de un nudo.
- Se procede a esterilizar el medio en autoclave por 15 min a 121°C y 20 PSI
- Luego de esterilizar el medio se lleva a la cámara de flujo laminar para proceder a verter el medio a las cajas petri.

MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO DE BACTERIAS

A continuación se mencionan las concentraciones de reactivos a utilizar para medios de cultivo de aislamiento de bacterias.

3.7.4 YDC

A. Objetivo

Obtener un medio para cultivar e identificar géneros de bacterias *Xanthomonas* y *Erwinias* y para mantener con más tiempo de vida un cultivo.

B. Materiales

- Extracto de levadura
- Dextrosa
- Carbonato de calcio
- Agar agar
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 500ml

C. Procedimiento

- Pesar los reactivos con las siguientes concentraciones:

Cuadro 19. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo YDC

Reactivo	1L Agua destilada
Extracto de levadura	10 gr
Dextrosa	20 gr
Carbonato de calcio	20 gr
Agar agar	20 gr

Fuente: Noj Suruy 2014

- Se coloca los reactivos en un erlenmeyer con agua destilada
- Agitar el erlenmeyer con medio de cultivo y se coloca en el microondas por intervalos de 30 segundos para que se disuelva el medio con mayor facilidad
- Luego de debe tapar el erlenmeyer con tapones de algodón y gaza, sobre el tapón se coloca papel kraft y se sella con hilo de cáñamo a través de un nudo.
- Se procede a esterilizar el medio en autoclave por 15 min a 121°C y 20 PSI
- Luego de esterilizar el medio se lleva a la cámara de flujo laminar para proceder a verter el medio a las cajas petri.

NOTA: al llenar cajas y/o tubos debe agitarse bien la solución ya que el carbonato de calcio tiende a sedimentarse.

3.7.5 B KING

Este utiliza para cultivar bacterias *Pseudomonas*, las cuales se identifican porque irradian fluorescencia al exponer el cultivo a las luz ultravioleta de la cámara de flujo laminar.

A. Objetivo

Obtener un medio para cultivar e identificar géneros de bacterias *Xanthomonas* y *Erwinias* y para mantener con más tiempo de vida un cultivo.

B. Materiales

- Peptona
- $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$
- $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
- Agar agar
- Glicerina

- Agua destilada
- Erlenmeyer de 500ml

C. Procedimiento

- Pesar los reactivos con las siguientes concentraciones:

Cuadro 20. Concentraciones de reactivos para realizar medios de cultivo B King.

Reactivo	1L Agua destilada
Peptona	20 gr
$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	2.5 gr
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	6 gr
Agar agar	20 gr
Glicerina	15ml

Fuente: Noj Suruy 2014

- Se coloca los reactivos en un erlenmeyer con agua destilada
- Agitar el erlenmeyer con medio de cultivo y se coloca en el microondas por intervalos de 30 segundos para que se disuelva el medio con mayor facilidad
- Luego de debe tapar el erlenmeyer con tapones de algodón y gaza, sobre el tapón se coloca papel kraft y se sella con hilo de cáñamo a través de un nudo.
- Se procede a esterilizar el medio en autoclave por 15 min a 121°C y 20 PSI
- Luego de esterilizar el medio se lleva a la cámara de flujo laminar para proceder a verter el medio a las cajas petri.

- **SOLUCIONES**

3.7.6 Solución de suelo

A. Objetivo

Obtener una solución nutritiva utilizando suelo para el desarrollo y crecimiento de oomycetos

B. Materiales

- Balanza
- Beaker de 1000 ml
- Agua destilada

C. Procedimiento

- Pesar 100 gramos de suelo
- Colocar el suelo en un beaker de 1000 ml y aforar con agua destilada hasta 1000 ml
- Dejar reposar por 24 horas
- Luego del reposo se toman 100 ml del decantado y se colocan nuevamente en un beaker de 1000 ml y aforar a 1000 ml
- Esterilizar por 15 minutos a 121°C

3.7.7 Solución de azúcar**A. Objetivo**

Obtener una solución de sacarosa utilizada para flotación de agentes parásitos como: nematodos, esclerocios, etc.

B. Materiales

- Azúcar
- Agua destilada
- Erlenmeyer de 1000 ml
- Frascos de 500ml
- Balanza

C. Procedimiento

- Se utiliza una concentración de azúcar al 1M es decir 454 gramos de azúcar por litro de agua destilada
- Se pesa 454 gramos de azúcar y agregar 1000 ml de agua destilada
- Se agrega el azúcar y el agua a un erlenmeyer de 1000ml y se agita hasta disolver el azúcar (el agua y azúcar se puede fraccionar para realizar el procedimiento con mayor facilidad)
- Luego se coloca en frascos herméticos y se colocar en la refrigeradora.

3.7.8 Evaluación

Se planteó realizar el manual de procedimientos para la realización de diagnóstico del Centro de Diagnóstico Parasitológico, se cumplió en 100% con la descripción de cada uno de los procedimientos que se llevan a cabo dentro de dicha institución.

Este documento se realizó con la necesidad obtener un manual y que sea útil para personas que deseen laborar como laboratoristas, epesistas, tesistas, etc.

El presente documento ya fue revisado y está siendo utilizando para el objetivo planteado, es decir lo están utilizando técnicos de laboratorio del CDP

3.8 CONCLUSIONES

- Se elaboró un manual de procedimientos para la realización de diagnósticos del Centro de Diagnóstico Parasitológico, Facultad De Agronomía, USAC, describiendo los procesos, materiales, equipo a utilizar y objetivos para la realización de diagnóstico Fitopatológico, bacteriológico y nematológico.

3.9 RECOMENDACIONES

- Actualizar cada año el manual de procedimientos e incorporar nuevas metodologías para la realización de diagnósticos y de ese modo estar a la vanguardia de la tecnología y con ello garantizar los resultados de la muestra ingresada al Centro de Diagnóstico Parasitológico.

3.10 BIBLIOGRAFÍA

1. Cepeda, SM. 1995. Prácticas de nematología agrícola. México, Trillas. 109p.
2. Cortés Rodríguez, C. 2011. Manual de prácticas de fitopatología. Ciudad Juárez, Chihuahua, México, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. 81 p.
3. FAO, IT. 2001. *Phytophthora*: características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales, medidas de control (en línea). Cuba, Depósito de documentos de la FAO. Consultado 14 mar 2014. Disponible en <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>
4. Lored Vega, JG; Mena Adriano, JD. 2009. Manual de prácticas del laboratorio de fitopatología. Sinaloa, México, Universidad Autónoma de Sinaloa, Unidad Regional Norte. 80 p.
5. Reyes Consuegra, LJ. 2008. Prospección de enfermedades de raíces y tallos en el cultivo de flores de corte en San Juan Sacatepéquez, Guatemala y servicios de análisis desarrollados en el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 122 p
6. Silva Mejía, JJ. 1993. Fórmulas y metodología de preparación de algunos medios de cultivo y reactivos más utilizados en los Laboratorios de Fitopatología y Microbiología de la Subárea de Protección de Plantas. Guatemala, USAC, Facultad de Agronomía. 21 p.



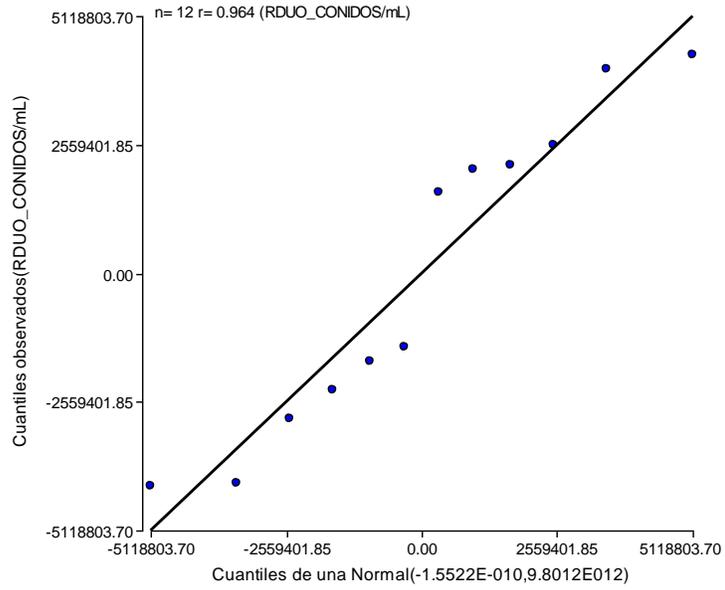
Rolando Barrios

4. APÉNDICE

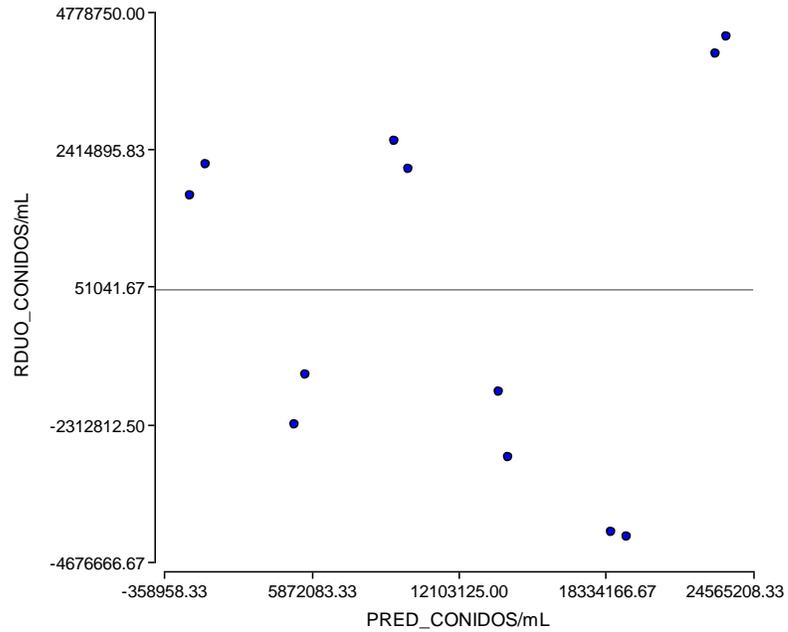
4.1 APÉNDICE CAPÍTULO II

4.1.1 Supuestos del análisis de varianza

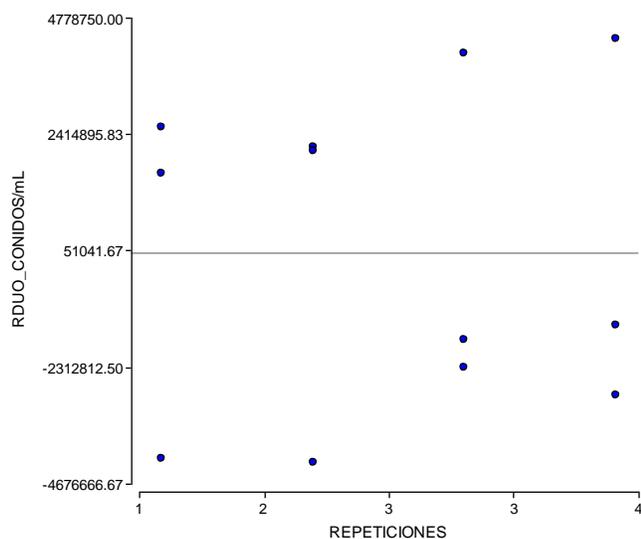
A. Normalidad



B. Homogeneidad



D. Independencia



Cuadro 21A. Lectura para recuento de conidios, conteo a los 8 días de incubación (Factores de conversión en base a GAB 2015)

LECTURA 1						LECTURA 2					
1	12	11	9	8		1	14	11	10	30	
2	6	16	9	4		2	3	5	7	14	
3	13	17	11	10	16	3	8	10	10	11	16
4	5	7	10	9	4000	4	6	12	8	14	4000
5	14	5	14	7	1000	5	12	7	11	11	1000
Promedio	10	11.2	10.6	7.6		promedio	8.6	9	9.2	16	
Total	3E+06	3E+06	3E+06	2E+06	2E+06	total	2E+06	2E+06	2E+06	4E+06	3E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	14	8	11	9		1	7	18	8	14	
2	10	4	20	16		2	9	19	17	16	
3	11	14	13	8	16	3	13	15	20	8	16
4	21	7	8	15	4000	4	16	16	10	12	4000
5	5	6	14	5	1000	5	16	17	28	10	1000
Promedio	12.2	7.8	13.2	10.6		promedio	12.2	17	16.6	12	
Total	3E+06	2E+06	3E+06	3E+06	3E+06	total	3E+06	4E+06	4E+06	3E+06	4E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	8	7	11	15		1	16	10	19	11	
2	6	7	13	4		2	13	30	25	13	
3	6	10	9	8	16	3	19	18	16	25	16
4	7	4	7	12	4000	4	16	21	14	17	4000
5	6	12	13	9	1000	5	10	13	20	13	1000
Promedio	6.6	8	10.6	9.6		promedio	14.8	18.4	18.8	15.8	
Total	2E+06	2E+06	3E+06	2E+06	2E+06	total	4E+06	5E+06	5E+06	4E+06	4E+06

LECTURA 1						LECTURA 2					
1	8	6	9	6		1	24	12	8	17	
2	5	5	7	11		2	13	20	14	22	
3	13	13	8	5	16	3	15	10	11	14	16
4	16	11	5	13	4000	4	22	10	19	19	4000
5	10	11	6	5	1000	5	13	11	15	16	1000
Promedio	10.4	9.2	7	8		promedio	17.4	12.6	13.4	17.6	
Total	3E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	total	4E+06	3E+06	3E+06	4E+06	4E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	10	5	6	4		1	23	12	26	19	
2	8	18	10	6		2	26	18	23	10	
3	9	8	9	8	16	3	20	16	16	16	16
4	11	14	15	30	4000	4	25	27	18	18	4000
5	14	9	6	12	1000	5	13	22	12	19	1000
Promedio	10.4	10.8	9.2	12		promedio	21.4	19	19	16.4	
Total	3E+06	3E+06	2E+06	3E+06	3E+06	total	5E+06	5E+06	5E+06	4E+06	5E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	5	5	4	11		1	10	9	12	5	
2	7	8	6	19		2	8	5	8	13	
3	4	3	13	11	16	3	6	6	7	6	16
4	12	7	5	4	4000	4	5	9	6	9	4000
5	14	20	10	5	1000	5	12	8	6	14	1000
Promedio	8.4	8.6	7.6	10		promedio	8.2	7.4	7.8	9.4	
Total	2E+06	2E+06	2E+06	3E+06	2E+06	total	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	7	11	21	8		1	28	13	21	18	
2	13	30	30	10		2	22	23	19	25	
3	15	13	6	9	16	3	26	18	24	21	16
4	8	14	8	7	4000	4	22	26	25	16	4000
5	10	12	26	13	1000	5	20	22	13	12	1000
Promedio	10.6	16	18.2	9.4		promedio	23.6	20.4	20.4	18.4	
Total	3E+06	4E+06	5E+06	2E+06	3E+06	total	6E+06	5E+06	5E+06	5E+06	5E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	17	10	7	17		1	24	16	19	26	
2	13	5	9	13		2	15	21	18	30	
3	11	19	16	12	16	3	18	18	9	10	16
4	10	14	5	11	4000	4	20	17	21	19	4000
5	25	21	13	21	1000	5	24	16	21	16	1000
Promedio	15.2	13.8	10	14.8		promedio	20.2	17.6	17.6	20.2	
Total	4E+06	3E+06	3E+06	4E+06	3E+06	total	5E+06	4E+06	4E+06	5E+06	5E+06

Cuadro 22A. Resumen promedio de conidios/ml por lectura para el recuento de conidios a los 8 días de incubación

Lectura	1	2	3	4
Cantidad de conidios/ml	2462500	2675000	2650000	4737500
	2737500	3612500	2162500	2050000
	2175000	4237500	3387500	5175000
	2162500	3812500	3362500	4725000
PROMEDIO	2384375	3584375	2890625	4171875

Cuadro 23A. Lectura para recuento de conidios, conteo a los 12 días de incubación.(Factores de conversión en base a GAB 2015)

LECTURA 1						LECTURA 2					
1	9	7	15	10		1	14	8	7	16	
2	7	8	10	7		2	5	16	12	14	
3	8	8	12	11	16	3	9	8	4	4	16
4	9	6	8	9	4000	4	8	5	8	9	4000
5	7	7	9	16	1000	5	9	8	9	6	1000
promedio	8	7.2	10.8	10.6		promedio	9	9	8	9.8	
total	2E+06	2E+06	3E+06	3E+06	2E+06	Total	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	5	8	13	4		1	8	7	10	4	
2	17	7	13	11		2	7	10	18	7	
3	10	10	11	10	16	3	9	8	10	11	16
4	13	2	5	11	4000	4	16	18	12	8	4000
5	10	11	10	7	1000	5	10	11	6	14	1000
promedio	11	7.6	10.4	8.6		promedio	10	10.8	11.2	8.8	
total	3E+06	2E+06	3E+06	2E+06	2E+06	Total	3E+06	3E+06	3E+06	2E+06	3E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	7	8	9	10		1	6	11	10	13	
2	12	7	12	5		2	6	8	12	6	
3	6	9	7	7	16	3	9	8	8	9	16
4	10	7	10	7	4000	4	8	4	7	12	4000
5	8	10	13	12	1000	5	10	10	16	7	1000
promedio	8.6	8.2	10.2	8.2		promedio	7.8	8.2	10.6	9.4	
total	2E+06	2E+06	3E+06	2E+06	2E+06	Total	2E+06	2E+06	3E+06	2E+06	2E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	6	8	6	15		1	12	23	11	12	
2	10	8	9	9		2	10	7	6	17	
3	12	12	12	10	16	3	5	9	9	9	16
4	16	12	14	8	4000	4	11	10	12	8	4000
5	14	7	21	7	1000	5	8	18	4	10	1000

promedio	11.6	9.4	12.4	9.8		promedio	9.2	13.4	8.4	11.2	
total	3E+06	2E+06	3E+06	2E+06	3E+06	Total	2E+06	3E+06	2E+06	3E+06	3E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	13	10	8	10		1	15	22	7	7	
2	8	7	8	7		2	11	6	9	4	
3	8	8	7	8	16	3	10	11	8	9	16
4	6	16	7	10	4000	4	5	7	7	7	4000
5	9	6	6	8	1000	5	4	8	9	8	1000
promedio	8.8	9.4	7.2	8.6		promedio	9	10.8	8	7	
total	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	Total	2E+06	3E+06	2E+06	2E+06	2E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	8	8	8	7		1	6	9	10	5	
2	7	6	7	9		2	5	7	18	9	
3	10	11	11	11	16	3	8	10	8	10	16
4	8	5	9	6	4000	4	3	8	9	6	4000
5	9	12	5	6	1000	5	5	12	8	13	1000
promedio	8.4	8.4	8	7.8		promedio	5.4	9.2	10.6	8.6	
total	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	Total	1E+06	2E+06	3E+06	2E+06	2E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	10	11	14	12		1	4	10	8	18	
2	14	11	10	22		2	7	10	6	10	
3	16	9	9	14	16	3	12	6	14	17	16
4	13	10	9	25	4000	4	13	8	16	11	4000
5	10	8	13	8	1000	5	9	7	7	6	1000
promedio	12.6	9.8	11	16.2		promedio	9	8.2	10.2	12.4	
total	3E+06	2E+06	3E+06	4E+06	3E+06	Total	2E+06	2E+06	3E+06	3E+06	2E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	7	8	7	7		1	9	12	9	11	
2	9	7	9	8		2	7	8	8	10	
3	10	10	11	8	16	3	11	11	7	12	16
4	5	11	12	17	4000	4	10	9	11	7	4000
5	11	12	7	14	1000	5	8	7	9	8	1000
promedio	8.4	9.6	9.2	10.8		promedio	9	9.4	8.8	9.6	
total	2E+06	2E+06	2E+06	3E+06	2E+06	Total	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06

Cuadro 24A. Resumen promedio de conidios/ml por lectura para el recuento de conidios a los 12 días de incubación

Lectura	1	2	3	4
Cantidad de conidios/ml	11437500	11187500	10625000	10875000
	11750000	12750000	10187500	10562500
	11000000	11250000	15500000	12437500
	13500000	13187500	11875000	11500000
PROMEDIO	11921875	12093750	12046875	11343750

Cuadro 25A. Lectura para recuento de conidios, conteo a los 16 días de incubación. (Factores de conversión en base a GAB 2015)

LECTURA 1						LECTURA 2					
1	3	4	8	4		1	10	4	4	7	
2	10	5	4	3		2	2	4	12	13	
3	6	6	2	2	16	3	14	4	6	8	16
4	3	10	7	5	4000	4	9	14	8	5	4000
5	7	11	5	7	1000	5	3	7	6	6	1000
Promedio	5.8	7.2	5.2	4.2		promedio	7.6	6.6	7.2	7.8	
Total	1E+06	2E+06	1E+06	1E+06	1E+06	total	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06	2E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	5	4	2	2		1	6	4	11	7	
2	8	4	2	4		2	5	7	10	5	
3	6	6	8	8	16	3	2	12	5	5	16
4	11	5	6	10	4000	4	6	4	10	4	4000
5	11	3	10	8	1000	5	3	12	5	7	1000
Promedio	8.2	4.4	5.6	6.4		promedio	4.4	7.8	8.2	5.6	
Total	2E+06	1E+06	1E+06	2E+06	2E+06	total	1E+06	2E+06	2E+06	1E+06	2E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	4	5	3	5		1	6	2	4	8	
2	3	13	2	6		2	6	5	11	2	
3	7	6	4	4	16	3	1	3	2	3	16
4	11	7	12	6	4000	4	4	5	4	8	4000
5	5	4	8	5	1000	5	8	3	3	9	1000
Promedio	6	7	5.8	5.2		promedio	5	3.6	4.8	6	
Total	2E+06	2E+06	1E+06	1E+06	2E+06	total	1E+06	9E+05	1E+06	2E+06	1E+06
LECTURA 1						LECTURA 2					
1	4	7	3	2		1	5	5	5	6	
2	7	9	6	2		2	6	2	6	1	
3	9	7	8	7	16	3	6	4	11	11	16
4	7	3	9	3	4000	4	3	3	9	4	4000

5	8	5	14	7	1000	5	3	3	9	4	1000
Promedio	7	6.2	8			promedio	4.6	3.4	8	5.2	
Total	2E+06	2E+06	2E+06	0	1E+06	total	1E+06	9E+05	2E+06	1E+06	1E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	18	9	9	13		1	13	16	18	4	
2	12	7	9	8		2	11	8	8	9	
3	18	17	13	12	16	3	3	3	8	9	16
4	10	4	6	9	4000	4	12	22	9	14	4000
5	7	10	12	9	1000	5	9	20	13	13	1000
Promedio	13	9.4	9.8	10.2		promedio	9.6	13.8	11.2	9.8	
Total	3E+06	2E+06	2E+06	3E+06	3E+06	total	2E+06	3E+06	3E+06	2E+06	3E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	8	7	10	15		1	7	6	12	12	
2	9	10	7	7		2	7	9	7	10	
3	13	11	6	5	16	3	10	10	12	12	16
4	19	3	17	26	4000	4	14	11	14	10	4000
5	6	17	15	6	1000	5	12	14	8	10	1000
Promedio	11	9.6	11	11.8		promedio	10	10	10.6	10.8	
Total	3E+06	2E+06	3E+06	3E+06	3E+06	total	3E+06	3E+06	3E+06	3E+06	3E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	9	10	8	9		1	15	7	15	11	
2	11	18	12	6		2	11	9	13	10	
3	7	7	11	11	16	3	14	14	8	8	16
4	19	9	8	16	4000	4	6	13	14	12	4000
5	13	12	8	7	1000	5	14	6	13	14	1000
Promedio	11.8	11.2	9.4	9.8		promedio	12	9.8	12.6	11	
Total	3E+06	3E+06	2E+06	2E+06	3E+06	total	3E+06	2E+06	3E+06	3E+06	3E+06
LECTURA 3						LECTURA 4					
1	13	11	13	9		1	9	10	22	10	
2	18	10	6	13		2	16	7	7	6	
3	10	10	11	12	16	3	12	12	15	12	16
4	10	3	16	8	4000	4	14	7	18	14	4000
5	16	17	12	8	1000	5	7	8	16	11	1000
Promedio	13.4	10.2	11.6	10		promedio	11.6	8.8	15.6	10.6	
Total	3E+06	3E+06	3E+06	3E+06	3E+06	total	3E+06	2E+06	4E+06	3E+06	3E+06

Cuadro 26A. Resumen promedio de conidios/ml por lectura para el recuento de conidios a los 16 días de incubación

Lectura	1	2	3	4
Cantidad de conidios/ml	14000000	18250000	26500000	27750000
	15375000	16250000	27125000	25875000
	15000000	12125000	26375000	28375000
	13250000	13250000	28250000	29125000
PROMEDIO	14406250	14968750	27062500	27781250

Cuadro 27A. Toma de datos para porcentaje de viabilidad a los 18 y 24 horas a los 8 días

18 Horas	T3R1.1				24 horas	T3R1.2			
Campo 40X	Germinado	No Germinado	Total	%	Germinado	No Germinado	Total	%	
1	14	10	24	58.33	22	0	22	100	
2	11	6	17	64.71	22	2	24	91.7	
3	10	12	22	45.45	14	0	14	100	
4	11	7	18	61.11	15	1	16	93.8	
5	22	8	30	73.33	16	1	17	94.1	
6	22	13	35	62.86	20	0	20	100	
7	18	7	25	72	12	1	13	92.3	
8	21	8	29	72.41	10	0	10	100	
9	20	6	26	76.92	15	0	15	100	
10	33	9	42	78.57	12	0	12	100	
				66.57				97.2	
18 Horas	T3R2.1				24 Horas	T3R2.2			
1	36	13	49	73.47	30	1	31	96.8	
2	21	9	30	70	28	2	30	93.3	
3	39	18	57	68.42	23	2	25	92	
4	35	21	56	62.5	21	1	22	95.5	
5	41	19	60	68.33	24	0	24	100	
6	44	14	58	75.86	18	3	21	85.7	
7	33	16	49	67.35	18	0	18	100	
8	40	18	58	68.97	20	0	20	100	
9	25	18	43	58.14	26	1	27	96.3	
10	23	9	32	71.88	19	0	19	100	
				68.49				96	
18 Horas	T3R3.1				24 horas	T3R3.2			

1	35	14	49	71.43	24	2	26	92.3
2	28	12	40	70	35	4	39	89.7
3	29	13	42	69.05	44	6	50	88
4	22	11	33	66.67	28	2	30	93.3
5	30	9	39	76.92	36	3	39	92.3
6	26	7	33	78.79	38	1	39	97.4
7	24	10	34	70.59	39	3	42	92.9
8	15	9	24	62.5	41	2	43	95.3
9	26	11	37	70.27	43	5	48	89.6
10	28	6	34	82.35	47	3	50	94
				71.86				92.5
18 Horas	T3R4.1				24 horas	T3R4.2		
1	27	17	44	61.36	24	2	26	92.3
2	38	17	55	69.09	35	4	39	89.7
3	34	15	49	69.39	44	6	50	88
4	17	7	24	70.83	28	2	30	93.3
5	28	11	39	71.79	36	3	39	92.3
6	20	10	30	66.67	38	1	39	97.4
7	11	8	19	57.89	39	3	42	92.9
8	29	17	46	63.04	41	2	43	95.3
9	12	6	18	66.67	43	5	48	89.6
10	29	12	41	70.73	40	3	43	93
				66.75				92.4

Cuadro 28A. Toma de datos para porcentaje de viabilidad a los 18 y 24 horas a los 12 días

18 H	T3R1.1				24 Horas	T3R1.2.		
Campo 40X	Germinado	No Germinado	Total	%	Germinado	No Germinado	Total	%
1	44	3	47	93.62	107	2	109	98.17
2	27	4	31	87.10	81	0	81	100.00
3	33	3	36	91.67	79	0	79	100.00
4	43	1	44	97.73	93	1	94	98.94
5	38	2	40	95.00	98	2	100	98.00
6	32	2	34	94.12	131	1	132	99.24
7	33	1	34	97.06	95	1	96	98.96
8	40	1	41	97.56	82	1	83	98.80
9	41	3	44	93.18	101	0	101	100.00
10	30	2	32	93.75	93	2	95	97.89
				94.08				99.00
18 Horas	T3R2.1				24 Horas	T3R2.2		

1	42	3	45	93.33	39	0	39	100.00
2	60	2	62	96.77	24	1	25	96.00
3	44	6	50	88.00	36	2	38	94.74
4	43	1	44	97.73	31	0	31	100.00
5	40	2	42	95.24	23	0	23	100.00
6	35	1	36	97.22	29	0	29	100.00
7	46	4	50	92.00	20	1	21	95.24
8	50	1	51	98.04	33	1	34	97.06
9	59	3	62	95.16	39	0	39	100.00
10	39	2	41	95.12	43	2	45	95.56
				94.86				97.86
18 Horas	T3R3.1				24 Horas	T3R3.2		
1	50	1	51	98.04	98	0	98	100.00
2	19	4	23	82.61	72	0	72	100.00
3	40	2	42	95.24	52	1	53	98.11
4	53	3	56	94.64	40	0	40	100.00
5	45	2	47	95.74	35	0	35	100.00
6	40	1	41	97.56	42	0	42	100.00
7	26	2	28	92.86	45	2	47	95.74
8	39	2	41	95.12	44	1	45	97.78
9	29	5	34	85.29	65	0	65	100.00
10	38	1	39	97.44	70	1	71	98.59
				93.45				99.02
18 Horas	T3R4.1				24 Horas	T3R4.2		
1	28	3	31	90.32	51	0	51	100.00
2	43	5	48	89.58	59	2	61	96.72
3	54	2	56	96.43	57	2	59	96.61
4	46	7	53	86.79	53	2	55	96.36
5	47	3	50	94.00	40	1	41	97.56
6	30	2	32	93.75	28	0	28	100.00
7	32	1	33	96.97	48	1	49	97.96
8	38	5	43	88.37	43	2	45	95.56
9	21	4	25	84.00	36	0	36	100.00
10	33	2	35	94.29	21	0	21	100.00
				91.45				98.08

Cuadro 29A. Toma de datos para porcentaje de viabilidad a los 18 y 24 horas a los 16 días

18 Horas	T3R1.1				24 Horas	T3R1.2		
Campo 40X	Germinado	No Germinado	Total	%	Germinado	No Germinado	Total	%
1	28	1	29	96.55	38	0	38	100.00
2	28	2	30	93.33	29	0	29	100.00
3	27	3	30	90.00	53	0	53	100.00
4	25	0	25	100.00	42	0	42	100.00
5	29	1	30	96.67	56	0	56	100.00
6	35	4	39	89.74	41	1	42	97.62
7	27	4	31	87.10	58	1	59	98.31
8	24	3	27	88.89	36	0	36	100.00
9	26	3	29	89.66	12	0	12	100.00
10	29	1	30	96.67	14	0	14	100.00
				92.86				99.59
18 Horas	T3R2.1				24 Horas	T3R2.2		
1	70	2	72	97.22	40	0	40	100.00
2	68	2	70	97.14	19	0	19	100.00
3	60	4	64	93.75	25	0	25	100.00
4	69	1	70	98.57	28	1	29	96.55
5	70	3	73	95.89	16	0	16	100.00
6	40	2	42	95.24	21	0	21	100.00
7	45	1	46	97.83	27	0	27	100.00
8	59	2	61	96.72	17	0	17	100.00
9	36	1	37	97.30	31	0	31	100.00
10	33	1	34	97.06	18	0	18	100.00
				96.67				99.66
18 Horas	T3R3.1				24 Horas	T3R3.2		
1	79	3	82	96.34	131	2	133	98.50
2	89	2	91	97.80	125	1	126	99.21
3	71	4	75	94.67	144	2	146	98.63
4	90	3	93	96.77	104	2	106	98.11
5	98	5	103	95.15	83	1	84	98.81
6	85	6	91	93.41	25	0	25	100.00
7	98	3	101	97.03	89	0	89	100.00
8	83	5	88	94.32	97	0	97	100.00
9	59	2	61	96.72	102	1	103	99.03
10	63	3	66	95.45	114	0	114	100.00
				95.77				99.23
18 Horas	T3R4.1				24 Horas	T3R4.2		

1	26	0	26	100.00	69	1	70	98.57
2	28	1	29	96.55	55	0	55	100.00
3	33	2	35	94.29	48	0	48	100.00
4	20	0	20	100.00	36	0	36	100.00
5	33	1	34	97.06	94	1	95	98.95
6	35	1	36	97.22	49	0	49	100.00
7	37	1	38	97.37	52	1	53	98.11
8	16	0	16	100.00	62	1	63	98.41
9	22	2	24	91.67	43	1	44	97.73
10	28	1	29	96.55	31	0	31	100.00
				97.07				99.18

4.2 APÉNDICE CAPÍTULO III

Figura 31A. Registro de ingreso de muestra



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO
SOLICITUD DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO



I. REGISTRO DE INGRESO

FECHA: ___/___/___ No. CORRELATIVO _____ No. RECIBO _____
FITOPAGOLÓGIA ___ NEMATOLÓGIA ___ ENTOMOLOGÍA ___ MALEZAS ___ OTROS

II. DATOS DE USUARIO

Solicitante: _____ Teléfono: _____
Empresa: _____ Tel. ó Fax: _____
Dirección: _____
E-mail: _____

III. REGISTRO DE LA MUESTRA

Cultivo: _____
Procedencia: _____
Síntomas visibles: _____

IV. USO EXCLUSIVO LABORATORISTA

Método de análisis: _____

Resultados: _____

Observaciones: _____
Fecha de análisis: _____ Firma: _____

Figura 32A. Informe de resultados de muestra ingresada al CDP

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
CENTRO DE DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO



INFORME DE RESULTADOS

CORRELATIVO 0353 -2014	FECHA DE INGRESO 03/10/2014	FECHA DE MISION 24 /10/14	ANALISIS REALIZADO Fitopatológico
MUESTRA Tomate	PROCEDENCIA Casillas, Santa Rosa	EMPRESA	SOLICITANTE

Muestra analizada	Tallo
AGENTE DETECTADO	<i>Ralstonia solanacearum</i>

OBSERVACIONES Y RECOMENDACIONES

TECNICO DE LABORATORIO

Br. Roselia Solares

Br. Alba Marilía Noj

RESPONSABLE DE LABORATORIO

Ing. Agr. Gustavo Adolfo Álvarez