

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA DE LA SELVA

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES



**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL CAUSANTE
DE LA MANCHA FOLIAR EN PLANTAS DE *Anthurium andraeanum***

L. “ANTURIO” EN LA ZONA DE TINGO MARÍA

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES

MENCIÓN FORESTALES

PRESENTADO POR:

KOYLI KARINA SANDOVAL ROJAS

2018



ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

Los que suscriben, Miembros del Jurado de Tesis, reunidos con fecha 04 de Mayo de 2018, a horas 8:00 a.m. en la Sala de Sesiones del Departamento Académico de Ciencias Ambientales, para calificar la Tesis titulada:

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DEL CAUSANTE DE LA MANCHA FOLIAR EN PLANTAS DE *Anthurium andraeanum* L. “ANTURIO” EN LA ZONA DE TINGO MARÍA”

Presentado por la Bachiller: **KOYLI KARINA SANDOVAL ROJAS**, después de haber escuchado la sustentación y las respuestas a las interrogantes formuladas por el Jurado, se declara aprobado con el calificativo de **“MUY BUENO”**

En consecuencia, la sustentante queda apto para optar el Título de **INGENIERO EN RECURSOS NATURALES RENOVABLES**, Mención: **FORESTALES**, que será aprobado por el Consejo de Facultad, tramitándolo al Consejo Universitario para la otorgación del Título correspondiente.

Tingo María, 07 de setiembre de 2018

Ing. MSc. CASIANO AGUIRRE ESCALANTE
PRESIDENTE

Ing. JAIME TORRES GARCÍA
VOCAL

Blgo. MSc. JOSÉ KALION GUERRA LU
VOCAL



Dr. LADISLAO RUIZ RENGIFO
ASESOR

Ing. MSc. GIANNFRANGO EGOAVIL JUMP
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios, por su gran misericordia, por darme fuerza y sabiduría para enfrentar obstáculos y seguir adelante aún en los momentos más difíciles. A Jesús, en eterna gratitud y amor, por haber dado su vida por la mía.

Al gran amor de mi vida, mi hijo Marcelo Antonio que significa en cada instante de mi vida una motivación especial.

A mis queridos padres: Eva y Oscar, con eterna gratitud, quienes con mucho amor y sacrificio formaron en mí principios morales y éticos, e hicieron realidad mi más grande anhelo.

A mis hermanas Sady J., Eva Angélica y María Teresa, por ser una inspiración y ejemplo a seguir y mis sobrinos Carlos Nicolás, Franco y Eva Victoria que son estimulación en cada día de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional Agraria de la Selva y sus docentes, quienes me dieron una formación tecnológica, científica y humanista.
- A mis asesores Ing. M.Sc. Giannfranco Egoávil Jump por la colaboración en el ejecución, desarrollo y redacción de mi tesis y al Dr. Ladislao Ruiz Rengifo por la ejecución y revisión del presente informe de tesis.
- A los miembros del jurado de tesis Ing. M.Sc. Casiano Aguirre Escalante, Ing. Jaime Torres García y el Blgo. M.Sc. José Guerra Lu por sus valiosos aportes científicos, la orientación en la culminación de mi tesis y ser parte de mi formación profesional.
- A todos los docentes de la Facultad de Agronomía y la facultad de Recursos Naturales Renovables, quienes impartieron sus enseñanzas en mi formación profesional.
- A la Bach. Wilma Gonzales Toscano, por brindarme su amistad, colaboración y ejecución de mi tesis.
- A mis amigos por brindarme su amistad y el apoyo incondicional.

ÍNDICE

	Página
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. <i>Anthurium andraeanum</i> Linden 1887, “anturios”	3
2.1.1. Ubicación taxonómica.....	3
2.1.2. Origen y distribución	4
2.1.3. Importancia del cultivo	4
2.1.4. Enfermedades reportadas en anturios	5
2.2. <i>Pestalotia</i> sp. y <i>Pestalotiopsis</i> sp.	8
2.2.1. <i>Pestalotia</i> sp.	10
2.2.2. <i>Pestalotiopsis</i> sp.	14
2.3. Aislamiento de hongos.....	19
2.3.1. Factores relacionados al aislamiento	19
2.3.2. Técnicas de aislamiento	20
2.3.3. Preparativos para el aislamiento	21
2.3.4. Siembra	24
2.3.5. Incubación	26

2.3.6. Observación	26
2.4. Medios de cultivo	27
2.4.1. Según su consistencia.....	27
2.4.2. Por sus propiedades nutritivas	28
2.5. Efecto de la nutrición, de la temperatura y del pH en el desarrollo del patógeno.....	29
2.5.1. Efecto de la temperatura	30
2.5.2. Efecto del pH del suelo	33
2.6. Trabajos de crecimiento micelial en medios de cultivo	34
III. MATERIALES Y MÉTODOS	37
3.1. Lugar de ejecución.....	37
3.2. Zona de vida	37
3.3. Factores climáticos	37
3.4. Metodología	38
3.4.1. Aislamiento, identificación y caracterización del síntoma del agente causal de la mancha foliar.....	38
3.4.2. Evaluación del crecimiento del agente causal en diferentes medios de cultivos, pH y temperatura.....	48
3.4.3. Prueba del crecimiento micelial en niveles de pH	55

3.4.4. Prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de temperaturas	58
IV. RESULTADOS	61
4.1. Aislamiento, identificación y caracterización de síntomas del agente causal de la mancha foliar	61
4.1.1. Aislamiento	61
4.1.2. Identificación.....	62
4.1.3. Postulado de Koch	64
4.1.4. Síntoma de la enfermedad	65
4.2. Evaluación del crecimiento del agente causal en diferentes medios de cultivos, pH y temperatura	66
4.2.1. Prueba del crecimiento micelial con medios semisintéticos	66
4.2.2. Prueba del crecimiento micelial en niveles de pH	73
4.2.3. Prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de temperaturas.	78
V. DISCUSIÓN.....	83
5.1. Aislamiento, identificación y caracterización del síntoma del agente causal de la mancha foliar.....	83
5.2. Evaluación del crecimiento del agente causal en diferentes medios de cultivos, pH y temperatura	86

5.2.1. Prueba del crecimiento micelial con medios semisintéticos	86
5.2.2. Prueba del crecimiento micelial en niveles de pH	89
5.2.3. Prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de temperaturas	92
VI. CONCLUSIONES	96
VII. RECOMENDACIONES.....	97
VIII. ABSTRACT	98
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXOS	106

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Componentes en estudio.....	51
2. Tratamientos del experimento.	52
3. Modelo del Análisis de Variancia.....	53
4. Prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) de los promedios de los tratamientos.....	54
5. Ensayo del crecimiento micelial en diferentes niveles de pH.....	58
6. Ensayo del crecimiento micelial en diferentes temperaturas.....	60
7. Postulado de Koch de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> mediante cuatro métodos de inoculación en plantas de Anturio.	64
8. Análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> , en diferentes medios de cultivo.....	67
9. Prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> , en diferentes medios de cultivo.....	69
10. Radios de crecimiento micelial de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> en 10 medios de cultivos en 10 días de evaluación.	71
11. Análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> , en diferentes niveles de pH en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA).....	73

12. Prueba de Tuckey para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes niveles de pH en Agar Espata de Anturio..... 74
13. Radios de crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* en diferentes niveles de pH en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA) en ocho días de evaluación..... 76
14. Análisis de varianza para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes temperaturas de incubación en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA). 78
15. Prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes medios de cultivo..... 79
16. Radios de crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* en tres niveles de temperatura en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA) en nueve días de evaluación..... 81
17. Promedio del crecimiento micelial de *P. guepinii* en diez medios de cultivo, en 10 días de evaluación. 121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Efecto del medio de cultivo para el crecimiento micelial in vitro de <i>Pestalotia</i> sp.	35
2. Crecimiento de <i>Pestalotia</i> sp. En diferentes medios de cultivo a los cinco días de establecido el experimento.	36
3. Inhibición del crecimiento micelial del hongo <i>Pestalotia</i> sp., utilizando mezcla de extracto acuoso de hojas de merey con chaparro al 1%.	36
4. Fase de campo a) Observación y reconocimiento de la mancha foliar en hojas de anturio, b) Síntoma de la mancha foliar necrótica en hojas, c) Síntoma de la mancha foliar necrótica en espata y d) Colecta de la muestra, utilizando bolsa de polipropileno y tijera.	38
5. Tejido vegetal secando sobre papel toalla estéril.	40
6. Siembra del tejido foliar de anturio con síntomas de mancha foliar necrótica en medio PDA.	40
7. Cámara húmeda a) Materiales, b) Desinfección y enjuague en agua destilada estéril de las hojas de anturio, c) Muestras siendo secadas dentro de la cámara de flujo laminar con el apoyo del papel toalla y d) Proporcionando agua destilada estéril a la cámara húmeda.	42

8. Identificación del agente causal, a) Observación de la estructura del hongo (40x) mediante montajes en lactofenol de azul de metileno b) Clave dicotómica del libro de Barnett & Hunter (1999)..... 44

9. Conservación del patógeno: a) Cultivo puro del hongo, desarrollado en medio de cultivo PDA y b) Crecimiento en medio de cultivo PDA contenido dentro de tubos de ensayo. 45

10. Prueba de patogenicidad (postulado de Koch: a) Inoculación debajo de la epidermis (T₁), b) Inoculación sobre la epidermis (T₂) de rodajas del medio PDA con el hongo puro, c) Haciendo heridas con el abrasivo carburaron, d) inoculación del patógeno mediante la aspersion de una concentración de 1.0x10⁷ conidias/ml del hongo (T₃), e) Inoculación de rodajas de PDA de 0.5 cm de diámetro sobre las heridas (T₄) provocadas por abrasivo, y f) Aplicación de 200 ml por cada planta de la suspensión del hongo..... 47

11. Ensayo de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivos a) Placa Petri con líneas horizontales y verticales, hechas con plumón indeleble, b) Plaqueo de los medios de cultivo, c) Patógeno desarrollado en el medio Agar Espata de anturio T (PEaA), d y e) Forma de medir el radio de crecimiento del hongo en los medios de cultivo y d) Registro del crecimiento micelial en el formato..... 49

12. Método de medición de las colonias fungosas en placas Petri con PDA.	50
13. Ensayo de crecimiento micelial en diferentes pH a) Calibración del pH, b) Plaqueo de los medios de cultivo, c) Obtención de rodajas de PDA con el cultivo puro del hongo y d) Tratamientos listo para su observación y evaluación en los días siguientes.	57
14. Conidias de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> (Desm.) Steyaert a) dos conidias con cinco células dentro de la conidia, b) cuatro conidias con sus apéndices y c) conidia del hongo donde se observa claramente los apéndices y cinco células dentro de la conidia.	62
15. Incidencia de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> en la prueba de patogenicidad, a) Presencia de mancha necrótica mediante la inoculación de rodajas de PDA con el patógeno debajo de la epidermis (T ₁), y b) Presencia de manchas foliares necróticas mediante la inoculación de rodajas de PDA con el patógeno sobre heridas mecánicas del tejido vegetal provocadas con el abrasivo carborudum (T ₁).	65
16. Síntoma necrótico de las hojas de <i>Anthurium andraeanum</i> L. “anturio” con presencia mancha necróticas en las hojas de color marrón negruzco con bordes de color amarillo.	66
17. Crecimiento micelial de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> en 10 medios de cultivos.	68

18. Ritmo promedio de crecimiento in vitro de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> a los 10 días evaluación, cultivado en diferentes medios de cultivo.	69
19. Ecuación lineal del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos en diferentes medios de cultivo en 10 días de evaluación.	72
20. Ritmo promedio de crecimiento in vitro de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> a 10 días de evaluación, cultivado en diferentes medios de cultivo.	74
21. Desarrollo micelial de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> cultivado en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA), en diferentes niveles de pH y producción de conidias/ml, a los 8 días de evaluación.....	75
22. Ecuación lineal del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos en diferentes niveles de pH en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA) en ocho días de evaluación.	77
23. Ritmo promedio de crecimiento in vitro de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> a los 10 días de evaluación, cultivado en diferentes medios.	79
24. Desarrollo micelial de <i>Pestalotiopsis guepinii</i> cultivado en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA), en tres niveles de temperatura y producción de conidias/ml, a los 09 días de evaluación.	80
25. Ecuación lineal del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos en estudio (medios caseros).....	82

RESUMEN

En los últimos años en la zona de Tingo María el cultivo de *Anthurium* spp. “anturio”, ha venido tomando cada vez mayor importancia en la comercialización de sus flores, y uno de los problemas es la presencia de enfermedades causadas por hongos. El objetivo fue aislar, identificar y evaluar el causante de la mancha foliar en plantas de *Anthurium andraeanum* L. “anturio” en la zona de Tingo María. Las muestras con síntomas de tejido foliar enfermo fueron colectados y trasladados al Laboratorio de Entomopatígeno de la Universidad Nacional Agraria de la Selva para su aislamiento en medio de cultivo y la inducción a la esporulación en cámara húmeda. El hongo fue identificado usando la clave de H. L. Barnett & Barry B. Hunter de 1999 y se confirmó la especie en la Clínica de Plantas de la Universidad Nacional Agraria la Molina. Se realizaron pruebas de patogenicidad, de crecimiento micelial con medios semisintéticos agar papa dextrosa, jugo V8, agar avena quaker, agar harina de maíz, agar extracto de malta, agar zanahoria, agar jugo tomate, agar agua, agar hoja de anturio y agar espata de anturio. Para la prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de pH se utilizó el medio agar espata de anturio (PEaA) a pH 4.18, 4.83, 5.36, 5.38, 5.78, 6.34, 7.08, 7.78 y 8.27. Para la prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de temperaturas se utilizó el medio agar espata de anturio (PEaA), a temperaturas de 10 °C, 26.1°C y 30.2°C. El causante de la mancha foliar de anturio fue *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert, observándose síntomas de los tipos preneocróticos y necróticos, como amarillamiento localizado y manchas necróticas de color marrón negruzco plateado. El medio

agar espata de anturio (PEaA) logró mejores variables cuantitativas, al ser estadísticamente superior a todos los tratamientos (RPC 0.45 cm/día) y una producción de 7.47×10^6 conidias/ml. No se logró diferencias estadísticas significativas en el crecimiento micelial y producción de conidias en los diferentes niveles de pH, con 26.1 °C de temperatura el hongo logra un RPC de 0.56 cm/día, estadísticamente superior a todos los tratamientos, obteniendo la mayor producción de conidias/ml (6.67×10^6); a los 10 °C de temperatura, el hongo no se desarrolla y por lo tanto no se da la producción de conidias.

I. INTRODUCCIÓN

En los últimos años en la ciudad de Tingo María el cultivo de *Anthurium* spp. “anturio”, viene tomando mucha importancia en la comercialización de sus flores, en forma local y nacional, hace más de una década, se ha convertido en una zona de producción, principalmente de flores rosadas, representando esta actividad una de las prometedoras desde el punto de vista económico y turístico. A pesar que en esta zona tropical existen condiciones ecológicas favorables para el desarrollo de la floricultura, la presencia de problemas fitopatológicos es siempre de cuidado en el establecimiento de nuevas áreas.

Se ha detectado muchas enfermedades causadas por hongos que amenazan a esta especie, ocasionando pérdidas económicas especialmente debido a que afectan la calidad de las flores, no solamente por la acción directa, sino también indirectamente, debido al aumento en los costos de producción que conlleva la aplicación de métodos de control y prevención (MURGUIA, 1996).

Actualmente en nuestro país los estudios de identificación de enfermedades foliares ocasionados por hongos en cultivos ornamentales es muy reducida y para la provincia de Leoncio Parado no existen reportes que indiquen las enfermedades que puedan estar ocurriendo en *Anthurium*

andraeanum Linden “anturio”, por ello es preciso identificar el causante de la mancha foliar que presentan en esta especie, para evitar la disminución en la producción económica de esta especie.

Objetivo general

- Aislar, identificar y evaluar el agente causal de la mancha foliar de las plantas de *Anthurium andraeanum* L. “anturio” en los viveros de la zona de Tingo María.

Objetivos específicos

- Aislar, identificar y caracterizar el síntoma del agente causal de la mancha foliar en plantas de *Anthurium andraeanum* L. “anturios”.
- Evaluar el crecimiento del agente causal de la mancha foliar en diferentes medios de cultivos, pH y temperatura.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. *Anthurium andraeanum* Linden 1887, “anturios”

2.1.1. Ubicación taxonómica

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM (2018)

señala que, el *Anthurium andraeanum* “anturio” tiene la siguiente clasificación botánica:

Reino	:	Plantae
Sub-reino	:	Viridiplantae
División	:	Tracheophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Super-orden	:	Lilianaes
Orden	:	Alismatales
Familia	:	Araceae
Género	:	<i>Anthurium</i>
Especie	:	<i>A. andraeanum</i> Linden
Nombre común	:	Anturio

2.1.2. Origen y distribución

Es una planta herbácea perenne originaria de los bosques lluviosos de Colombia, Ecuador y América Central. Lo que comercialmente se conoce como flor es en realidad una hoja modificada llamada espata, al género *Anthurium* pertenecen más de 700 especies, siendo las más conocidas *Anthurium Andreanum* que es utilizada como flor de corte; *A. scherzerianum* como planta para maceta; *A. scadens* como planta trepadora; *A. Acaudale* como planta de interior y *A. crystallinum* como planta para follaje.

De la base de la espata sale el espádice o candela que sostiene las flores verdaderas. En la actualidad Hawái y Holanda son los principales productores de dichas variedades (VAN, 1998).

2.1.3. Importancia del cultivo

Los anturios están considerados como flores de especialidad junto con las orquídeas, las aves del paraíso y las heliconias. Las flores de anturio, con sus variados colores en forma de corazón, tienen demanda en el mercado nacional e internacional por la atractiva vistosidad con que adornan los arreglos; las flores rojas son las de mayor demanda y las más cultivadas, pero las rosadas, blancas y bicolors son también muy apreciadas.

Las hojas cosechadas para la venta son inmediatamente puestas en agua limpia, el valor de las hojas se incrementa cuando estas brillan, este brillo puede resaltarse usando biogen o algún compuesto semejante, las hojas

pueden ser transportadas secas a menos que el empaque ofrezca condiciones que las protejan de la resequedad (VAN, 1998).

2.1.4. Enfermedades reportadas en anturios

2.1.4.1. Afecciones bacteriales

MURGUIA (1996) indica los siguientes géneros bacterianos que causan enfermedades en el cultivo de anturio:

- ***Xanthomonas.***- Usualmente empieza en las hojas y flores, se caracteriza por pequeñas manchas acuosas que luego se convierten en grandes manchas de color café en el centro y bordes amarillentos. La afección se disemina rápidamente y puede cubrir gran parte de la hoja, la planta afectada muere completamente. Si no es necesario no se debe regar la planta, se puede controlar su expansión removiendo las plantas infectadas en bolsas de plástico. No use nitrógeno en forma de amonio y mantener la planta con poca agua hasta que ésta se endurezca. Se necesita higiene extrema. Use diferentes cuchillos para cosecha y para cortar las hojas en cada cama de plantas, luego desinfectelos con cloro o alcohol. No se ha encontrado una cura química efectiva para controlar la afección.

- ***Erwinia.***- Esta afección se encuentra principalmente en plantas jóvenes y se caracteriza por la coloración amarilla de la hoja, se presenta usualmente en hojas viejas, la coloración amarilla empieza en el tronco y se mueve hacia la cabeza de la hoja.

2.1.4.2. Enfermedades fungosas

- ***Pestalotia* sp.**- Este hongo presenta inicialmente una sintomatología de manchas negras pequeñas y circulares rodeadas por un borde o halo amarillo y está situado en el envés de los folíolos de las hojas que a medida que avanza la infección del hongo, las lesiones pueden confluir en demarcar áreas grandes de tejido necrótico de coloración grisácea con bordes negros bien marcados. En la zona central de las lesiones se observan los conidióforos en forma de acérvulos (Gálvez *et al.*, 2011; citado por PAÉZ y RODRÍGUEZ, 2014).

Además, PROEXANT (1996), menciona las siguientes enfermedades fungosas en el cultivo de anturio:

- ***Pythium, Phytophthora* “Pudrición de la raíz”**.- Este es un hongo secundario, la pudrición puede ocurrir cuando las circunstancias en que se desarrolla la raíz no son las mejores, por ejemplo substrato demasiado húmedo o de niveles de humedad muy variables o por frío. Las raíces dañadas son una puerta de entrada para *Pythium*. Las hojas se ponen amarillas en los filos y se vuelven quebradizas, las raíces se tornan de color café pálido. La parte exterior de la hoja se deteriora rápidamente mientras que el corazón está intacto. Las raíces pueden también ser atacadas por *Phytophthora* spp.

- ***Cylindrocarpon destructans***.- La hoja se seca, muestra coloración amarilla y se marchita. La base de la planta se torna café y en muchos casos se contrae un poco. *Cylindrocarpon destructans* puede entrar

por la base de la planta a través de raíces heridas. La planta debe ser rociada con herbicida.

- ***Cylindrocladium spp.*** .- Este hongo daña las raíces hasta la base de la planta, en la base hundida del tronco se observan manchas que van de café oscuro a negro, las plantas deben ser humedecidas.

- ***Fusarium spp.*** .- Este hongo se presenta con la pudrición de la base de la planta, cuando éstas han sido sembradas bajo condiciones desfavorables, *Fusarium* puede estar latente en los atados vasculares y aparecer nuevamente en estado de madurez.

- ***Rhizoctonia.***- Las plantas afectadas presentan una contracción en la base y especialmente la raíz presenta una coloración café o negra. La afección ocurre al borde del sustrato y el aire, las plantas deben ser rociadas con herbicidas.

- ***Seiparia anthurii*** “enfermedad de mancha de la hoja”.- En la hoja se forma una mancha de color café inerte, rodeado por un anillo de tejido amarillento.

- ***Colletotrichum gloeosporioides.***- Se encuentra en la naturaleza en su estado asexual (o fase conidial), produce unas estructuras en forma de disco, con un diámetro de 300 micras, en forma subepidermal en la lesión llamados acérvulos; estos cuerpos presentan varias espinas o setas con cuatro a nueve micras de diámetro y menos de 100 micras de longitud, los cuales están

ubicados al borde o entre la masa de conidióforos simples y alargados; las conidias son hialinas, unicelulares y de forma ovoide; estas conidias tienen una vacuola cerca del centro y miden 2.5 a 5.5 por 11 a 20 micras. Bajo ciertas condiciones ambientales las setas pueden no presentarse; si se presentan, esta característica puede servir para diferenciarlo de otro género bastante similar, conocido como *Gloeosporium*.

2.2. *Pestalotia* sp. y *Pestalotiopsis* sp.

En la publicación de MAHARACHCHIKUMBURA *et al.* (2011) titulada “La Pestalotiopsis: morfología, filogenia, bioquímica y diversidad”, sobre la historia del género *Pestalotiopsis* sp., menciona lo siguiente: DE NOTARIS (1839) presentó el género *Pestalotia* De Not. basado en el tipo genérico de *Pestalotia pezizoides* De Not. con ocurrencia en las hojas de *Vitis vinifera* en Italia. Esta especie se caracteriza profundamente por seis células en la conidia con cuatro células centrales profundamente oliváceo, el distosepta, las células terminales hialinas y simples o ramificadas los apéndices que se levantan del ápice. STEYAERT (1949) revisó *Pestalotia* y dividido el género en tres grupos principales basados en la forma de la conidia.

STEYAERT (1949) también introdujo dos nuevos géneros, *Truncatella* Steyaert para cuatro células en la conidia formadas y *Pestalotiopsis* Steyaert para las cinco células en la conidia formadas, mientras las seis células lo formaban las células que permanecían en *Pestalotia*. Se consideraba que *Pestalotia* era un género del monofiletico y STEYAERT (1949) sugirió que las especies del tipo pudieran distinguirse de *Pestalotiopsis* por él conidiomas del

cupular y distoseptate las células del medio. STEYAERT (1949) más allá *Pestalotiopsis* dividido en secciones adicionales basadas en el número de accesorios del apical. Éstos eran los Monosetulatae, Bistulatae, Trisetulatae y Multisetulatae que eran más allá dividido en las subdivisiones. Conidia con un solo setulae (el accesorio del apical) era incluida en el Monosetulatae que era más allá dividido en los formularios con simple y echó ramas el setulae. Conidia con dos setulae o por término medio dos setulae eran incluidos en el Bistulatae. Conidia con tres setulae o por término medio tres setulae eran incluido en el Trisetulatae que era más allá dividido por concolorous o conidia del versicolorous fusiforme o conidia del claviform y espatulado o setulae del nonspatulate. Conidia con más de tres los setulae eran incluidos en el Multisetulatae.

De la misma manera, STEYAERT (1949) resumió *Monochaetia* (Sacc.) Allesch. de su estado genérico y la especie puesta con el solo setula en la sección Monosetulatae de *Pestalotiopsis* y *Truncatella*.

STEYAERT (1949) con tal de que las descripciones de 46 especies y *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert se consideraba que era la especie del tipo del género recientemente introducido. *Pestalotiopsis guepinii* se caracterizó por 4-euseptate y los conidia fusiformes con un hyaline la célula basal. La introducción de Steyaert del género *Pestalotiopsis* no se apoyó por MOREAU (1949), SERVAZZI (1953) y GUBA (1956, 1961). STEYAERT (1953a, 1953b, 1961, 1963), sin embargo, evidencia extensa publicada en el apoyo de su nuevo género con las respuestas a las críticas hechas por otros.

BARRON (1968) en su libro “The Genera of Hyphomycetes from soil” menciona esta controversia donde indica que: Existe alguna controversia con respecto a la sistemática de *Pestalotia*. STEYAERT (1949) reservado el nombre *Pestalotia* para las especies de *P. pezizoides* (las especies del tipo). Él incluyó el resto de las especies involucrado en dos géneros *Trucantella* y *Pestalotiopsis*. *Trucantella* incluyó las especies con cuatro células las esporas con un episporas hialinas sobres las dos células coloreadas. *Pestalotiopsis* incluyó las especies con cinco células en la conidia. Cada uno de los géneros se subdividió más allá en base al número de setulae en Monosetulatae, Bisetulatae, Trisetulatae y Multisetulatae. BARRON (1968) señala que para los detalles llenos de la controversia que rodea este grupo de hongo se debe revisar los trabajos de GUBA (1956) y STEYAERT (1949, 1955, 1956).

Además, BARRON (1968), indicaba que no podía dar una opinión autoritaria en esta situación, pero ha seguido Guba como una materia de conveniencia, en que un manual comprensivo para la identificación se ha presentado en su monografía. Los estudios de desarrollo en *Pestalotiopsis* y el género relacionado que muestran el método preciso de origen del conidia han sido presentados por SUTTON (1961, 1963).

2.2.1. *Pestalotia* sp.

2.2.1.1. Taxonomía

De acuerdo con la base de datos MYCOBANK (2018) este hongo se clasifica de la siguiente manera:

Reino	:	Fungi
División	:	Ascomycota
Sub-división	:	Pezizomycotina
Clase	:	Sordariomycetes
Sub-clase	:	Xylariomyceti
Orden	:	Xylariales
Familia	:	Amphisphaeriaceae
Género	:	<i>Pestalotia</i>

2.2.1.2. Morfología y estructura

Según PAÉZ y RODRÍGUEZ (2014), *Pestalotia* sp. aislado de plantas de anturio, en los medios de cultivos se observó un crecimiento algodonoso bastante agresivo, de color salmón con anillos concéntricos de color amarillo, pequeños puntos negros (cirros) dispersos; en el microscopio óptico se pudo constatar la presencia de *Pestalotia* sp. en los medio de crecimiento asociándose a las manchas anteriormente mencionadas; donde se encontraban concentradas las conidias con tres a cuatro septos transversales, con las células de la parte media coloreadas; la célula basal del conidio es truncada y hialina, con un apéndice puntiagudo, simple. Así mismo; la célula apical es aproximadamente cónica, también hialina, con dos o más (generalmente 3) apéndices apicales simples. Los conidios midieron un promedio de $27.15 \pm 3.19 \mu\text{m}$ de largo y $6.23 \pm 1.36 \mu\text{m}$ de ancho.

OCHOA (2005) referente a la presencia de *Pestalotia* causando manchas foliares en camu camu, menciona que el desarrollo de la colonia fungosa en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) constituye un color blanco cremoso, aspecto algodonoso, en el centro del crecimiento micelial forma círculos de color marrón claro. El hongo llena por completo la placa Petri en un tiempo promedio de siete días. Sobre el crecimiento fungoso y dentro de este presenta puntos de color negro brillante y de consistencia dura que aparecen cuando el hongo es expuesto a la luz que corresponde a grupos de conidias del hongo. Los cuales al ser observado a través del microscopio se muestra alargados y multiseptados, de tres a cinco células con apéndices hialinos a los extremos.

Según BARNETT y HUNTER (1998), el género *Pestalotia* presenta acervulo oscuro, subepidermal; conidioforos cortos, simple; conidias oscuras, ovoide compuesta por tres o más celdas con pigmentos oscuros, pero el centro de las células es claro, con extremos puntiagudos con bigotes o apéndices al final de las células, parásitos o saprofitos.

Brige *et al.* (1990), citados por SÁNCHEZ (2008) mencionan que *Pestalotia* sp. se caracteriza, al igual que todos los que forman este orden, por la producción de conidios en cuerpos fructíferos llamados acérvulos de color negro, discoides o pulvinados, subepidérmicos; conidióforos cortos y simples. Los conidios son alargados y multiseptados, presentan cinco células y las de ambos extremos son hialinas en tanto que las del centro son de color oscuro, el conidio presenta dos a tres apéndices en uno de los extremos y también son hialinos.

Sánchez (2008), citado por ROMERO (2009) señala que, estos hongos penetran principalmente a través de heridas, varias especies de este hongo son causantes de manchas foliares o lesiones cancrosas en frutos de plantas tropicales.

2.2.1.3. Cultivos que afecta

En Venezuela, PAÉZ y RODRÍGUEZ (2014) realizaron el diagnóstico de enfermedades fúngicas en cultivos de *Anthurium* spp, en el municipio Antonio Pinto Salinas, de plantas enfermas se lograron identificar los hongos de los géneros *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp., *Alternaria* sp., *Curvularia* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. Por lo observado a nivel de campo se pudo determinar que la mayor sintomatología en las plantas analizadas es causada por los géneros *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. y *Phoma* sp.

En Argentina, SOSA *et al.* (2003) mencionan que *Pestalotia* sp. causa lesiones necróticas en plantas de jazmín del cabo (*Gardenia augusta*); los síntomas se caracterizan por manchas foliares de centro castaño claro, rodeado por áreas concéntricas de color castaño oscuro donde se observan acérvulo. La enfermedad produce decaimiento de la planta, notable reducción de las hojas, escasa y baja calidad de la floración.

En Argentina, GONZÁLES *et al.* (2002), reportan que encontraron en *Cipres lambertiana* que *Pestalotia* sp. es el agente causal del tizón, observándose muerte de acículas y ramas jóvenes que quedan adheridas al tallo

tomando una coloración pardo grisáceo, a veces con presencia de inflorescencias de color negro producidas por los fructificaciones del hongo.

Esquivel (2004), citado por SÁNCHEZ (2008) señala que, se encontró *Pestalotia* sp. en hojas de guayaba con manchas café – plateadas. Además, ÁLVARES *et al.* (1998), mencionan a *Pestalotia guepinii*, provocando manchas foliares en hortensias (*Hydrangea* sp.)

Romero (1993), citado por SÁNCHEZ (2008) menciona a *Pestalotia palmarum*, que, en plantaciones jóvenes de palmas de coco, los síntomas de esta enfermedad inician con unas manchas transparentes y claras sobre las hojas, que más tarde cambian a verde amarillento, el tejido se seca y las hojas se desprenden.

Además, Brige *et al.* (1990), citado por SÁNCHEZ (2008), mencionan que *Pestalotia guepini*, provoca manchas amarillas a pardas sobre las hojas camelia y rododendro, estas manchas tienen un desarrollo en círculos concéntricos. Y Campos *et al.* (2005), citados por SÁNCHEZ (2008), mencionan que en trabajos de investigación en “ave de paraíso” encontraron al género *Pestalotia* sp. causante del tizón foliar y follaje, en un 20% de los casos.

2.2.2. *Pestalotiopsis* sp.

2.2.2.1. Taxonomía

De acuerdo con la base de datos MYCOBANK (2018) este hongo se clasifica de la siguiente manera:

Reino	:	Fungi
División	:	Ascomycota
Sub-división	:	Pezizomycotina
Clase	:	Sordariomycetes
Sub-clase	:	Xylariomyceti
Orden	:	Xylariales
Familia	:	Amphisphaeriaceae
Género	:	<i>Pestalotiopsis</i>

2.2.2.2. Morfología y estructura

La morfología de las conidias es una característica taxonómica ampliamente usada para el género *Pestalotiopsis*. La mayoría de las especies son divididas en grupos diferentes basados en el tamaño del conidia. La longitud y anchura son buenos marcadores del taxonómicos para el género y estable dentro de los medios de información diferentes y las generaciones en la mayoría de los casos (Hu *et al.*, 2007; citados por MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2011). El Color de las células del medio todavía es una característica ampliamente usada, y todas las especies separan en tres grupos basados en esto, el con colores oliváceo oscuro a diversos colores y oliváceo fulgurante a diversos colores. La evidencia molecular indica que es más preciso agruparse las especies según el color y diversos colores en lugar de los tres grupos anteriores (Jeewon *et al.*, 2003; citados por MAHARACHCHIKUMBURA *et al.*, 2011). También se usa ampliamente la longitud del apéndice apical y el número

de los apéndices apicales son ampliamente características para la identificación de las especies. Algunas especies también pueden identificarse por la presencia de bultos en los apéndices apical. Los apéndices apicales pueden levantarse de la cima, medio, fondo o posiciones diferentes en las células de apical hialina y tales características se usan ampliamente en la identificación de las especies. Además, los apéndices del apical pueden ser divididos en las ramas; en algunas especies de este género presentan o se ausenta los apéndices basales otra característica para el diagnóstico de la especie.

2.2.2.3. Cultivos que afecta

Trabajos realizados por KRUSCHEWSKY *et al.* (2014) realizaron una revisión de los manuscritos acerca de *Pestalotiopsis* reportados frecuentemente muchos estados de Brasil como un género cosmopolita; donde en las publicaciones nacionales e internacionales tratan con este género ampliamente en la literatura. Hasta marzo del 2013 se registró 211 especies de *Pestalotiopsis* en asociación con 53 plantas hospederas, pero sólo 69 taxa fueron designados por sus epítetos específicos. *Pestalotiopsis versicolor* fue una de las especies mayormente citada en los trabajos científicos. Dentro del material reportado se encontró a *Pestalotiopsis guepinii* como hospedero de *Anthurium andraeanum*, *Cocos nucifera* y *Lycopersicon esculentum* en el noreste; *Anacardium occidentale* en el centro oeste; *Camellia japónica* en el sudeste; *Eugenia jambolana* y *Spondias mombin* en el estado de federación, de Brasil.

En Argentina, FERNÁNDEZ *et al.* (2015) señalan que aproximadamente 60% de arándano (*Vaccinium corymbosum*) se localizan plantaciones en Argentina en las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires. Se han informado *Alternaria tenuissima* y *Pestalotiopsis guepinii* como patógenos de arándano. Ambos hongos estaban presentes en el arándano presenta de 2010 a 2013. El *Alternaria tenuissima* es el patógeno con mayor prevaleciente, como la mayoría de los síntomas descubierto en los campos se había causado por esta especie. Como resultado de las inoculaciones en el cultivar O'Neal, los tejidos de la herida mostraron los síntomas antes de lesiones. Síntomas de la hoja causados por *A. tenuissima* difiereo de aquéllos causados por el *P. guepinii* debido a su color rojizo predominante y la ausencia de gota-fuera de la parte central de las lesiones. Las hojas mostraron las manchas castañas al plato rojo típico de *A. tenuissima* y manchas de castaño de oscuridad típico de *P. guepinii.*, ambos con los márgenes rojos. La quemadura, defoliación y síntomas de la úlcera maligna causados en cada caso eran los indiscernibles.

En Brasil en la sabana estado de Ceará, OLIVEIRA y TEIXEIRA (2012), reportan a *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Stey en plantas de *Anacardium occidentale* en la localidad de Pacajus, Potiretama. Para Francia, MAHARACHCHIKUMBURA *et al.* (2011), reportan a *P. guepinii* sobre tallo y hojas de *Camellia japonica*. En Turquía, el diagnóstico realizado por ERPER y CELIK (2011) reportan al cultivo de arandano (*Vaccinium corymbosum*) como hospedero de *Pestalotiopsis guepinii*, en la zona de Blacksea, cultivo introducido en el 2003. Así mismo KARACA y ERPER (2001) hicieron el primer reporte de

Pestalotiopsis guepinii causando la quemadura de la ramita en la avellana y pavo de la nuez. Además, en Australia, AGRICULTURE, FISHERIES AND FORESTRY (2001) reportan la presencia de *Pestalotiopsis guepinii* (Kleb.) Sutton (*Pestlotia guepinii*), gracias al trabajo de Bailey (1892).

En Argentina, ROMERO *et al.* (2009) reportan a *Pestalotiopsis maculans* (Sin. *P. guepinii*) causando mancha foliar en *Arbustus unedo*, *Ceratonia siliquae* *Ilex aquifolium*. Esta enfermedad se encuentra distribuida en viveros forestales andaluces donde se producen plantones de madroño y algarrobo.

En Argentina, CÚNDOM *et al.* (2008) en *Codiaeum variegatum* (L.) Blume, Euforbiaceae, llamada comúnmente croto, es una planta ornamental, de follaje variegado muy atractivo, de fácil propagación y utilizada tanto para interiores como exteriores, sobre esta se realizaron observaciones de hojas enfermas a simple vista y con microscopio estereoscópico y confección de cámaras húmedas; posteriormente el material enfermo se sembró en agar papa glucosado (APG), 1.5%, pH 6. Se estudiaron las características morfométricas y culturales del microorganismo aislado. Las pruebas de patogenicidad se realizaron inoculando discos del hongo aislado desarrollado en APG, sobre plantas sanas de croto, criadas en macetas. Se llevaron los testigos correspondientes, depositando trocitos de APG estéril. Concluyeron que el hongo causal de las manchas foliares que afectan a *C. variegatum* fue identificado como *P. guepinii*, siendo la primera información de la enfermedad en Corrientes, Argentina.

WATANABE *et al.* (1998) reportan desarrollo del conidiomatal de *Pestalotiopsis guepinii* y *P. neglecta* sobre hojas de *Gardenia jaminoides*.

2.3. Aislamiento de hongos

2.3.1. Factores relacionados al aislamiento

TUITE (1969) menciona que, existen cinco factores relacionados durante el proceso de aislamiento de los cuales dependerá del éxito del aislamiento y estos son:

- **Condiciones del material enfermo:** Pueden presentar síntomas primarios o secundarios.
- **Tipo de desinfectante:** Se lavan las muestras primero con agua caliente, luego con agua estéril, desinfección con hipoclorito de sodio al 1%, 5% o 10% dependiendo la muestra y es importante el tiempo de exposición al hipoclorito de sodio. También se puede usar cloruro de mercurio (HgCl_2 es tóxico) cuando la muestra está muy deteriorada.
- **Temperatura de incubación:** En el aislamiento generalmente se utiliza la temperatura de incubación entre 20 a 25 °C, pero es recomendable usar la temperatura de incubación teniendo en consideración la misma temperatura de la zona donde proviene la muestra.
- **Medios de cultivo:** Se puede utilizar diversos medios como los semisintéticos, sintéticos, selectivos u otros.

- **Técnica de aislamiento:** Se puede aplicar diferentes técnicas como aislamiento por dilución en bacterias u hongos aislamiento directo en caso de hongos, etc.

2.3.2. Técnicas de aislamiento

TUITE (1969) señala que, las técnicas más usadas para el aislamiento de hongos fitopatógenos son:

- **Inducción a la esporulación:** Mediante el uso de la cámara húmeda, para propiciar la formación de conidias, esporangio, de esta manera desarrolla fácilmente el patógeno en medio de cultivo. Usado más en fitopatógenos de manchas como *Alternaria* spp., *Pericularia* spp., *Cercospora* spp., *Lasiopodia*, etc.

- **Inducir el crecimiento micelial:** Se utilizan medios semisintéticos o sintéticos como Ko & Hora para aislar *Rizoctonia solani*, Nabs-Snyder para aislar *Fusarium* spp. Usado para infecciones profundas como en troncos o frutos y para aquellos hongos que tienen pobre esporulación.

- **Aislamiento por inoculación al hospedante:** Usados para parásitos obligados, debido a que crecen en medio de cultivo.

- **Aislamiento por trampeo:** Generalmente para organismos que crecen en el suelo. Ejemplo: el uso de tallos de frijol para el aislamiento de *Rizoctonia solani*.

- **Aislamiento por dilución:** Mediante diluciones seriadas y su posterior siembra en medios de cultivos.

- **Aislamiento directo:** Usado para organismos que se encuentran formando colonias puras (signo) en el tejido enfermo.

2.3.3. Preparativos para el aislamiento

AGRIOS (2002) indica que, siempre que desee aislar una bacteria o un hongo patógeno de los tejidos de una planta enferma, deben llevarse a cabo los siguientes procedimientos preliminares.

- **Esterilización del material de cristalería:** Que incluye cajas petri, tubos de ensayo, pipetas, etc. Mediante calor seco (de 150 a 160 °C durante una hora o más) o autoclave, o bien sumergiéndose material durante un minuto o más en una solución de ácido sulfúrico, bicromato de potasio, en cloruro mercurio 1.1000, en formalina al 5% o en alcohol etílico al 95%. Todo material de cristalería que se trate químicamente debe enjuagarse por lo menos tres veces en agua estéril (esterilizada en autoclave o mediante ebullición).

- **Preparación de soluciones para tratar la superficie del tejido infectado o infestado:** Con el fin de eliminar o reducir notablemente las contaminaciones de superficie que pudieran interferir con el aislamiento del patógeno. Estas soluciones se utilizan con mayor frecuencia incluyendo una solución de hipoclorito de sodio al 5.25% (una parte de clorox y nueve partes

de agua) la cual se utiliza para limpiar tejidos infectados o para sumergir durante tres segundos o más, cloruro mercúrico en la proporción 1:1000 durante un periodo de 15 a 45 segundos, finalmente cloruro mercúrico en la proporción de 1:1000 en alcohol etílico al 50% (solución rada). Los tejidos deben secarse en trozo de papel estéril cuando sean tratados con las dos primeras soluciones pero deben pasarse por tres cambios de agua estéril cuando sean tratados con las dos últimas soluciones.

- **Preparación de medios del cultivo en los que se desarrollan los hongos y bacterias patógenos:** Puede utilizarse un número casi infinito de medios de cultivo para cultivar a las bacterias y hongos fitopatógenos. Algunos de ellos son totalmente sintéticos, hechos a bases de cantidades conocidas de ciertos compuestos químicos y por lo común son bastantes específicos para ciertos patógenos. Algunos de ellos son líquidos o semilíquidos y se utilizan principalmente para el cultivo de bacterias y hongos en ciertos casos. La mayoría de los medios de cultivo contienen un extracto de una fuente natural de carbohidratos y otros nutrientes, tal como papa, harina de maíz, frijol, lima, o habas, extracto de malta, a los que se añaden cantidades variables de Agar para solidificar el medio y formar un gel en el que el patógeno que se desarrolla podría ser observado. Los medios de cultivo que con mayor frecuencia se utilizan son el Agar Papa Dextrosa (PDA), el cual es bueno para la mayoría de hongos (pero no todos), el Agar glucosa (AG) (de 1 a 3% de glucosa en Agar Agua), que se utiliza para separar algunos hongos (*Pythium* y *Fusarium*). En cultivo los hongos también pueden separarse de bacterias si se añade de una o dos gotas de una solución de ácido láctico al

25% la cual inhibe el crecimiento de la bacteria) en 10 ml del medio de cultivo antes de verter en las cajas de petri. Las soluciones con medios de cultivo se preparan en matraces que posteriormente se tapan, se colocan en una autoclave a 120 °C y a 15 lb de presión durante 20 minutos. Los medios de cultivo esterilizados se dejan enfriar durante un cierto tiempo y posteriormente se vierten en cajas de petri, tubos de ensayo u otros recipientes apropiadas previamente estériles. En caso de que al medio se le añada Agar deberá dejarse que este último se solidifique para que el medio de cultivo pueda ser utilizado para cultivar hongos o bacterias. El vaciado del medio de cultivo en cajas petri, tubos de ensayo, debe llevarse a cabo lo más asépticamente posible, ya sea en una sala de cultivo aparte o en una pieza limpia y libre de corrientes de aire y polvo. En cualquiera de los casos, la mesa de trabajo debe limpiarse con una solución de clorox al 10%, las manos de las personas deben estar limpias y el material de laboratorio, tal como escalpelos, pinzas o agujas deben sumergirse en alcohol y flamearse para impedir la introducción de microorganismos contaminantes.

Además, FRENCH y HEBERT (1982), menciona lo siguiente:

- **La autoclave como equipo de esterilización de materiales de vidrio y medios de cultivo:** Las autoclaves horizontales grandes constan de un cilindro horizontal de pared simple o doble, con una compuerta de cierre hermético que tolera presiones de vapor de agua de por lo menos 30 lb/pulg². Su efectividad se basa en el hecho de que, a mayor presión, mayor es la temperatura de ebullición del agua. Tienen una caldera propia o conexión a

vapor de agua de una central. Cuando la presión aumenta a dos atmósferas (15 lb) la temperatura llega a 121.6 °C; no hay organismo que tolere esta temperatura por 15 minutos. El tiempo es el factor que permite que el calor penetre y se absorba. Este método es excelente para esterilizar medios en frascos, pero si el volumen es mayor de un litro, deberá aumentarse el tiempo de operación.

- **Recomendaciones previas antes del esterilizar:** Si se esterilizan placas en autoclave, es conveniente envolverlas de tres en tres, en papel periódico, para que no se contaminen después y para facilitar su manipulación. Tanto en este caso como cuando se trata de pipetas dentro de cilindros, deberán esterilizarse por unos 40 minutos. Los medios en botellones no deben ocupar más de tres cuartas partes, para permitir una ligera ebullición sin derramarse. Las tapas de rosca de botellones medicinales deben ir ligeramente sueltas. Si se usan frascos Erlenmeyer se deben taponar con algodón, para permitir la entrada del vapor. Se recomienda cubrir el algodón con una bolsita de papel invertida para evitar que se humedezca excesivamente. Los medios entubados deben colocarse en canastillas de malla metálica, con los tubos algo separados para que el calor penetre uniformemente. Se debe dejar espacio adecuado entre los artículos que se van a esterilizar para que el vapor tenga libre acceso.

2.3.4. Siembra

Al respecto, FRENCH y HEBERT (1982) menciona cuando el material del cual se desea aislar esté lo suficiente limpio y desinfectado se

corta en trozos de tamaño adecuado para siembra. El hongo está más activo cerca del margen de avance de las lesiones, por lo que se cortan porciones de tejido enfermo de estas zonas. Cuando se trata de hojas, se cortan porciones de 0.5 cm. o menos en cuadrados. En el caso de tallos y raíces delgadas se hacen secciones de 0.5 cm. de largo. De órganos más grandes, se sacan asépticamente trozos internos del sitio más indicado (del sistema vascular en caso de marchites) Y se siembran sin desinfectarlos en un medio bacteriostático.

La desinfección del tejido antes de cortarlo o para la siembra se hace con solución de NaCl 0.5 a 1% (Clorox 10 a 20%), sumergiendo el material unos segundos hasta que esté bien mojado o se deja un minuto (a menos concentración, más tiempo). Para sembrar el material escúrralo y ubíquelo con una pinza sobre el medio escogido. Por lo general se hacen cuatro siembras equidistantes en una placa. El uso de alcohol o llama para desinfectar la pinza no es necesario porque el NaCl, esto es un oxidante fuerte. Si la pinza no se enjuaga porque la luz y el aire descomponen rápidamente NaCl. Este se debe tomar en cuenta y renovarse las soluciones que se usan, quedando en botellas oscuras o a prueba de luz. Algunos fitopatógenos prefieren usar el Hipoclorito de calcio que no se descompone fácilmente y requiere un doble enjuague. El uso de una piseta con agua estéril facilita este proceso.

Es importante escoger bien los medios para siembra cuando no se tienen familiaridad con el material que se quiere aislar conviene utilizar varios medios. Los medios pobres en hidratos de carbono son superiores para la

observación e identificación de hongos. Porque a menudo producen un desarrollo del micelio poco tupido (el cual no interfiere con la observación directa de las placas), limitan la multiplicación de bacterias contaminantes e inducen al hongo a entrar antes a su fase reproductiva o de esporulación. Hasta un medio sin nutrientes pueden ser ventajosos.

2.3.5. Incubación

Casi todos los hongos crecen bien a temperaturas entre 20 - 25 °C y en un gran porcentaje esporula antes o mejor, con luz. Por estas razones es preferible mantener un laboratorio a unos 22 °C e incubar las placas sembradas en ese ambiente con la luz disponible. Es preferible un control ambiental que favorezca también al investigador, en vez de una incubadora con iluminación, lo cual sería más costoso. Las incubadoras tienen la desventaja, que se contaminan con ácaros que interfieren con el trabajo. El almacenamiento de placas para el periodo de incubación se puede hacer sobre una mesa bajo campanas de vidrio o plástico, o sobre estantes de armarios gabinete o anaqueles con compartimentos y puertas de vidrio.

2.3.6. Observación

Conviene observar las placas todos los días porque algunos hongos crecen muy rápido. Todos los trozos inoculados pueden resultar en el crecimiento de un mismo hongo, pero por lo general se aprecia a simple vista por diferencias en coloración, desarrollo, crecimiento aéreo, etc. Que más de un hongo ha crecido a veces de un mismo trozo inoculado, o de distintas

siembras. Muchas inoculaciones pueden resultar negativas. El hongo que predomina es el que merece atención primero, pero no se deben descuidar a los otros excepto que sean contaminantes usuales. Una vez que el hongo haya crecido unos 2 cm de su punto de origen, o estén por hacer contacto los hongos de varias siembras en una misma placa, es momento de trasplantarlos del margen de avance a otras placas. Cuando a simple vista no se distinguen adecuadamente similitudes y diferencias entre las colonias, se pueden observar los hongos por ambos lados de las placas, sin abrirlas, con un microscopio estereoscópico. Con el microscopio compuesto, a bajo aumento, es posible ver a través del fondo las estructuras fungosas en el medio las situadas en la superficie y aun las aéreas. Abriendo las placas después de trasplantar o en un ambiente poco contaminado, se pueden ver muchas características de las estructuras de un hongo, especialmente de las aéreas que no se ven en las preparaciones microscópicas. Estas últimas se requieren para ver el detalle de los órganos del micelio (FRENCH y HERBERT, 1982).

2.4. Medios de cultivo

FRECH y HERBERT (1982) clasifican a los medios de cultivos en:

2.4.1. Según su consistencia

2.4.1.1. Líquido

No se adiciona ningún elemento solidificante. Se utiliza principalmente en el incremento de bacterias, en las determinaciones de sus

propiedades fisiológicas, para el incremento masivo de bacterias y hongos con fines experimentales (generalmente bajo agitación) y para el estudio de crecimiento de microorganismos, como ejemplo se considera al caldo nutritivo (bacterias), caldo papa (hongos), melaza de caña de azúcar (*Trichoderma* spp.), etc.

2.4.1.2. Sólido

Lleva compuestos solidificantes que endurecen el medio de cultivo como el agar gelatina, gelatina inorgánica. El uso principal es para el aislamiento de hongos y bacterias Ejemplo: Agar nutritivo (bacterias), Agar Papa Dextrosa (para cualquier fitopatógeno), Malta Agar (Basidiomycetos) Oat Meal Agar (*Phytophthora palmivora*), etc.

2.4.2. Por sus propiedades nutritivas

2.4.2.1. Carentes de nutrición

- **Agua:** Se utiliza agua desionizada estéril, usado para la conservación de bacterias en el estado latente e inmutable o estado de conservación de *Fusarium* spp. (clamidosporas).
- **Agar agua:** Para el estudio de determinado compuestos y ver el efecto de ciertos compuestos (nutricionales).
- **Nitrógeno líquido:** Mantiene en estado congelado al hongo o bacterias a temperaturas de 190 °C.

2.4.2.2. Medio nutritivo

- **Natural:** Consiste únicamente de material vegetal. Ejemplo: Tejido vegetal aséptico (hojas y pétalos de clavel), tejido vegetal esterilizado (granos de cereales), tejido vegetal macerado (pastas y jugo de papaya).
- **Semisintéticos o complejos:** Contiene sustancias naturales y sintéticas o definidas. Ejemplo: Extracto de carne (Medio Extracto de Carne, Gelatina), extractos vegetales (Medio Caldo Papa, Gelatina), preparados vegetales como los medio: Oat Meal Agar (OMA), Corn Meal Agar (CMA), V-8, Agar Extracto de Malta (MEA), Agar Papa Dextrosa (PDA), etc.
- **Sintéticos o definidos:** Todo su contenido es químicamente definible, aunque generalmente son aceptables algunas impurezas. Ejemplo: Medio Czapecks, Solución Richard, etc.
- **Selectivos o diferenciales:** Se denomina diferenciales a los medios que contienen sustancias (no necesariamente nutritivas) con un papel especial para identificar, seleccionar, o caracterizar microorganismos. Ejemplo: Medio Tetrazolio (TZC) usado para *Pseudomonas* spp., etc.

2.5. Efecto de la nutrición, de la temperatura y del pH en el desarrollo del patógeno

AGRIOS (2002) menciona que, aun cuando todos los patógenos, plantas perennes y, en los climas cálidos, la mayoría de las plantas anuales se

encuentren presentes en el campo durante todo el año, casi todas las enfermedades sólo aparecen (o muestran un mayor grado de desarrollo), durante la época más cálida del año. Asimismo, se sabe que la mayoría de las enfermedades aparecen y muestran un mayor grado de avance durante los días cálido-húmedos o que las plantas que han sido fertilizadas en gran escala con nitrógeno, habitualmente se ven mucho más atacadas por algunos patógenos que las que han sido menos fertilizadas.

Los factores del medio ambiente que afectan mayormente el inicio y desarrollo de las enfermedades infecciosas de las plantas son la temperatura, la humedad, la luz, los nutrientes y el pH del suelo, Sus efectos sobre las enfermedades son el resultado de su influencia sobre el desarrollo y la susceptibilidad del hospedante, sobre la propagación y actividad del patógeno o sobre la interacción entre ambos y de su efecto sobre el desarrollo de los síntomas de la enfermedad.

2.5.1. Efecto de la temperatura

AGRIOS (2002) manifiesta que, las plantas y los patógenos requieren de ciertas temperaturas mínimas para poder desarrollarse y efectuar sus actividades. Las bajas temperaturas que prevalecen durante el invierno, a fin del otoño y a principios de la primavera están por debajo del mínimo requerido por la mayoría de los patógenos. Por lo tanto, es casi seguro que las enfermedades no se produzcan en esas temporadas y que las que ya han logrado un cierto avance se vean interrumpidas. Sin embargo, con la llegada de las temperaturas altas, los patógenos vuelven a la actividad y, cuando otras

condiciones son favorables, tienen la posibilidad de infectar a las plantas y producir enfermedad. Los patógenos difieren entre sí debido a su preferencia por las temperaturas más altas o más bajas y muchas enfermedades se desarrollan mejor en áreas, estaciones o años con temperaturas bajas, mientras que otras se desarrollan mejor donde prevalecen temperaturas relativamente altas. Así algunas especies de hongos *Typhula* y *Fusarium*, que producen el moho nevado de los cereales y céspedes, sólo se desarrollan durante las estaciones moderadamente frías o en las regiones frías. De la misma forma, el hongo del tizón tardío, *Phytophthora infestans*, es más virulento en las latitudes nórdicas, mientras que en los subtrópicos sólo es virulento durante el invierno. Por otra parte, la mayoría de las enfermedades se ven favorecidas por las altas temperaturas y de la misma forma, se ven limitadas a las áreas y estaciones en las que prevalecen tales temperaturas. Dichas enfermedades incluyen los marchitamientos fusariales de las plantas, las pudriciones de la raíz de las plantas ocasionadas por *Phymatotrichum*, la pudrición de los frutos de hueso ocasionada por *Monilinia fructicola* y la marchitez bacteriana sureña de las solanáceas ocasionada por *Pseudomonas solanacearum*, etc.

El efecto de la temperatura sobre el desarrollo de una determinada enfermedad después de haberse producido la infección, depende de la relación particular que se establezca entre el patógeno y su hospedante. El desarrollo más rápido de una enfermedad, o sea, el tiempo más breve que se requiere para que concluya el ciclo de una enfermedad, habitualmente se produce cuando la temperatura es óptima para el desarrollo del patógeno y cuando se encuentra por

arriba o por debajo de ese óptimo para el desarrollo del hospedante. El avance de una enfermedad se ve entorpecido a temperaturas muchos menores o mayores al valor óptimo que permite el desarrollo del patógeno, o bien a temperaturas cercanas al óptimo en el que el hospedante se desarrolla. Así, en el caso de la roya del tallo del trigo, ocasionada por *Puccinia graminis Tritici*, el tiempo requerido para un ciclo de enfermedad (a partir del momento de la inoculación con uredosporas hasta la formación de otras nuevas) es de 22 días a una temperatura de 5 °C, de 15 días a 10 °C y de cinco a seis días a 23 °C. Se requieren períodos similares para que concluya el ciclo de muchas otras enfermedades ocasionadas por hongos, bacterias y nematodos. Dado que la duración de un ciclo determina el número de ciclos de enfermedad y aproximadamente el número de nuevas infecciones en una estación, resulta evidente que reviste gran importancia el efecto de la temperatura sobre la frecuencia de una enfermedad en una estación determinada. En caso de que las temperaturas mínima, óptima y máxima que permiten el desarrollo del patógeno, del hospedante y de la enfermedad sean casi las mismas, el efecto de la temperatura sobre el curso de la enfermedad, se manifiesta al parecer a través de su influencia sobre el patógeno, el cual vuelve a ser activo a la temperatura óptima a la que el hospedante, aún después de haber logrado su óptimo desarrollo, ve imposibilitado de contenerlo.

En muchas enfermedades es probable que la temperatura óptima para el desarrollo de una enfermedad sea distinta a la que permite el desarrollo de un patógeno y de su hospedante. Así en la pudrición negra de la raíz del tabaco, ocasionada por el hongo *Thielaviopsis basicola*, a temperatura óptima para que se produzca esa enfermedad está entre 17 y 23 °C, mientras que para el tabaco se

encuentra entre 28 y 29 °C y para el patógeno fluctúa entre 22 y 28 °C. Es evidente que ni el patógeno ni su hospedante se desarrollan normalmente dentro del rango de 17 a 23 °C, que el hospedante muestra un desarrollo mínimo (y es así mucho más débil) con respecto al patógeno, y que incluso un patógeno debilitado puede ocasionar el máximo desarrollo de una enfermedad. En las pudriciones de la raíz del maíz y del trigo, ocasionadas por el hongo *Gibberella zeae*, el máximo desarrollo de la enfermedad en el trigo se produce a temperaturas arriba del nivel óptimo que permite el desarrollo tanto del patógeno como del trigo pero, en el caso del maíz, sólo se produce a temperaturas abajo del valor óptimo necesario para el desarrollo del patógeno y del maíz. Tomando en cuenta que el trigo muestra un mejor desarrollo a bajas temperaturas y que el maíz crece mejor a altas temperaturas, podría pensarse que los daños más notorios que sufren el trigo a altas temperaturas y el maíz a bajas temperaturas pudieran deberse a un debilitamiento desproporcionado de esas plantas, en relación al debilitamiento del patógeno, cuando las temperaturas son desfavorables.

2.5.2. Efecto del pH del suelo

El pH del suelo también es importante en la aparición y severidad de las enfermedades de las plantas ocasionadas por algunos patógenos que moran en el suelo. Por ejemplo, la hernia de las crucíferas, ocasionada por *Plasniodiophora brassicae*, es más predominante y severa a un pH cercano a 5.7, mientras que su desarrollo decae pronunciadamente entre 5.7 y 6.2 y se inhibe por completo a un pH de 7.8. Por otra parte, la roña común de la papa ocasionada

por *Sirepiomyces scabies*, es severa a un pH que va de 5.2 a 8.0 o más, pero su desarrollo decae notablemente a un pH inferior a 5.2. Por lo tanto, es evidente que dichas enfermedades son más serias en áreas donde el pH del suelo favorece a un determinado patógeno. En estas y en muchas otras enfermedades, la acidez del suelo (pH), al parecer influye principalmente sobre el patógeno, aunque en otras enfermedades, el debilitamiento del hospedante debido a una nutrición desbalanceada inducida por la acidez del suelo, puede afectar la incidencia y severidad de la enfermedad (AGRIOS, 2002).

2.6. Trabajos de crecimiento micelial en medios de cultivo

Los resultados obtenidos por PAÉZ y RODRÍGUEZ (2014) en la dinámica de velocidad de crecimiento de los hongos *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Phoma* sp. y *Trichoderma* sp., se comprobó que estadísticamente existe diferencia significativa entre los medios de cultivos utilizados (Papa Dextrosa Agar) (PDA), Agar Avena (AV) y Agar Zanahoria (AZ) Así mismo las pruebas de patogenicidad realizadas con los patógenos *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp. y *Phoma* sp., resultaron positivas debido a que las plantas inoculadas mostraron los mismos síntomas y signos que presentaba el material vegetal muestreada en campo.

SÁNCHEZ (2008) realizó la siembra de *Pestalotia* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium* sp., *Curvularia* sp., *Alternaria* sp., *Chaetomium* sp., *Mucor* sp., en medios de cultivo PDA encontrados en diferentes especies de hojas de orquídeas. Además, realizó la siembra de *Pestalotia* sp. en los diferentes medios de cultivo, avena - agar, jugo de verdura V8 - agar, harina de maíz - agar,

jugo de tomate - agar, orquídea - agar y PDA, para incrementar el desarrollo de estructuras del patógeno causante de la mancha foliar en orquídeas *Oncidium caven dishianum* Bateman y *Laelia autummalis* Lindl., siendo el medio de tomate - agar mejor para el desarrollo del patógeno *Pestalotia* sp. desde el primer día de establecido, produciendo bastante estructuras reproductivas (Figura 1, 2 y 3).

Los medios de cultivos que se utilizaron como extractos acuosos evaluados fueron neem, cariaquito, eucalipto y la mezcla de chaparro con merey, en la inhibición del crecimiento micelial y esporulación del hongo *Pestalotia* sp., responsable de causar un quemado en los bordes de las hojas de merey, encontrándose mejores resultados con el extracto de neem, con una respuesta óptima de la inhibición de la esporulación (90%) seguido por la mezcla de chaparro con merey, dando como resultado un 80% de inhibición del crecimiento micelial del hongo (CHIRINOS, 2009).

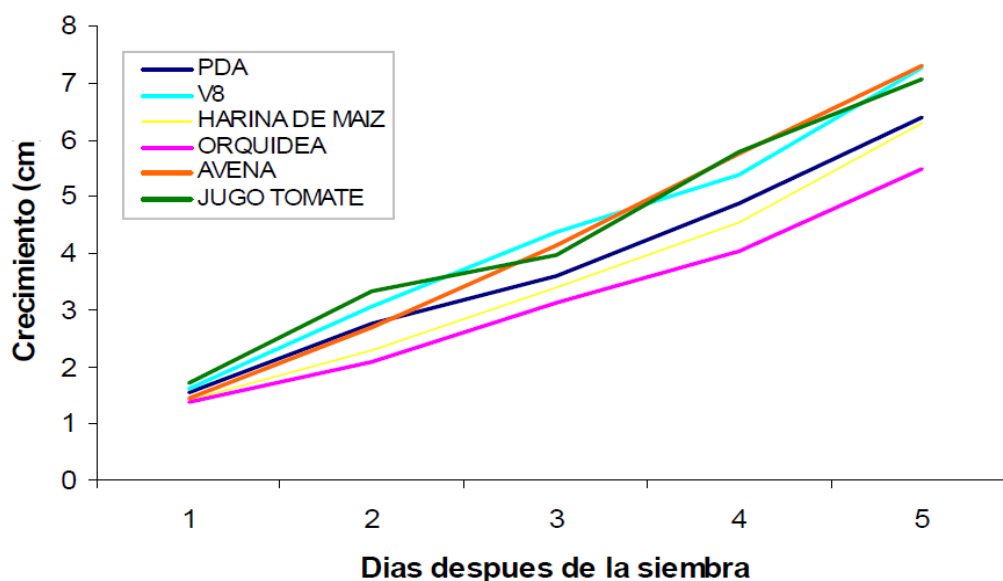


Figura 1. Efecto del medio de cultivo para el crecimiento micelial in vitro de *Pestalotia* sp.

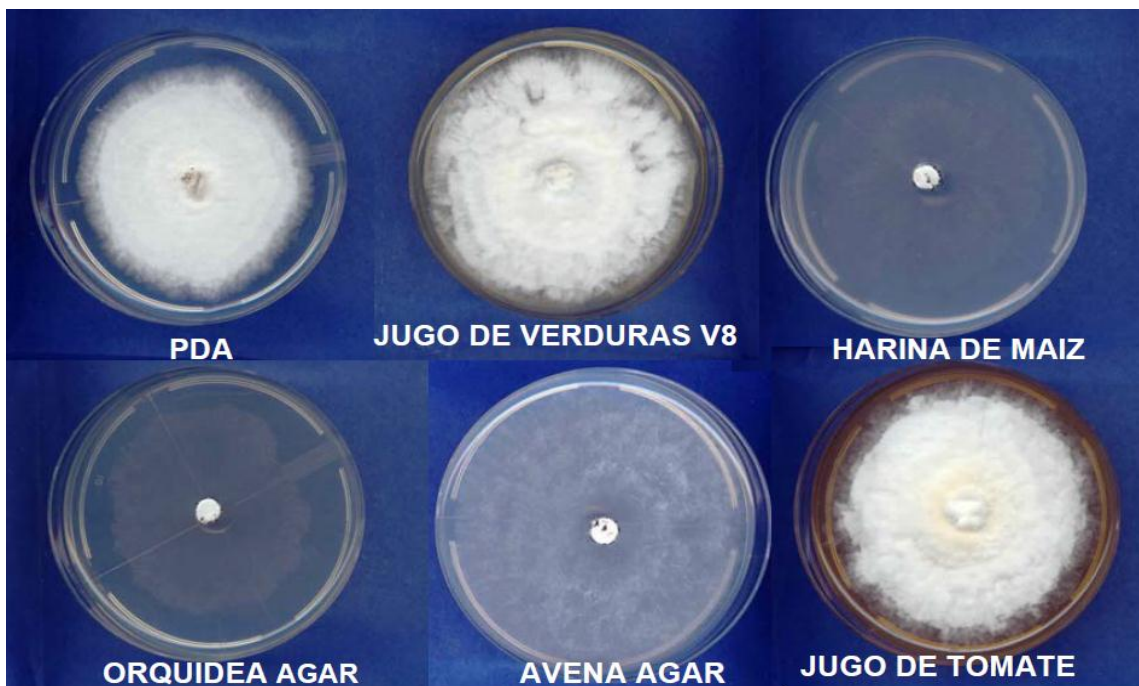


Figura 2. Crecimiento de *Pestalotia* sp. En diferentes medios de cultivo a los cinco días de establecido el experimento.



Figura 3. Inhibición del crecimiento micelial del hongo *Pestalotia* sp., utilizando mezcla de extracto acuoso de hojas de merrey con chaparro al 1%.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El estudio se realizó en el laboratorio de Entomopatógeno de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María, ubicada en el margen derecho del río Huallaga a 1.5 Km de la carretera Tingo María – Huánuco. Políticamente se localiza en el distrito de Rupa Rupa, provincia de Leoncio Prado, región de Huánuco, cuyas coordenadas UTM son: 390530 Este y 8970075 Norte a una altitud de 668.6 m.s.n.m.

3.2. Zona de vida

Ecológicamente, de acuerdo a la clasificación de zonas de vida o de formaciones vegetales del mundo y el diagrama bioclimático de Leslie R. HOLDRIGE (1994) la zona de Tingo María se encuentra en la formación vegetal de bosque muy húmedo Premontano Sub. Tropical (bmh – PST).

3.3. Factores climáticos

En la zona de Tingo María las precipitaciones anuales son de 3200 mm, temperaturas máxima y mínima de 29.4 y 19 °C respectivamente, con un promedio anual de 24.2 °C y con una humedad relativa de 80% (Estación José Abelardo Quiñones – UNAS, 2017).

3.4. Metodología

3.4.1. Aislamiento, identificación y caracterización del síntoma del agente causal de la mancha foliar

3.4.1.1. Muestreo de material vegetal

Se realizó un muestreo cualitativo de acuerdo a la metodología descrita por STREETS (1992), donde se colectaron hojas y la espata de anturio que presentaban síntomas de mancha foliar necrótica (Figura 4).



Figura 4. Fase de campo a) Observación y reconocimiento de la mancha foliar en hojas de anturio, b) Síntoma de la mancha foliar necrótica en hojas, c) Síntoma de la mancha foliar necrótica en espata y d) Colecta de la muestra, utilizando bolsa de polipropileno y tijera.

Las muestras colectadas fueron aquellas con posible presencia de ataque de hongos (Figura 4), que se encuentran dentro del ámbito de la zona de Tingo María (vivero Flores Tropicales, del Ing. Alfredo Loayza Alva y el vivero de la Facultad de Recursos Naturales Renovables). Se tomaron muestras de tejido foliar enfermo que presentaban síntomas iniciales e intermedio de afección fúngica. Las muestras recolectadas se conservaron en bolsas de polipropileno conteniendo un paño de algodón humedecido con agua, posteriormente fueron llevadas al Laboratorio de Entomopatógeno de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

3.4.1.2. Aislamiento

- **Siembra de tejido vegetal enfermo en medio de cultivo (inducción al crecimiento micelial)**

Se siguió la metodología planteado por TUIITE (1969). Las muestras colectadas con síntomas de la enfermedad fueron lavadas con agua corriente para eliminar rastros de tierra. Luego se procedió a cortar el tejido vegetal en pequeños fragmentos de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, que abarcó la mitad de tejido enfermo. Posteriormente dentro de la cámara de flujo laminar (STREAMLINE) previamente desinfectada, el tejido vegetal fue sumergido en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 – 1% por un tiempo de tres minutos, con el propósito de eliminar contaminantes y microorganismos superficiales. Trascorrido el tiempo de desinfección se procedió a enjuagar tres veces con agua destilada estéril y se dejó secar el tejido vegetal sobre papel toalla estéril (Figura 5).

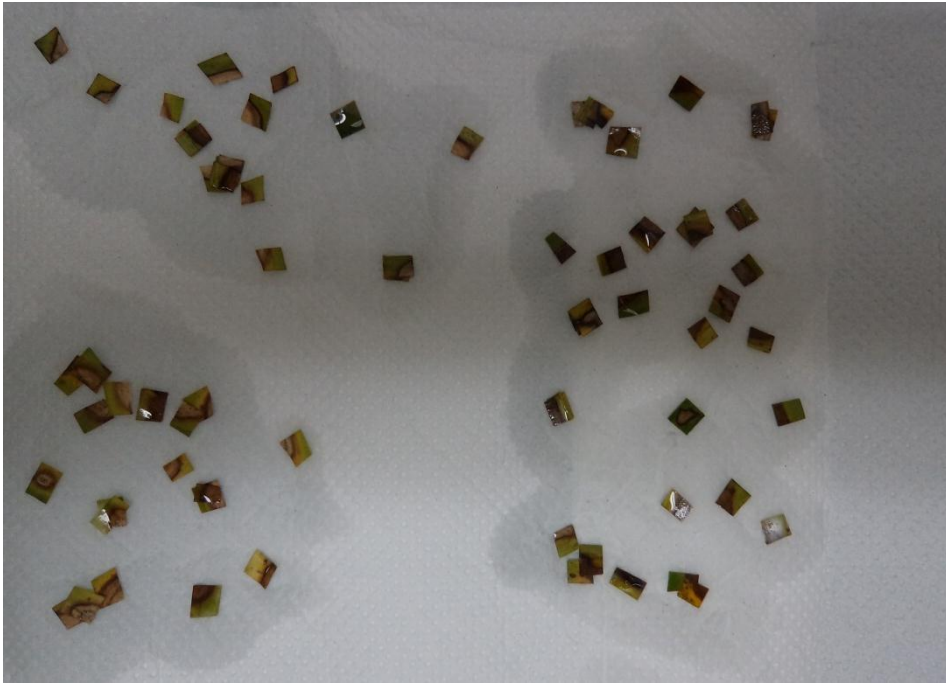


Figura 5. Tejido vegetal secando sobre papel toalla estéril.

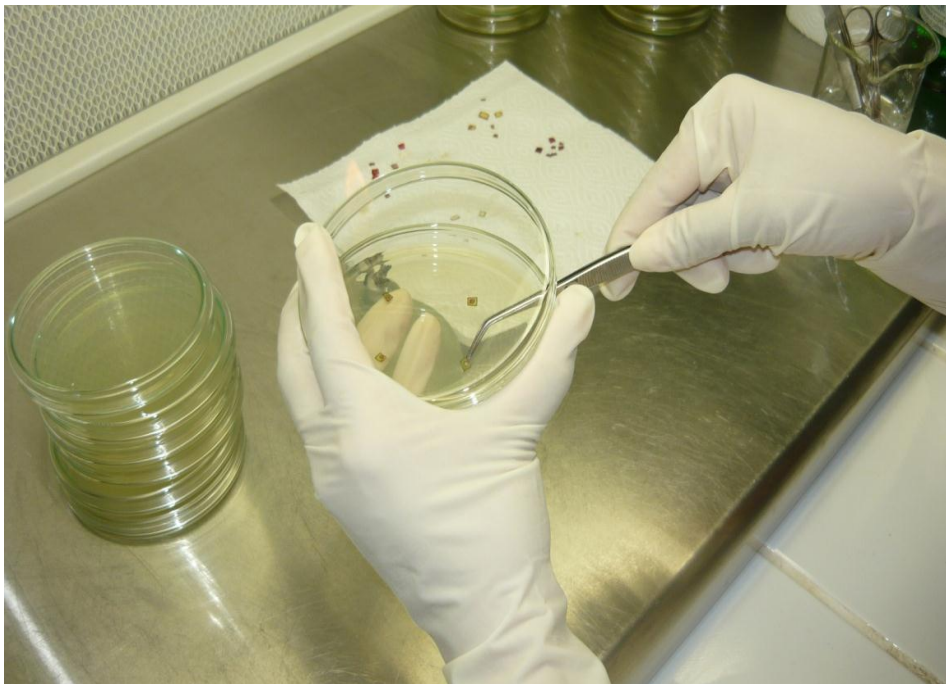


Figura 6. Siembra del tejido foliar de anturio con síntomas de mancha foliar necrótica en medio PDA.

Una vez que el tejido vegetal estuvo completamente seco, se procedió a sembrar dentro de las placas Petri que contenían medio de cultivo

Agar Papa Dextrosa (PDA) previamente esterilizados en la autoclave (WARNING modelo NO. 25X), se colocó tres fragmentos de tejido vegetal por placa y en forma equidistante (en triangulo) uno del otro, para no dificultar el posterior desarrollo del patógeno. Posteriormente todas las placas Petri fueron puestas en incubadora, con una temperatura promedio de 25 °C. A las 24, 48 y/o 72 horas se observó el desarrollo micelial y conidial de los patógenos (Figura 6), procediéndose a su reislamiento para permitir su purificación y observar sus características.

- **Cámara húmeda (inducción a la esporulación)**

Se adaptó la metodología descrita por FRENCH y HEBERT (1982), pero sin modificar el principio fundamental que consiste en propiciar la formación de conidias como lo manifiesta TUIE (1969). Las muestras colectadas con síntomas de la enfermedad fueron lavadas con agua corriente para eliminar rastro de tierra. Luego se procedió a cortar el tejido vegetal en forma de pequeñas hojas de aproximadamente 3 x 4.5 cm, el tejido vegetal cortado contenía o abarcaba tejido enfermo por el patógeno. Posteriormente dentro de la cámara de flujo laminar (STREAMLINE) previamente desinfectada, el tejido vegetal fue sumergido en una solución de hipoclorito de sodio al 0.5 – 1% por un tiempo de tres minutos, con el propósito de eliminar contaminantes y microorganismos superficiales. Trascurrido el tiempo de desinfección se procedió a enjuagar tres veces con agua destilada estéril y se dejó secar el tejido vegetal sobre papel toalla estéril. Seguidamente se procedió a elaborar las cámaras húmedas, para esto se utilizó recipientes de plástico de polietileno

de 24.5 x 16.5 x 4 cm (tapers rectangulares M&R Plastipak s.a. de 1 L por unidad) y láminas de vidrio de 3 x 45 x 105 mm, previamente lavados con agua destilada y papel toalla estéril (Marca Ellite). Los recipientes de plástico de polietileno fueron desinfectados con alcohol al 70%, luego se colocó dentro del recipiente de plástico dos hojas dobladas de papel toalla, seguidamente se desinfecto con alcohol al 70% las láminas de vidrio, que fueron colocadas en el interior del recipiente.

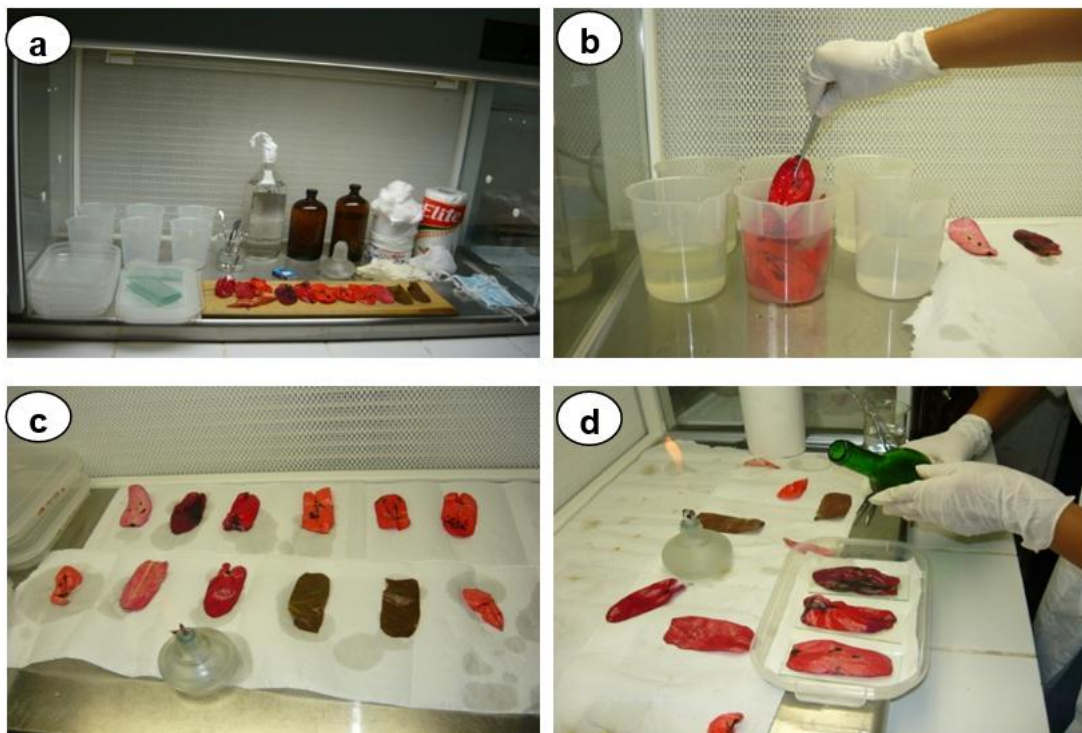


Figura 7. Cámara húmeda a) Materiales, b) Desinfección y enjuague en agua destilada estéril de las hojas de anturio, c) Muestras siendo secadas dentro de la cámara de flujo laminar con el apoyo del papel toalla y d) Proporcionando agua destilada estéril a la cámara húmeda.

Una vez que el tejido vegetal estuvo completamente seco, se colocó sobre las láminas de vidrio. Seguidamente se vertió agua destilada estéril

sobre el papel toalla hasta que se observará el 50% del papel toalla humedecida, esto permitirá la humedad necesaria para la esporulación del patógeno y la lámina de vidrio evitará el contacto del material vegetativo con el agua. Luego se taparon los recipientes de plástico, se rotularon y se dejó incubar a temperatura ambiente aproximadamente 25 °C de temperatura (Figura 7).

Trascurrido 24, 48 y/o 72 horas se observó si presentaba esporulación del patógeno para proceder a realizar un aislamiento directo con la ayuda de placas Petri que contenían medio PDA, para su posterior reaislamiento que permitió purificar y observar sus características.

3.4.1.3. Purificación

Una vez realizado el aislamiento el patógeno fue repicado para obtener cultivos puros utilizando el medio Agar Papa Dextrosa, de acuerdo a lo recomendado por FRENCH y HEBERT (1982).

3.4.1.4. Identificación

Se caracterizó al hongo aislado según sus aspectos morfológicos como son: color de conidia y conidióforo; estructuras presentes del hongo, características de las conidias en medio de cultivo, entre otros. El hongo aislado fue identificado a nivel de género haciendo uso de la clave dicotómica del libro cuyos autores fueron H. L. Barnett & Barry B. Hunter que se publicó el año 1999, titulado "Illustrated Genera Of Imperfect Fungi", cuarta edición de la segunda reimpresión (Figura 8).

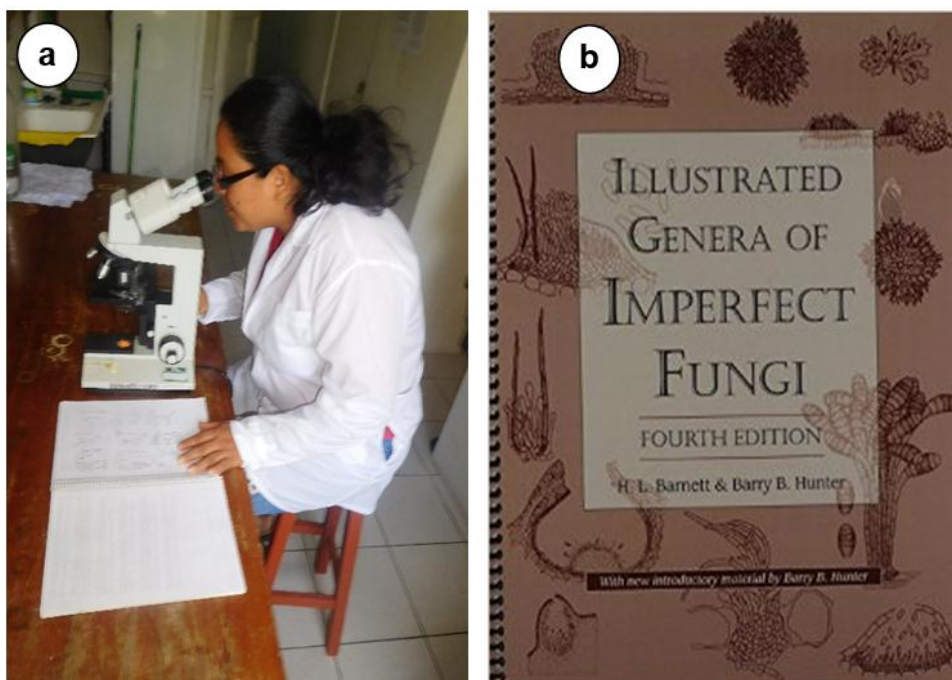


Figura 8. Identificación del agente causal, a) Observación de la estructura del hongo (40x) mediante montajes en lactofenol de azul de metileno b) Clave dicotómica del libro de Barnett & Hunter (1999).

La identificación fue confirmada por el Ing. M.Sc. Giannfranco Egoávil Jump, especialista del Área de Sanidad Vegetal de la Universidad Nacional Agraria de la Selva. Debido a la falta de equipos más especializados (microscopio, micrómetro, etc.) no se realizó la determinación de la especie, en tal sentido se llevó el cultivo puro a la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematodología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, donde realizó el aislamiento a través de medio de cultivo PDA y Agar V-8.

3.4.1.5. Conservación de patógenos

El patógeno fúngico aislado se conservó en tubos de ensayo conteniendo medio PDA, para su posterior uso en otras aplicaciones (Figura 9).

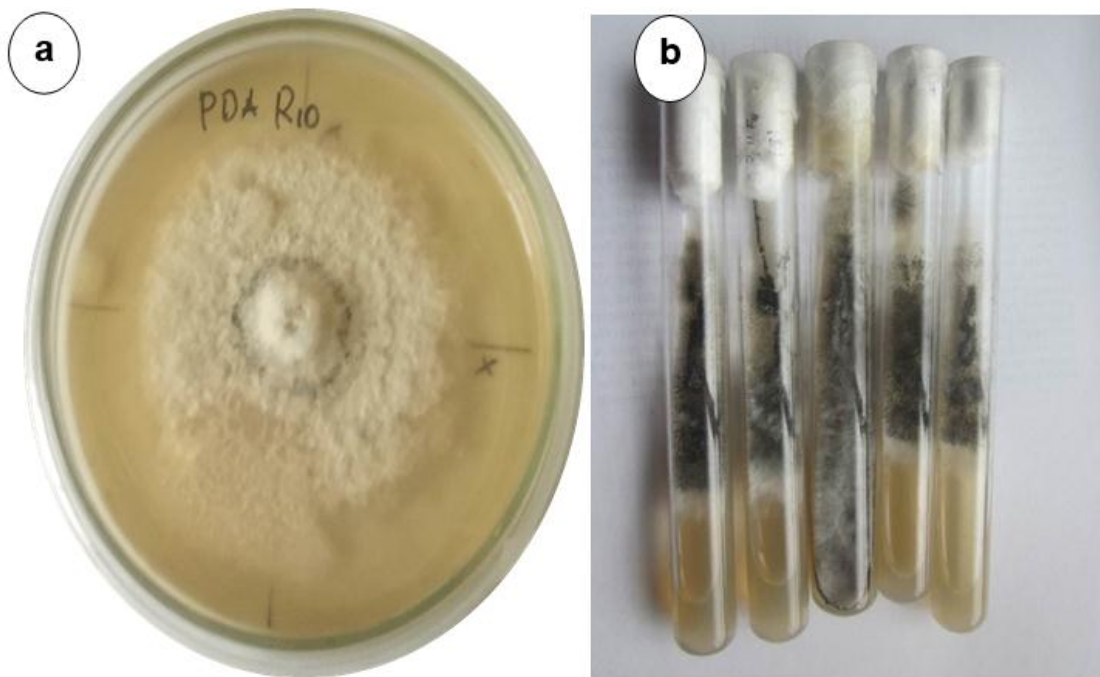


Figura 9. Conservación del patógeno: a) Cultivo puro del hongo, desarrollado en medio de cultivo PDA y b) Crecimiento en medio de cultivo PDA contenido dentro de tubos de ensayo.

3.4.1.6. Prueba de patogenicidad (postulado de Koch)

- **Fase invernadero**

Se trabajó con plantas de anturio de nueve meses de edad que presentaban tres hojas, estas plantas fueron obtenidas del vivero Flores Tropicales libres de problemas sanitarios, las cuales fueron acondicionadas en el vivero de producción de la Facultad de Agronomía.

- **Inoculación**

Para determinar la patogenicidad del hongo aislado se realizó la inoculación del patógeno en cada una de las hojas de las plantas de anturio,

aparentemente libre de patógenos, las cuales fueron desinfectadas la superficie de la hoja con hipoclorito de sodio al 0.25%, seguidamente fueron lavadas con agua estéril.

Se utilizó tres plantas de anturio por cada método de inoculación, el tratamiento testigo T_0 se aplicó con la ayuda de un aspersor manual, agua destilada estéril, para el tratamiento T_1 y T_2 , se trabajó debajo de la epidermis (levantando la epidermis) (T_1) y sobre la epidermis (T_2) de las hojas, donde se colocó un trozo de PDA que contenía el hongo puro que fue extraído con un sacabocado de 0.5 cm de diámetro.

En caso de los tratamientos T_3 y T_4 , se produjo heridas con el abrasivo Carburaron sobre el tejido vegetal de las hojas, para inocular al patógeno mediante la aplicación con un aspersor manual, de una suspensión del hongo a una concentración de 1.0×10^7 conidias/ml (T_3) e inoculación de rodajas de PDA de 0.5 cm de diámetro con el patógeno sobre las heridas (T_4) mecánicas del tejido vegetal provocadas por la aplicación del abrasivo, además se vertió 200 ml por cada planta de la suspensión del hongo con la misma concentración al suelo.

Trascurrido el tiempo de evaluación de aproximadamente 20 días posteriores a la inoculación, se procedió a realizar el reaislamiento del hongo a partir de las manchas necróticas, que se observó en aquellas hojas de anturios que fueron inoculadas con el hongo, con la finalidad de verificar que los síntomas se deben al patógeno inoculado y no a otros patógenos externos (Figura 10).

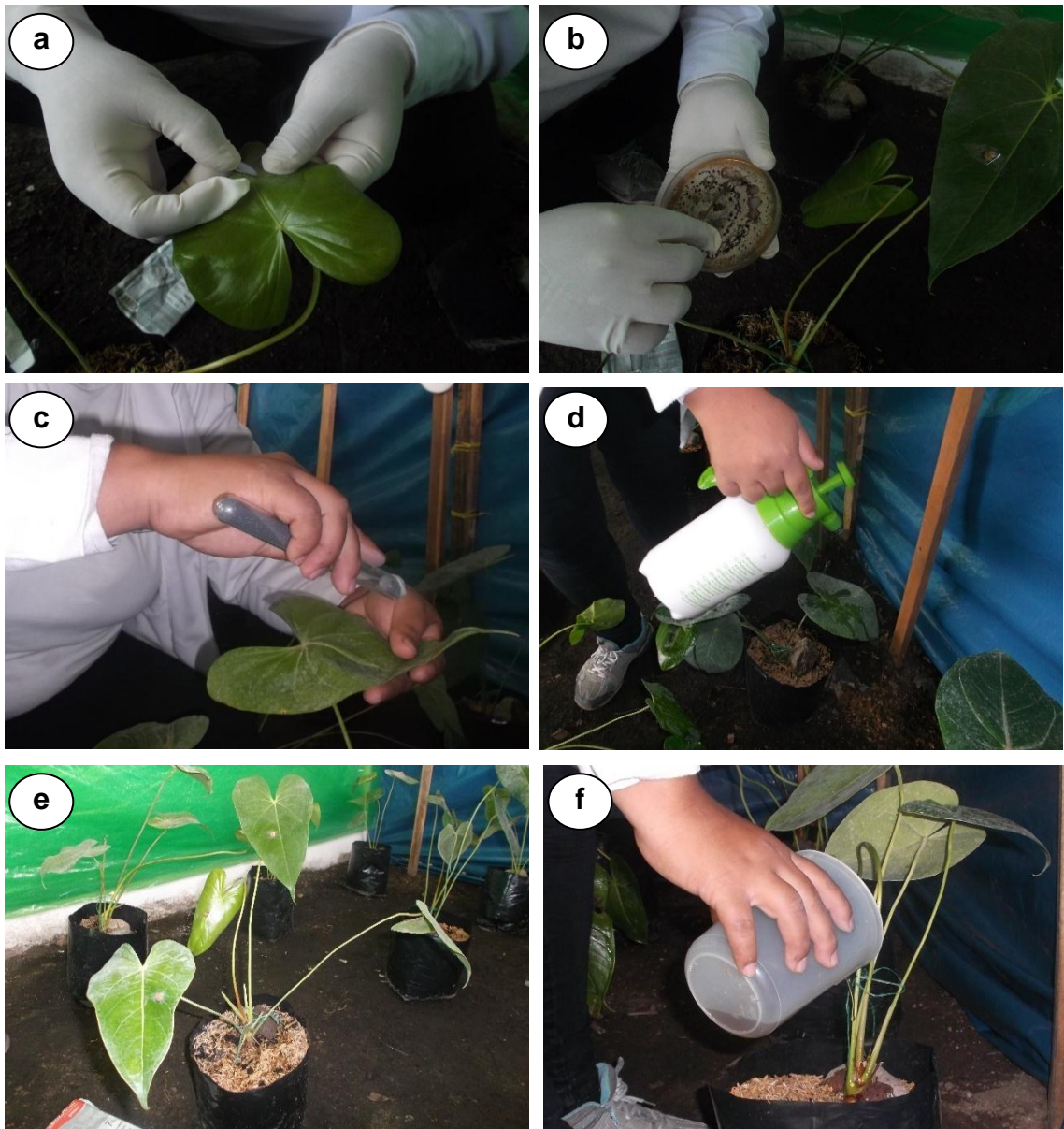


Figura 10. Prueba de patogenicidad (postulado de Koch: a) Inoculación debajo de la epidermis (T_1), b) Inoculación sobre la epidermis (T_2) de rodajas del medio PDA con el hongo puro, c) Haciendo heridas con el abrasivo carburaron, d) inoculación del patógeno mediante la aspersión de una concentración de 1.0×10^7 conidias/ml del hongo (T_3), e) Inoculación de rodajas de PDA de 0.5 cm de diámetro sobre las heridas (T_4) provocadas por abrasivo, y f) Aplicación de 200 ml por cada planta de la suspensión del hongo.

3.4.2. Evaluación del crecimiento del agente causal en diferentes medios de cultivos, pH y temperatura

3.4.2.1. Prueba del crecimiento micelial en medios de cultivo

- **Preparación y siembra en medio de cultivo**

Para esta prueba se preparó los siguientes medios de cultivo: PDA, OMA, CMA, CA, V8, EMA, PHaDA, PEaDA, AA y AJT. Los ingredientes de estos medios se indican en el Apéndice 1 Anexo A. Preparado los diez medios de cultivo y esterilizados (121.5 °C de temperatura y 15 Lb. de presión) se realizó la prueba de crecimiento micelial, para lo cual se utilizó placas Petri esterilizadas de 20x100 mm. Se utilizó por cada medio de cultivo 10 placas Petri, en cada placa se vertió entre 15 a 20 ml de medio de cultivo (Figura 11). Para la prueba, se sembró el cultivo purificado del patógeno aislado en los diferentes medios de cultivo para cual se usó un sacabocado de 0.5 cm de diámetro (Figura 11).

- **Registro del desarrollo y finalización de la prueba**

Las observaciones que se registraron fueron del tipo cuantitativo y cualitativo:

Radio de crecimiento.- Para obtener el ritmo promedio de crecimiento cm/día del hongo ecuación (1) y la ecuación lineal del crecimiento micelial, de cada tratamiento (Figura 11 y 12).

$$\text{Ritmo promedio de crecimiento (RPC)} = \frac{\text{Incremento total (cm)}}{\text{Tiempo total (días)}} \quad (1)$$

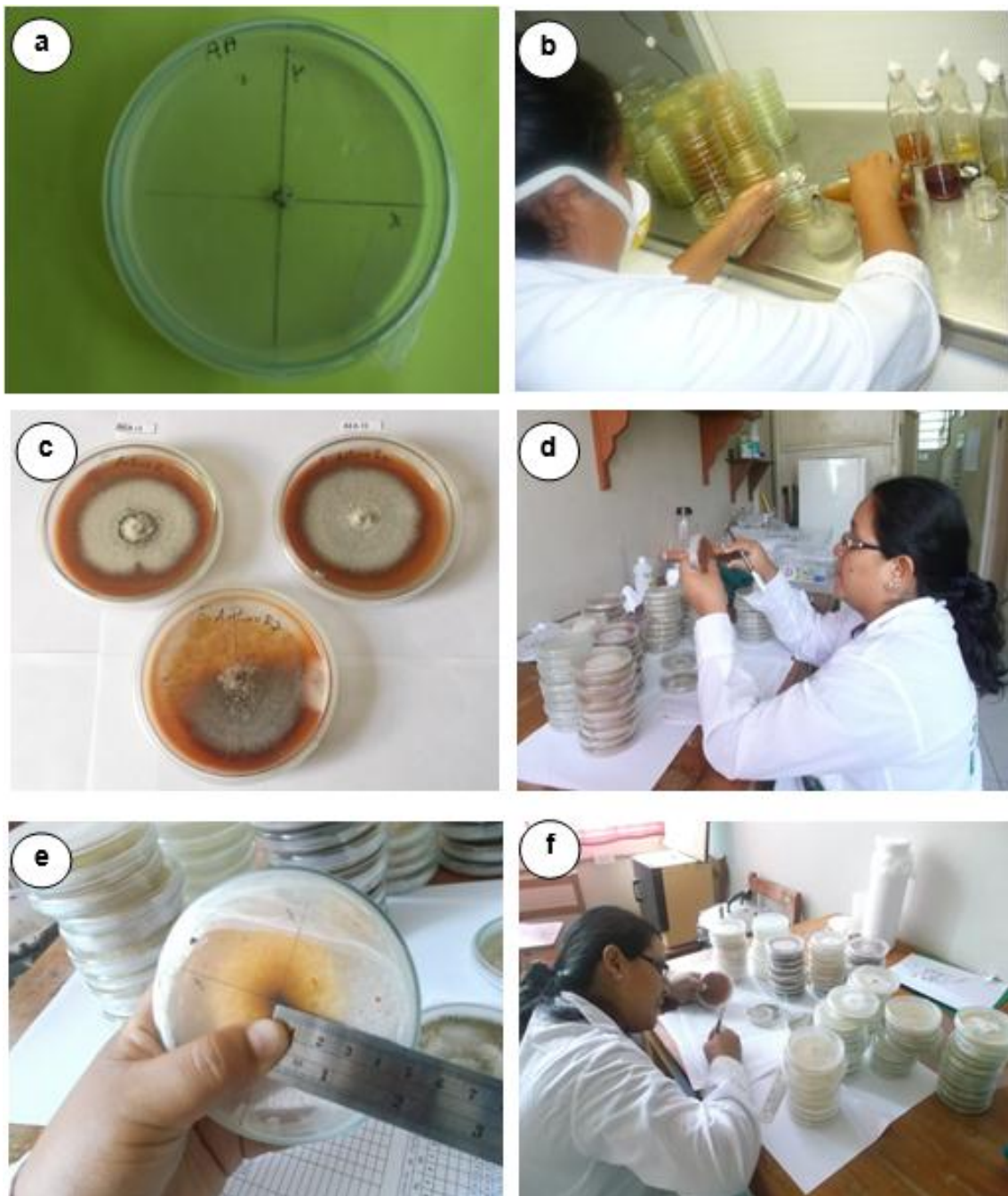


Figura 11. Ensayo de crecimiento micelial en diferentes medios de cultivos a) Placa Petri con líneas horizontales y verticales, hechas con plumón indeleble, b) Plaqueo de los medios de cultivo, c) Patógeno desarrollado en el medio Agar Espata de anturio T (PEaA), d) y e) Forma de medir el radio de crecimiento del hongo en los medios de cultivo y d) Registro del crecimiento micelial en el formato.

Cambios cualitativos.- Cambios como el color y tipo de colonia, tipo de crecimiento del hongo en los tratamientos con respecto al testigo.

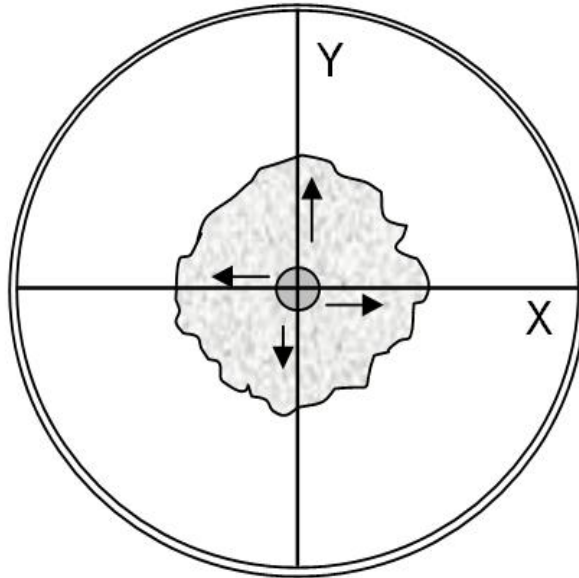


Figura 12. Método de medición de las colonias fungosas en placas Petri con PDA.

Número de conidias.- Así mismo se cuantificó de cada tratamiento el número de conidias/cc, para ello se utilizó el hemocitómetro de Neubauer (Marienfeld). Para esto se tomó una rodaja del medio de tres repeticiones de cada uno de los tratamientos, utilizando un sacabocado (diámetro= 0.5 cm), cada muestra se depositó en vasos precipitados de vidrio y/o plásticos, en 10 ml de agua destilada con dos gotas de Tween 80 al 0.1%, seguidamente se agitó con la ayuda de una vaqueta de vidrio por un minuto, obteniendo una suspensión original, de la cual se extrajo con una pipeta una alícuota de 1 ml de la suspensión original y se depositó con mucho cuidado dentro del hemocitómetro de Neubauer, de tal manera que el líquido ingrese por capilaridad sin que entre burbuja en la cámara (FRENCH, 1982). Luego fue

llevado al microscopio binocular (Microscopio LABOVAL 4), con la ayuda de un contómetro se realizó el conteo en tres repeticiones por tratamiento, para luego obtener concentraciones (suspensiones) de conidias por mililitro. La cámara de Neubauer tiene la forma de una lámina porta objeto con rieles en forma de H en la parte superior e inferior del riel central. Cada cámara está dividida en nueve cuadros primarios (CP). Cada CP está dividida a su vez en 16 cuadros secundarios (CS). El cuadrado primario central (CPC) está dividido en 25 CS, estando cada uno de ellos divididos a su vez en 16 cuadros terciarios (CT). Para el conteo de conidias se utilizó el cuadro principal central (CPC), ecuación (2) y ecuación (3).

$$\text{Cuadro secundario central (CSC)} = 1 + 2 + 3 + 4 + 5 = S \quad (2)$$

$$\Rightarrow S * 50\,000 = \text{Número total de conidias (ufc / ml)} \quad (3)$$

- **Diseño estadístico**

Componentes en estudio.- Los componentes en estudio son los siguientes (Cuadro 1):

Cuadro 1. Componentes en estudio.

Entradas	Unidad	Salidas (Suspensión)
Medios de cultivo	experimental	
Diferentes medios de cultivo	<i>Pestalotiopsis guepinii</i>	RPC y número de conidias por mililitros de agua

Diseño experimental.- Se usó el diseño completamente al azar (DCA), con diez tratamientos, incluyendo al tratamiento testigo (T_1) (Cuadro 2), con diez repeticiones (unidades experimentales) (CALZADA, 1982).

Cuadro 2. Tratamientos del experimento.

Trat.	Medios de cultivo	Repetición	Evaluación
T_1	Agar Papa Dextrosa (PDA)	10	Diaria
T_2	Jugo V8 (V8)	10	Diaria
T_3	Agar Avena Quaker (Oet Meal Agar) (OMA)	10	Diaria
T_4	Agar Harina de Maíz (Cor Meal Agar) (CMA)	10	Diaria
T_5	Agar Extracto de Malta (EMA)	10	Diaria
T_6	Agar Zanahoria (AZ)	10	Diaria
T_7	Jugo Tomate (JT)	10	Diaria
T_8	Agar Agua (AA)	10	Diaria
T_9	Agar Hoja de Anturio (PHaA)	10	Diaria
T_{10}	Agar Espata de Anturio (PEaA)	10	Diaria

El modelo aditivo lineal del DCA se representa en la siguiente ecuación:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij} + \lambda_{ijk} \quad (4)$$

Donde:

Y_{ij} : Respuesta observada en la k - ésima subunidad, correspondiente a la unidad experimental del j - ésimo bloque a la cual se le aplico el i - ésimo tratamiento

μ : Efecto de la media general.

T_i : Efecto de la i - ésimo tratamiento.

ξ_{ij} : Efecto aleatorio del error experimental

λ_{ijk} : Efecto aleatorio del error de muestreo en la k -ésima subunidad de la repetición j sujeta al tratamiento.

Prueba de medias

Se realizó el Análisis de Variancia a un nivel de confianza del 95% y con un 5% de error (F. tab. = 0.05) (Cuadro 3) y se determinó el coeficiente de variabilidad de los ensayos, ecuación (5). Además, se halló las diferencias de medias con la prueba de rangos múltiples o análisis honesta de Tuckey a un 95% de confiabilidad ($\alpha= 0.05$) (Cuadro 3) (CALZADA, 1982), para lo cual se utilizó el programa Microsoft Excel.

Cuadro 3. Modelo del Análisis de Variancia.

F.V	G.L.	S.C.	C.M.	F.Cal.	F.Tab.
Tratamiento	t-1	SCtra	SCtra/gl _{tra} = CMtra	CMtra/CMee	$F_{\alpha}(gl_{tra}, gl_{ee})$
Error	r(t-1)	SCee	SCee/gl _{ee} = CMee		
Total		SCtotal			

t: Tratamiento y r: Repetición.

$$CV = \frac{\sqrt{CMe}}{Y..} \times 100 \quad (5)$$

Cuadro 4. Prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) de los promedios de los tratamientos.

Trat.	Medios de cultivo	Promedio	Significancia
T ₁	Agar Papa Dextrosa (PDA)		
T ₂	Jugo V8 (V8)		
T ₃	Agar Avena Quaker (Oet Meal Agar) (OMA)		
T ₄	Agar Harina de Maiz (Cor Meal Agar) (CMA)		
T ₅	Agar Extracto de Malta (EMA)		
T ₆	Agar Zanahoria (AZ)		
T ₇	Jugo Tomate (JT)		
T ₈	Agar Agua (AA)		
T ₉	Agar Hoja de Anturio (PHaA)		
T ₁₀	Agar Espata de Anturio (PEaA)		

Ecuación lineal

La curva de regresión lineal valores de RPC y días.

$$Y_i = aX_i + b + \epsilon_i \quad (6)$$

Leyenda:

Y_i = Variable dependiente.

X_i = Variable independiente.

a = Intercepta con el eje Y.

$$a = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \quad (7)$$

b = Coeficiente de regresión (pendiente de la línea recta).

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n y_i - a \sum_{i=1}^n x_i}{n} = Y - aX \quad (8)$$

ϵ_i = Error asociado a la medición del valor X_i y siguen los supuestos de modo que $\epsilon_i \sim N(0, \sigma^2)$ (media cero, varianza constante e igual a un σ y $\epsilon_i \perp \epsilon_j$ con $i \neq j$).

- El coeficiente de determinación del crecimiento micelial, de acuerdo al RPC y días.

$$r = \frac{n(\sum_{i=1}^n X_i Y_i) - (\sum_{i=1}^n X_i)(\sum_{i=1}^n Y_i)}{\sqrt{n(\sum_{i=1}^n X_i^2) - (\sum_{i=1}^n X_i)^2} \cdot \sqrt{n(\sum_{i=1}^n Y_i^2) - (\sum_{i=1}^n Y_i)^2}} \quad (13)$$

Leyenda:

r = Coeficiente de correlación.

Y_i = Variable dependiente.

X_i = Variable independiente.

n = n-ésima evaluación.

3.4.3. Prueba del crecimiento micelial en niveles de pH

Se realizó la prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de pH con la finalidad de estudiar el comportamiento del patógeno. Se utilizó el

mejor medio de cultivo obtenido en el ensayo de crecimiento en diferentes (Cuadro 1), es decir el medio Agar Espata de Anturio (PEaA).

3.4.3.1. Plaqueo del medio de cultivo

Una vez preparado el medio, se esterilizó dentro de la autoclave (WARNING Modelo NO. 25X) (121.5 °C de temperatura y 15 Lb de presión) y se realizó la prueba de crecimiento micelial en niveles de pH, para lo cual se utilizó placas Petri esterilizadas de 20 x 100 mm. Antes de plaquear el medio de cultivo, se le midió y calibró su pH con la ayuda del pHmetro, para obtener el pH deseado (Cuadro 5), en donde se adicionó cloruro de sodio (ClNa) para obtener un pH ácido e Hidróxido de Potasio (KOH) para obtener un pH alcalino (Cuadro 5) (Figura 13). Se utilizó por cada nivel de pH (tratamiento) 10 placas Petri, el plaqueo se realizó dentro de la cámara de flujo laminar (STREAMLINE) previamente desinfectada, en cada placa de vidrio se vertió entre 15 a 20 ml de medio de cultivo (Figura 13).

3.4.3.2. Siembra del patógeno

Una vez solidificado y enfriado los medios de cultivos plaqueados, se sembró el cultivo purificado del patógeno aislado en los diferentes tratamientos para lo cual se usó un sacabocado de 0.5 cm de diámetro (Figuras 11 y 13). Una vez terminado la siembra del hongo, se rotuló las placas de vidrio y se dispuso en un recipiente de plástico para donde diariamente se observó el desarrollo del hongo y registró el radio de crecimiento. Una vez terminado el experimento se dejó a luz directa por 48 horas.

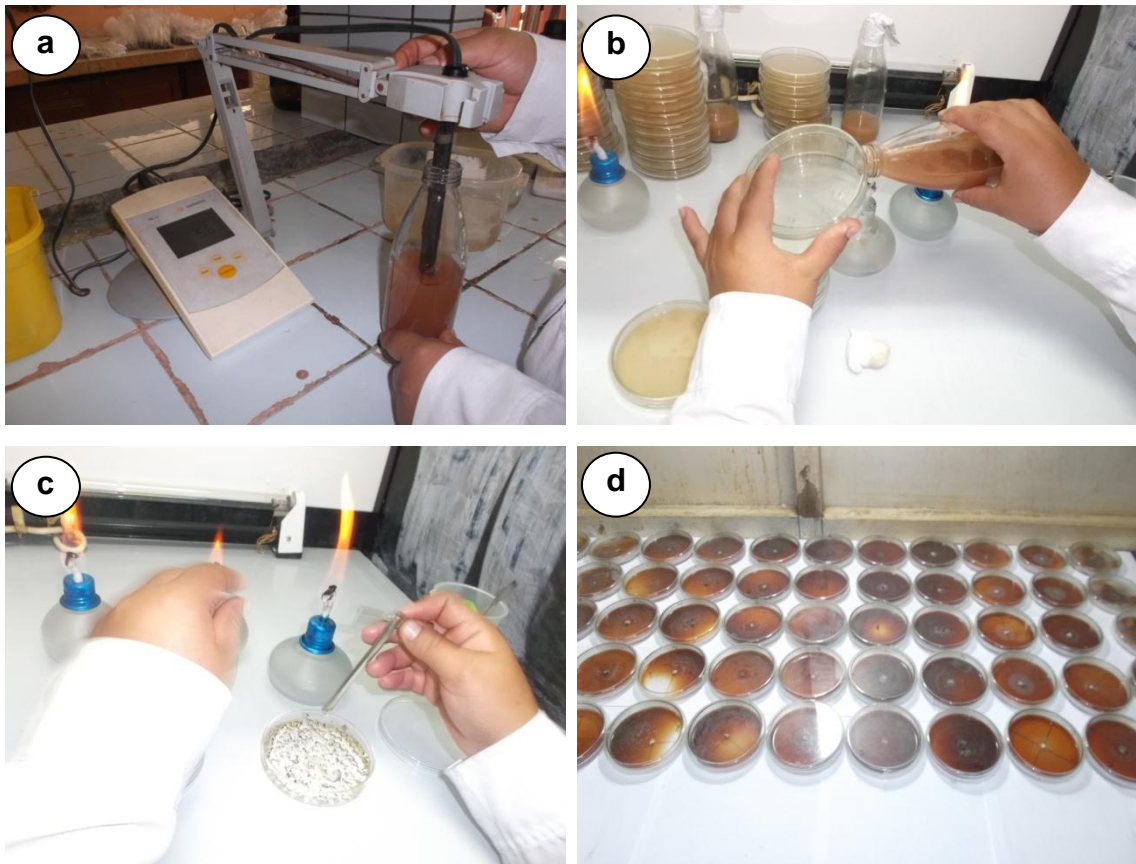


Figura 13. Ensayo de crecimiento micelial en diferentes pH a) Calibración del pH, b) Plaqueo de los medios de cultivo, c) Obtención de rodajas de PDA con el cultivo puro del hongo y d) Tratamientos listo para su observación y evaluación en los días siguientes.

3.4.3.3. Parámetros evaluados

Los parámetros que se evaluaron fueron los mismos que se utilizó en la prueba del crecimiento micelial con medios semisintéticos.

3.4.3.4. Diseño estadístico

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), compuesto de nueve tratamientos, incluyendo el tratamiento con pH neutro (T₇) (Cuadro 8), con

10 repeticiones, el modelo aditivo lineal del DCA se muestra en la ecuación (4). Se realizó el ANVA (Cuadro 3) y se determinó el coeficiente de variabilidad de los ensayos ecuación (5). Además, se halló las diferencias de medias con la prueba de Tuckey (Cuadro 5) (CALZADA, 1982). Y se determinará la ecuación lineal.

Cuadro 5. Ensayo del crecimiento micelial en diferentes niveles de pH.

Trat.	Descripción	Repetición	Evaluación
T ₁	Ácido 1 pH = 4.18	10	Diaria
T ₂	Ácido 2 pH = 4.38	10	Diaria
T ₃	Ácido 3 pH = 5.36	10	Diaria
T ₄	Ácido 4 pH = 5.38	10	Diaria
T ₅	Ácido 5 pH = 5.78	10	Diaria
T ₆	Ácido pH = 6.34	10	Diaria
T ₇	Neutro 1 pH = 7.08	10	Diaria
T ₈	Alcalino 2 pH = 7.78	10	Diaria
T ₉	Alcalino 3 pH = 8.27	10	Diaria

3.4.4. Prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de temperaturas

Se realizó la prueba micelial en niveles de temperatura con la finalidad de estudiar el comportamiento del patógeno. Se utilizó el mejor medio de cultivo obtenido en el ensayo de crecimiento micelial (Cuadro 1), es decir el medio Agar Espata de Anturio (PEaA).

3.4.4.1. Plaqueo del medio de cultivo

Una vez preparado el medio, se esterilizó dentro de la autoclave (WARNING Modelo NO. 25X) (121.5 °C de temperatura y 15 Lb de presión) y se realizó la prueba de crecimiento micelial en niveles de temperatura, para lo cual se utilizó placas Petri esterilizadas de 20 x 100 mm. Se utilizó por cada nivel de temperatura 10 placas Petri, en cada placa se vertió entre 15 a 20 ml de medio de cultivo.

3.4.4.2. Siembra del patógeno

Una vez solidificado y enfriado los medios de cultivos plaqueados, se sembró el cultivo purificado del patógeno, para cual se usó un sacabocado de 0.5 cm de diámetro (Figura 11). Se agrupó cada 10 placas Petri (repeticiones de cada tratamiento) y se llevó a la incubadora, refrigeradora y medio ambiente con temperaturas de 30.2, 26.1 y 10 °C respectivamente (tratamientos) (Cuadro 5).

3.4.4.3. Parámetros evaluados

Los parámetros que se evaluaron fueron los mismos que se utilizó en la Prueba del Crecimiento Micelial con medios semisintéticos.

3.4.4.4. Diseño estadístico

Se utilizó el Diseño Completamente al Azar (DCA), compuesto de tres tratamientos, incluyendo el tratamiento a temperatura ambiente (T_2) (Cuadro

6), con diez repeticiones, el Modelo Aditivo Lineal del DCA se muestra en la ecuación (4). Se realizó el ANVA (F. tab. = 0.05) (Cuadro 3) y se determinó el coeficiente de variabilidad de los ensayos ecuación (5). Además, se halló las diferencias de medias con la prueba de Tuckey ($\alpha= 0.05$) (Cuadro 6) (CALZADA, 1982). Y se determinará la ecuación lineal.

Cuadro 6. Ensayo del crecimiento micelial en diferentes temperaturas.

Trat.	Descripción	Repetición	Evaluación
T ₁	Temperatura 10.0 °C	10	Diaria
T ₂	Temperatura 26.1 °C	10	Diaria
T ₃	Temperatura 30.2 °C	10	Diaria

IV. RESULTADOS

4.1. Aislamiento, identificación y caracterización de síntomas del agente causal de la mancha foliar

4.1.1. Aislamiento

De los aislamientos realizados a través de la inducción a la esporulación e inducción al crecimiento micelial, dieron como resultado el aislamiento de un hongo del género *Pestalotia*. Al momento de realizar el aislamiento, se observó en el medio de cultivo el desarrollo de otros microorganismos contaminantes como *Penicillium* sp. y bacterias.

Se observó el medio de cultivo, donde creció la colonia de color blanco en el haz y de color melón en el envés, el micelio fue ralo adherido al medio, de superficie lisa y con los bordes onduladores e irregulares. Además, el crecimiento de la colonia fue a manera de anillo concéntrico en el medio PDA y con presencia de pequeñas gotitas de color negro brillante, estas gotitas también se observaron sobre en el tejido foliar acondicionado en la cámara húmeda. Se realizaron montajes, de las pequeñas gotitas de color negro, donde se observó en el microscopio la presencia de conidias en forma ovaladas con varias células, las células del centro presentan una pigmentación oscura y las células del extremo de color hialino, la conidia presentaba apéndices (Figura 14).

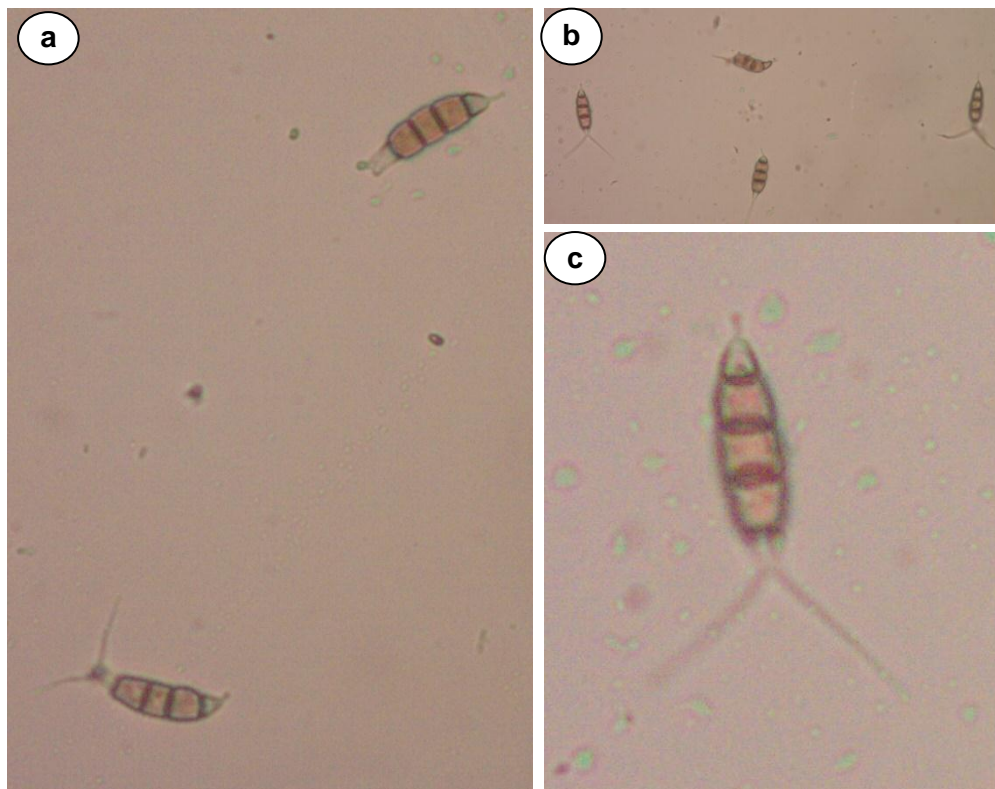


Figura 14. Conidias de *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert a) dos conidias con cinco células dentro de la conidia, b) cuatro conidias con sus apéndices y c) conidia del hongo donde se observa claramente los apéndices y cinco células dentro de la conidia.

En los montajes realizados a partir del tejido de la cámara húmeda, se confirmó la presencia de acérvulos. De acuerdo al desarrollo de la colonia y los montajes realizados y las claves dicotómicas de BARNETT y HUNTER (1999) (Anexo 2), se identificó como género *Pestalotia*.

4.1.2. Identificación

La Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematodología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, determinó la especie *Pestalotiopsis*

guepinii (Desm.) Steayaert, que presentaba una colonia afelpada de color blanco por el haz y de color salmón suave por el envés; forma abundante cantidad de acérvulos de color negro en anillos concéntricos; sobre todo en el medio PDA colonia de borde entero y forma circular; alcanzan un diámetro de 63 mm en medio PDA y 60 mm en medio Agar V-8 a los cinco días de incubación a 24 °C.

El patógeno *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steayaert presentó hifas hialinas y tabicadas.

En caso de los acérvulos del patógeno, presentaba una forma circular a lenticular solitarios y gregarias con dimensiones de 68 μm (45 a 120 μm). Conidias, en acérvulos, abundantes y tenían las dimensiones de 32 μm (28 μ a 35 μm) x 7 μm (6 a 7.5 μm); emergen a la madurez formando gotitas de color negro-brillante.

Conidióforos hialinos, no ramificados, muy pequeños de forma cilíndrica a obpiriforme.

El patógeno identificado presentaba conidias de fusoides, rectas y algunas ligeramente curvadas, formadas por cinco células; las dos células extremas son hialinas con bordes truncados y las tres células medianas son de color marrón del tipo concolor; célula apical con dos o tres (generalmente tres) apéndices hialinos y no ramificados de 23 μm de longitud (15 a 27 μm); la célula basal tiene un solo apéndice tubular, recto, corto y central de 5 μm de longitud (Anexo 3).

4.1.3. Postulado de Koch

Los resultados de la prueba de patogenicidad mediante el postulado de Koch, se presentan en el Cuadro 7 y Figura 15.

Cuadro 7. Postulado de Koch de *Pestalotiopsis guepinii* mediante cuatro métodos de inoculación en plantas de Anturio.

Trat.	Descripción	% Incidencia		
		Promedio	≥ 50%	100%
T ₀	Aspersión con agua destilada estéril	0.00%	---	---
T ₁	Inoculación de rodajas de PDA con el patógeno debajo de la epidermis	100.00%	5	7
T ₂	Inoculación de rodajas de PDA con el patógeno sobre la epidermis	0.00%	---	---
T ₃	Inoculación mediante la aspersion de una suspensión de 1×10^7 del hongo	0.00%	---	---
T ₄	Inoculación de rodajas de PDA con el patógeno sobre heridas mecánicas del tejido vegetal provocadas con el abrasivo carborudum	55.60%	7	---
T ₅	Inoculación mediante una aplicación al sustrato de 200 ml/planta de una suspensión de 1×10^7 del hongo	0.00%	---	---



Figura 15. Incidencia de *Pestalotiopsis guepinii* en la prueba de patogenicidad,

a) Presencia de mancha necrótica mediante la inoculación de rodajas de PDA con el patógeno debajo de la epidermis (T_1), y b) Presencia de manchas foliares necróticas mediante la inoculación de rodajas de PDA con el patógeno sobre heridas mecánicas del tejido vegetal provocadas con el abrasivo carborudum (T_1).

4.1.4. Síntoma de la enfermedad

De acuerdo a las observaciones realizadas en campo (Figura 16) y en la prueba de patogenicidad (Figura 15), se observa manchas amarillentas y manchas necróticas de color marrón a negruzco a plateado, las cuales puede ser variadas de una a muchas manchas y de diferente diámetro, las manchas necróticas muchas veces están acompañados de un halo color amarillo y plateado. Al inicio la mancha es de color marrón claro, a medida que la

enfermedad avanza, toma una coloración más oscura, tomando su coloración marrón a negruzco plateado.



Figura 16. Síntoma necrótico de las hojas de *Anthurium andraeanum* L. “anturio” con presencia mancha necróticas en las hojas de color marrón negruzco con bordes de color amarillo.

4.2. Evaluación del crecimiento del agente causal en diferentes medios de cultivos, pH y temperatura

4.2.1. Prueba del crecimiento micelial con medios semisintéticos

4.2.1.1. Análisis de varianza ($\alpha=0.05$)

Con los resultados obtenidos se procedió a realizar el ANVA ($\alpha= 0.05$) (Cuadro 8), para el crecimiento micelial a través del Ritmo Promedio de

Crecimiento (RPC), de *Pestalotiopsis guepinii* en diferentes medios semisintéticos (Figura 17 y Anexo: Cuadro 17 - 26), referente a los resultados obtenidos en el RPC del hongo.

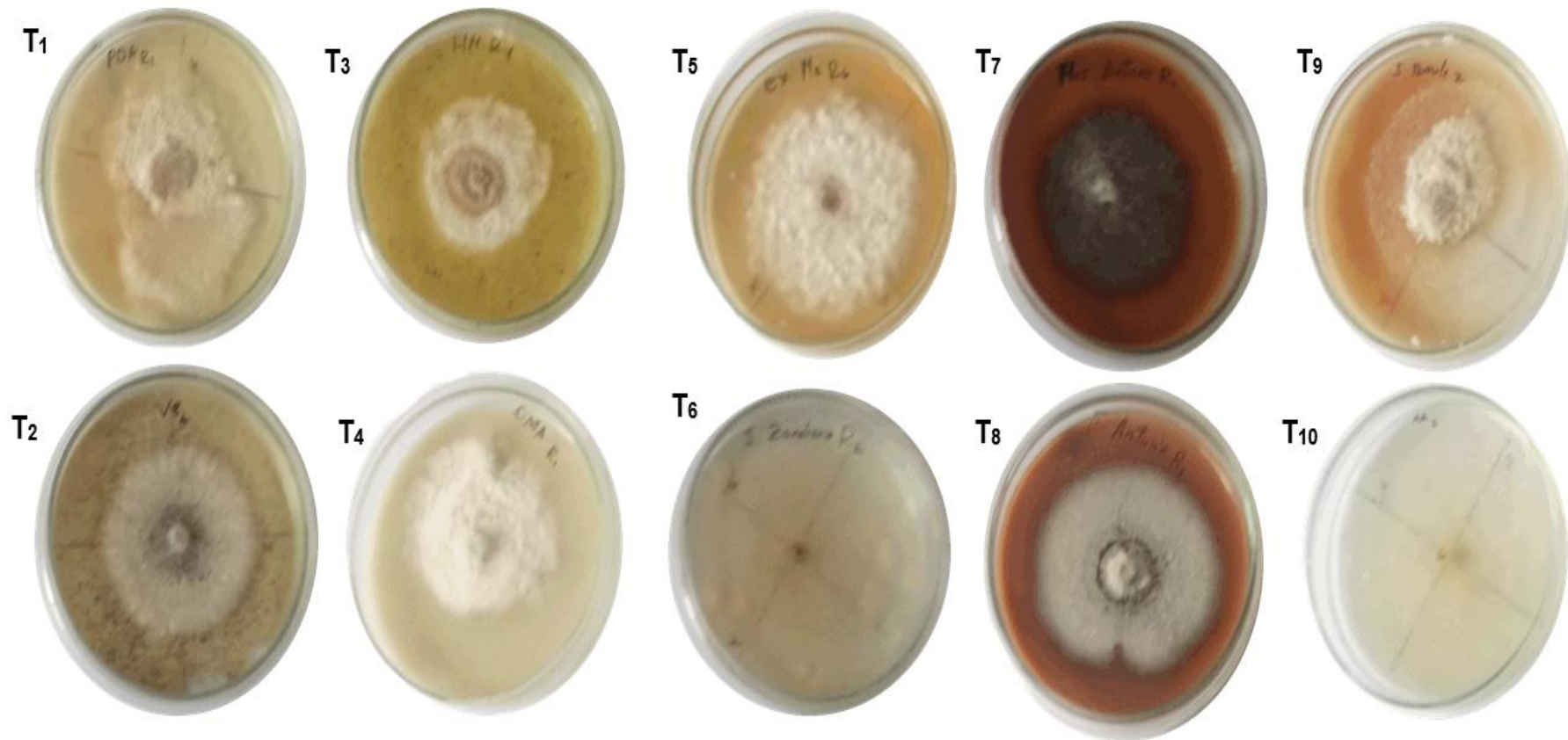
Cuadro 8. Análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes medios de cultivo.

Fuente de variación	G.L.	SC	CM	F.Cal.	F.Tab.
Tratamiento	9	0.2394	0.026595	S	42.88
Error Experimental	90	0.0558	0.0006203		
Total	99				

CV (%) = 6.83. NS: no existe significancia estadística. S: Significancia estadística de 5% de probabilidad.

4.2.1.2. Prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$)

Al existir diferencias estadísticas significativas en el ANVA (Cuadro 6) de los tratamientos, con respecto al RPC de *Pestalotiopsis guepinii* desarrollados en medios de cultivo, se procedió a realizar la prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$), el mayor ritmo promedio de crecimiento se registró para el sustrato constituido por Agar Espata de Anturio (PEaA) con un valor de 0.45 cm/día, seguido por Agar Hoja de Anturio (PHaA) y Agar Papa Dextrosa (PDA) que estadísticamente alcanzaron similares efectos con valores promedios de 0.41 y 0.39 cm/día respectivamente; en caso del sustrato que obtuvo el menor efecto sobre el crecimiento, estuvo representado por el medio Agar Agua (AA) con un valor promedio de 0.25 cm/día (Cuadro 9 y Figura 18).



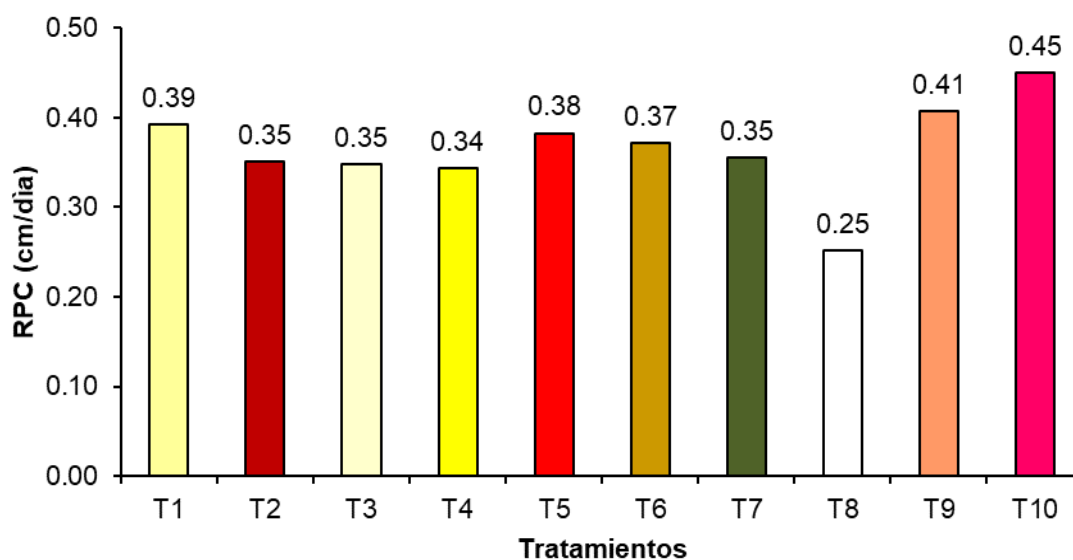
T₁ Agar Papa Dextrosa (PDA) T₃ Agar Avena Quaker (OMA) T₅ Agar Extracto de Malta (EMA) T₇ Agar Jugo Tomate (JT) T₉ Agar Hoja de Anturio (PHaA)
 T₂ Jugo V8 (V8) T₄ Agar Harina de Maíz (CMA) T₆ Agar Zanahoria (AZ) T₈ Agar Agua (AA) T₁₀ Agar Espata de Anturio (PEaA)

Figura 17. Crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* en 10 medios de cultivos.

Cuadro 9. Prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes medios de cultivo.

Trat.	Medios de cultivo	RPC (cm/día)	Sig.	Costo (1 L)	Conidias/ml
T ₁₀	Agar Espata de Anturio (PEaA)	0.45	a	10	7.47x10 ⁶
T ₉	Agar Hoja de Anturio (PHaA)	0.41	b	9.5	9.31x10 ⁵
T ₁	Agar Papa Dextrosa (PDA)	0.39	b	18.3	8.94x10 ⁶
T ₅	Agar Extracto de Malta (EMA)	0.38	bc	17.8	0.00x10 ⁰
T ₆	Agar Zanahoria (AZ)	0.37	bc	9	0.00x10 ⁰
T ₇	Agar Jugo Tomate (JT)	0.35	c	9.2	8.04x10 ⁵
T ₂	Jugo V8 (V8)	0.35	c	9.4	5.73x10 ⁶
T ₃	Agar Avena Quaker (OMA)	0.35	c	9.1	1.52x10 ⁵
T ₄	Agar Harina de Maiz (CMA)	0.34	c	11.8	0.00x10 ⁰
T ₈	Agar Agua (AA)	0.25	d	9	6.67x10 ⁵

Promedios seguido por la misma letra no presentan diferencias significativas.



T₁: Agar Papa Dextrosa (PDA); T₆: Agar Zanahoria (AZ); T₂: Jugo V8 (V8); T₇: Agar Jugo Tomate (JT); T₃: Agar Avena Quaker (OMA); T₈: Agar Agua (AA); T₄: Agar Harina de Maiz (CMA); T₉: Agar Hoja de Anturio (PHaA); T₅: Agar Extracto de Malta (EMA); T₁₀: Agar Espata de Anturio (PEaA).

Figura 18. Ritmo promedio de crecimiento in vitro de *Pestalotiopsis guepinii* a los 10 días evaluación, cultivado en diferentes medios de cultivo.

4.2.1.3. Ecuación lineal del crecimiento micelial

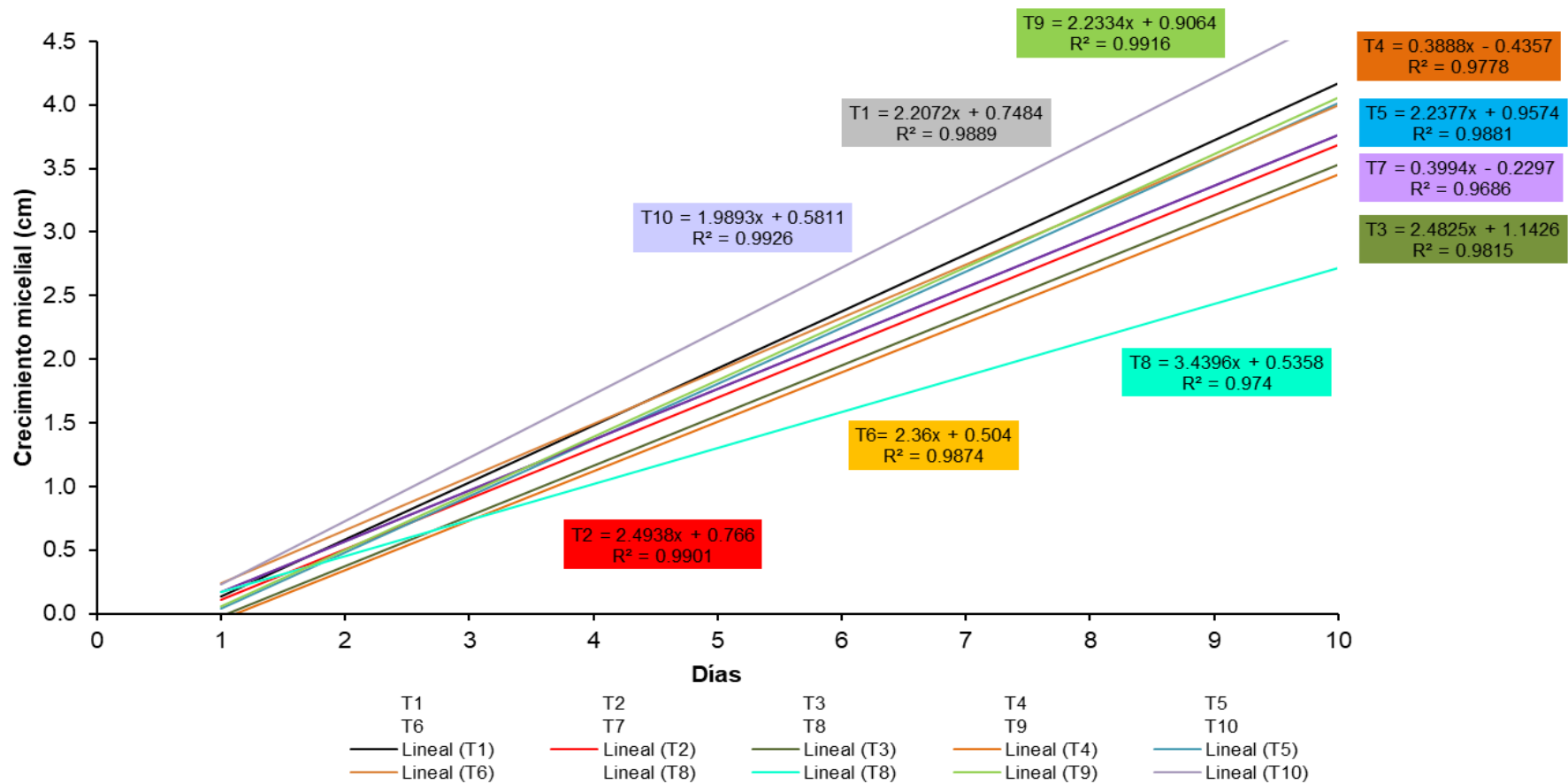
Según los resultados de los 10 días de evaluaciones diarias de los radios del crecimiento micelial del patógeno, desarrollados en los 10 medios de cultivos, de cada repetición por tratamiento (Anexo: Cuadro 27) se obtuvo el radio promedio de crecimiento micelial diario de cada tratamiento, obteniendo de esta manera el radio promedio de crecimiento micelial (r_x), el RPC de cada tratamiento (RPC_t) (Cuadro 10) que es el mismo utilizado en la prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 9) y el R^2_t (Coeficiente de regresión lineal) de cada tratamiento (Cuadro 10).

Se obtuvo la curva de crecimiento micelial del patógeno con respecto al tiempo (10 días) y la ecuación lineal en donde se resalta que el tratamiento donde se utilizó Agar Espata de Anturio (T_{10}) presentó mayor pendiente en comparación a los demás medios de cultivo, donde el modelo matemático obtenido presentaba la forma de $Y = 1.9893X + 0.5811$, donde "Y" representaba el crecimiento micelial del patógeno y "X" estuvo expresado por los días transcurridos desde la siembra, con un coeficiente de determinación (R^2) del 0.9926, con la cual se concluye que, en un 99.26% los días transcurridos desde la siembra determinan el comportamiento del crecimiento micelial del patógeno, con un pequeño porcentaje (0.74%) que refería a otros factores externos; en caso del medio Agar Hoja de Anturio (T_8), el modelo matemático presentó menor pendiente en comparación a los demás tratamientos debido a que el crecimiento micelial del patógeno fue más lento (Figura 19).

Cuadro 10. Radios de crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* en 10 medios de cultivos en 10 días de evaluación.

Días	Tratamientos									
	PDA	V8	OMA	CMA	EMA	AZ	JT	AA	PHaA	PEaA
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀
1	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3
2	0.5	0.4	0.3	0.4	0.3	0.5	0.4	0.3	0.6	0.8
3	0.9	0.7	0.7	0.5	0.8	1	0.6	0.5	0.8	1.2
4	1.4	1.3	1.1	0.8	1.3	1.5	1.2	1	1.2	1.6
5	1.9	1.7	1.4	1.5	1.8	2	1.8	1.4	1.7	2.1
6	2.5	2.2	1.9	2	2.4	2.5	2.4	1.8	2.2	2.8
7	3	2.6	2.2	2.2	2.8	2.9	2.7	2	2.7	3.3
8	3.4	3	3	2.9	3.3	3.2	3.2	2.2	3.3	4
9	3.8	3.3	3.3	3.1	3.6	3.6	3.3	2.4	3.7	4.3
10	3.9	3.5	3.5	3.4	3.8	3.7	3.5	2.5	4.1	4.5
r _x	3.9	3.5	3.5	3.4	3.8	3.7	3.5	2.5	4.1	4.5
RPC _t	0.39	0.35	0.35	0.34	0.38	0.37	0.35	0.25	0.41	0.45
R ² _t	0.9889	0.9901	0.9815	0.9778	0.9881	0.9874	0.9686	0.974	0.9916	0.9926

r_x : Radio promedio de crecimiento; RPC_t : Ritmo Promedio de Crecimiento de cada tratamiento; R²_t : Coeficiente de regresión lineal.



T₁ Agar Papa Dextrosa (PDA) T₂ Jugo V8 (V8) T₃ Agar Avena Quaker (OMA) T₄ Agar Harina de Maiz (CMA) T₅ Agar Extracto de Malta (EMA)
 T₆ Agar Zanahoria (AZ) T₇ Agar Jugo Tomate (JT) T₈ Agar Agua (AA) T₉ Agar Hoja de Anturio (PHaA) T₁₀ Agar Espata de Anturio (PEaA)

Figura 19. Ecuación lineal del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos en diferentes medios de cultivo en 10 días de evaluación.

4.2.2. Prueba del crecimiento micelial en niveles de pH

4.2.2.1. Análisis de varianza ($\alpha=0.05$)

Con los resultados obtenidos se procedió a realizar el ANVA ($\alpha=0.05$) (Cuadro 11) para el crecimiento micelial mediante el RPC, de *Pestalotiopsis guepinii* en diferentes niveles de pH en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA) (Anexo: Cuadro 29- 37), referente a los resultados obtenidos en el RPC del hongo.

Cuadro 11. Análisis de varianza ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes niveles de pH en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA).

Fuente de variación	G.L.	SC	CM	F.Cal.	F.Tab.
Tratamiento	8	0.0434	0.00542853	S	26.37
Error Experimental	81	0.0167	0.0002059		2.05
Total	89				

CV =5.71%; NS: no existe significancia estadística; S: Significancia estadística de 5% de probabilidad.

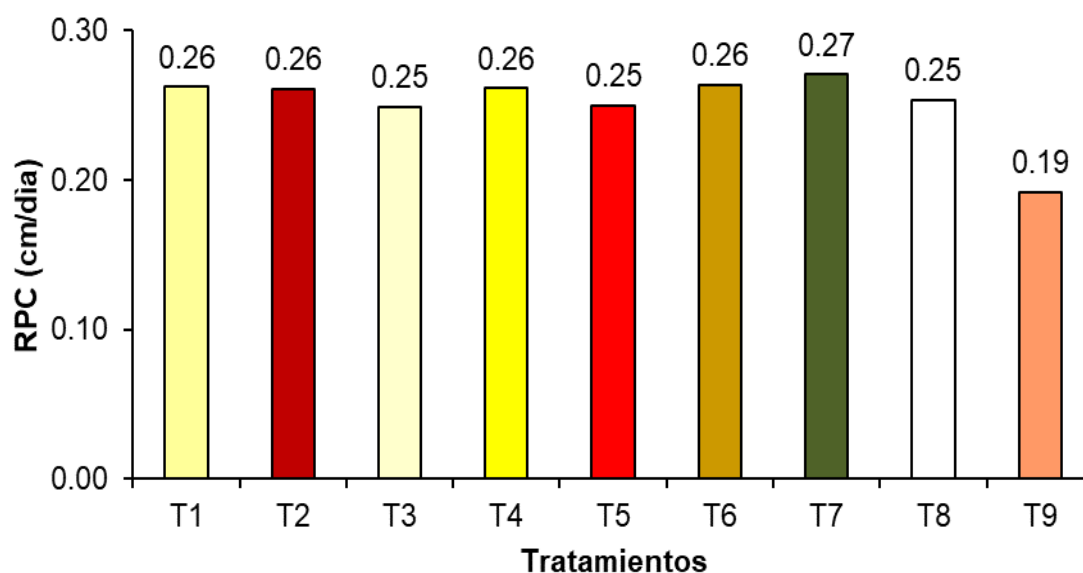
4.2.2.2. Prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$)

Al existir diferencias estadísticas significativas en el ANVA (Cuadro 11) de los tratamientos, con respecto al RPC de *Pestalotiopsis guepinii* desarrollados en diferentes niveles de pH en el medio de cultivo PEaA, se procedió a realizar la prueba de Tuckey (Cuadro 12 y Figura 20 y 21).

Cuadro 12. Prueba de Tuckey para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes niveles de pH en Agar Espata de Anturio.

Tratamiento.	Descripción	RPC (cm/día)	Sig.	Conidias/ml
T ₇	pH = 7.08	0.27	a	9.17x10 ⁵
T ₁	pH = 4.18	0.26	a	5.07x10 ⁶
T ₂	pH = 4.83	0.26	a	9.17x10 ⁶
T ₄	pH = 5.38	0.26	a	1.07x10 ⁶
T ₆	pH = 6.34	0.26	a	6.50x10 ⁶
T ₃	pH = 5.36	0.25	a	2.81x10 ⁶
T ₅	pH = 5.78	0.25	a	1.03x10 ⁷
T ₈	pH = 7.78	0.25	a	1.83x10 ⁶
T ₉	pH = 8.27	0.19	a	1.67x10 ⁵

Promedios seguidos por la misma letra no presentan diferencias significativas.



T₁: pH = 4.18; T₄: pH = 5.38; T₇: pH = 7.08; T₂: pH = 4.83; T₅: pH = 5.78; T₈: pH = 7.78; T₃: pH = 5.36; T₆: pH = 6.34; T₉: pH = 8.27.

Figura 20. Ritmo promedio de crecimiento in vitro de *Pestalotiopsis guepinii* a 10 días de evaluación, cultivado en diferentes medios de cultivo.

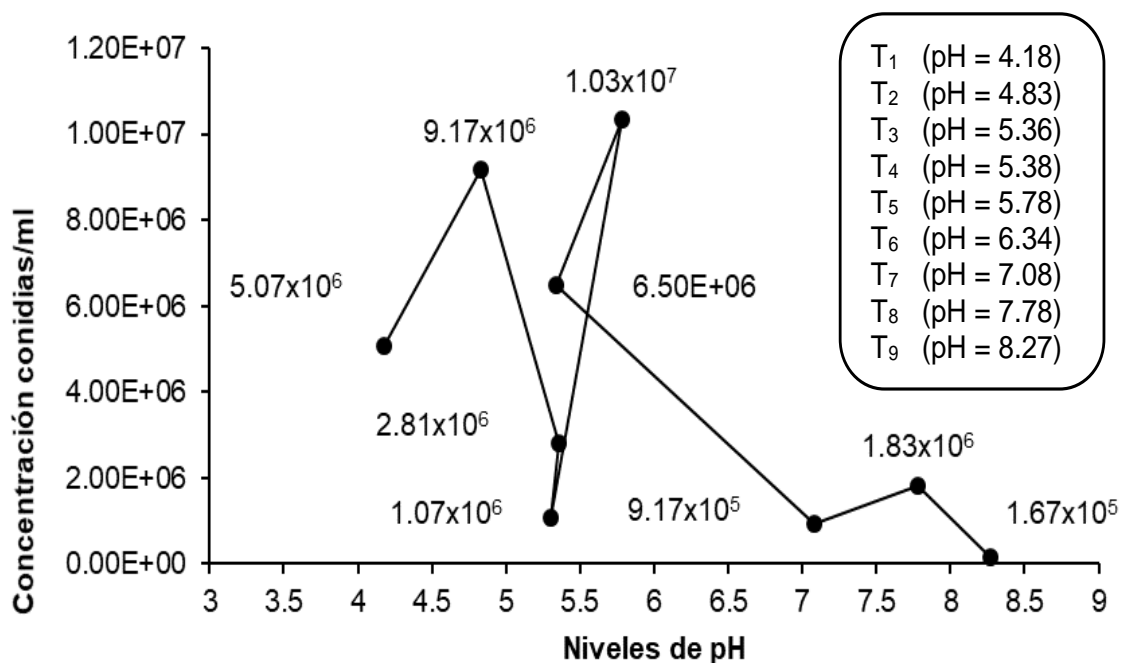


Figura 21. Desarrollo micelial de *Pestalotiopsis guepinii* cultivado en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA), en diferentes niveles de pH y producción de conidias/ml, a los 8 días de evaluación.

4.2.2.3. Ecuación lineal del crecimiento micelial

Según los resultados de los ocho días de evaluaciones diarias de los radios del crecimiento micelial del patógeno, desarrollados en diferentes niveles de pH en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA), de cada repetición por tratamiento (Anexo: Cuadro 38), se obtuvo el radio promedio de crecimiento micelial diario de cada tratamiento, obteniendo de esta manera el radio promedio de crecimiento micelial (r_x), el RPC de cada tratamiento (RPC_t) (Cuadro 13) que es el mismo utilizado en la prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) (Cuadro 12), y el R^2_t (Coeficiente de regresión lineal) de cada tratamiento (Cuadro 13). Y se obtuvo la curva de crecimiento micelial del patógeno con respecto al tiempo (ocho días) y la ecuación lineal (Figura 22).

Cuadro 13. Radios de crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* en diferentes niveles de pH en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA) en ocho días de evaluación.

Días	Tratamientos								
	4.18 T ₁	4.83 T ₂	5.36 T ₃	5.38 T ₄	5.78 T ₅	6.34 T ₆	7.08 T ₇	7.78 T ₈	8.27 T ₉
1	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
2	0.39	0.5	0.4	0.44	0.44	0.45	0.53	0.44	0.37
3	0.66	0.59	0.66	0.74	0.72	0.74	0.8	0.7	0.61
4	0.94	0.86	0.91	1.02	0.95	1.01	1.08	0.96	0.78
5	1.23	1.14	1.21	1.3	1.33	1.17	1.3	1.2	0.96
6	1.45	1.53	1.41	1.48	1.54	1.54	1.58	1.53	1.15
7	1.77	1.88	1.71	1.78	1.78	1.81	1.87	1.73	1.34
8	2.1	2.09	1.99	2.09	2	2.11	2.17	2.03	1.54
r _x	2.1	2.1	2	2.1	2	2.1	2.2	2	1.5
RPC _t	0.26	0.26	0.25	0.26	0.25	0.26	0.27	0.25	0.19
R ² _t	0.9941	0.981	0.996	0.9973	0.9953	0.9952	0.9992	0.9976	0.9982

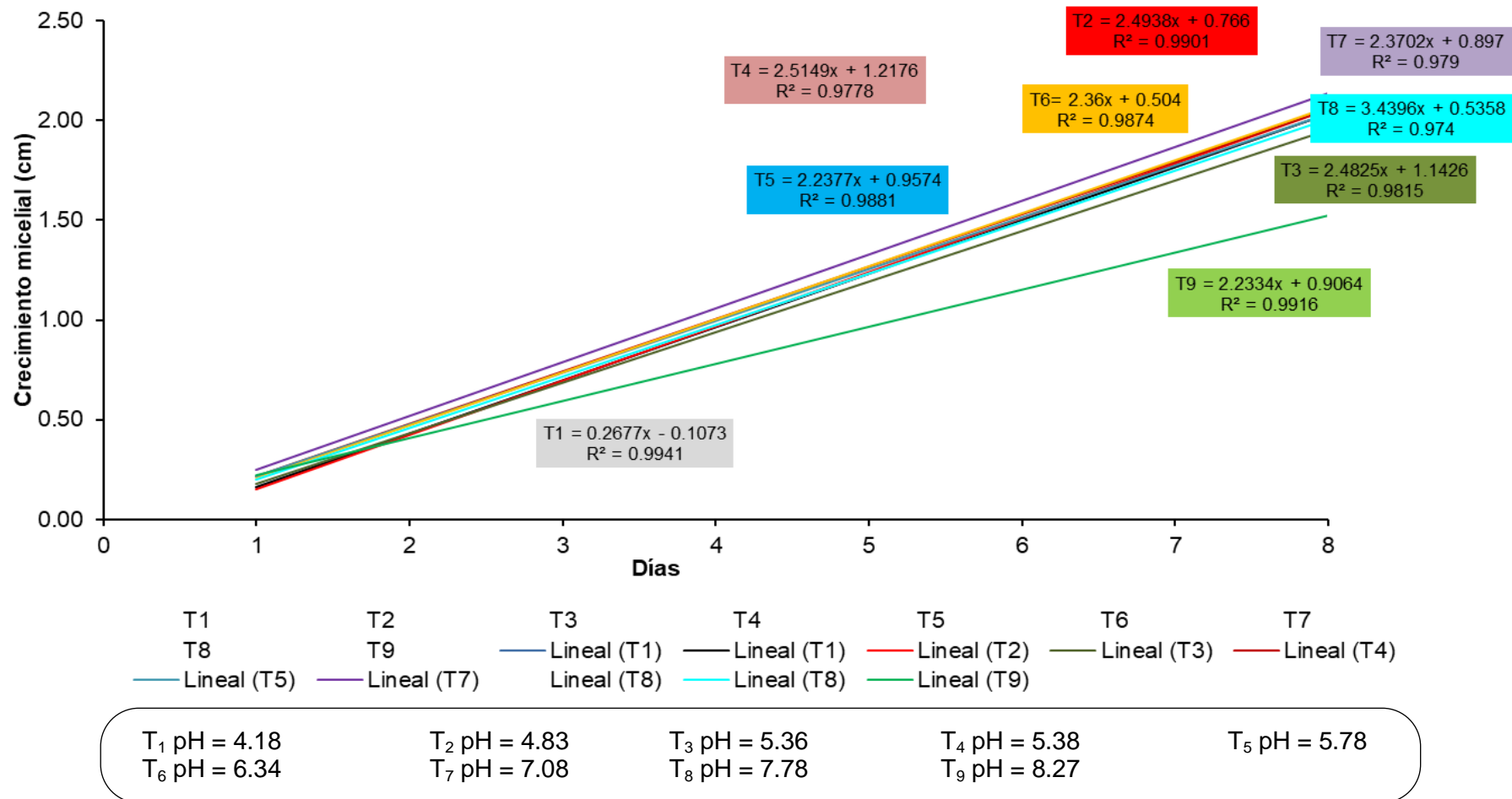


Figura 22. Ecuación lineal del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos en diferentes niveles de pH en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA) en ocho días de evaluación.

4.2.3. Prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de temperaturas.

4.2.3.1. Análisis de varianza ($\alpha=0.05$)

Con los resultados obtenidos se procedió a realizar el ANVA (Cuadro 14) para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en tres niveles de temperatura de incubación en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA) (Anexo: Cuadro 40 - 42), según los resultados obtenidos en el RPC del hongo.

Cuadro 14. Análisis de varianza para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes temperaturas de incubación en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA).

F.V.	G.L.	SC	CM	F.Cal.	F.Tab.
Tratamiento	2	1.8046	0.90228548	S 10620.00	1.98
Error Experimental	27	0.0023	8.4961E-05		
Total	29				

CV = 2.44%; NS: no existe significancia estadística; S: Significancia estadística de 5% de probabilidad.

4.2.3.2. Prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$)

Al existir diferencias estadísticas significativas en el ANVA (Cuadro 14) de los tratamientos, el mayor crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* se observó en 26.1 °C (Cuadro 15 y Figura 23 y 24).

Cuadro 15. Prueba de Tuckey ($\alpha = 0.05$) para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en diferentes medios de cultivo.

Trata.	Descripción	RPC	Sig.	Costo (1 L)	Conidias/ml
T ₂	26.1 °C	0.56	a	10.0	7.86 x10 ⁶
T ₃	30.2 °C	0.55	b	9.5	4.55x10 ⁶
T ₁	10.0 °C	0.03	c	18.3	0.00x10 ⁶

Promedios seguido por la misma letra no presentan diferencias significativas.

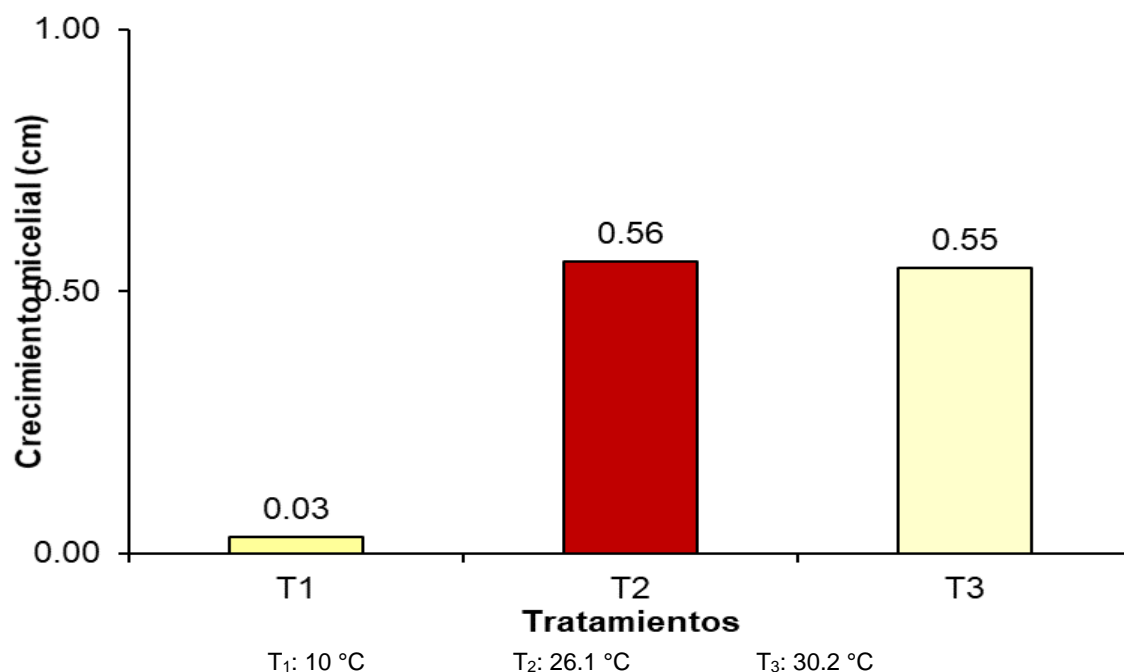


Figura 23. Ritmo promedio de crecimiento in vitro de *Pestalotiopsis guepinii* a los 10 días de evaluación, cultivado en diferentes medios.

4.2.3.3. Curva de crecimiento

La proyección teniendo en consideración las tres temperaturas consideradas en estudio generó una curva parabólica donde la parte más pronunciada se generó a una temperatura de 26.1 °C (Figura 24).

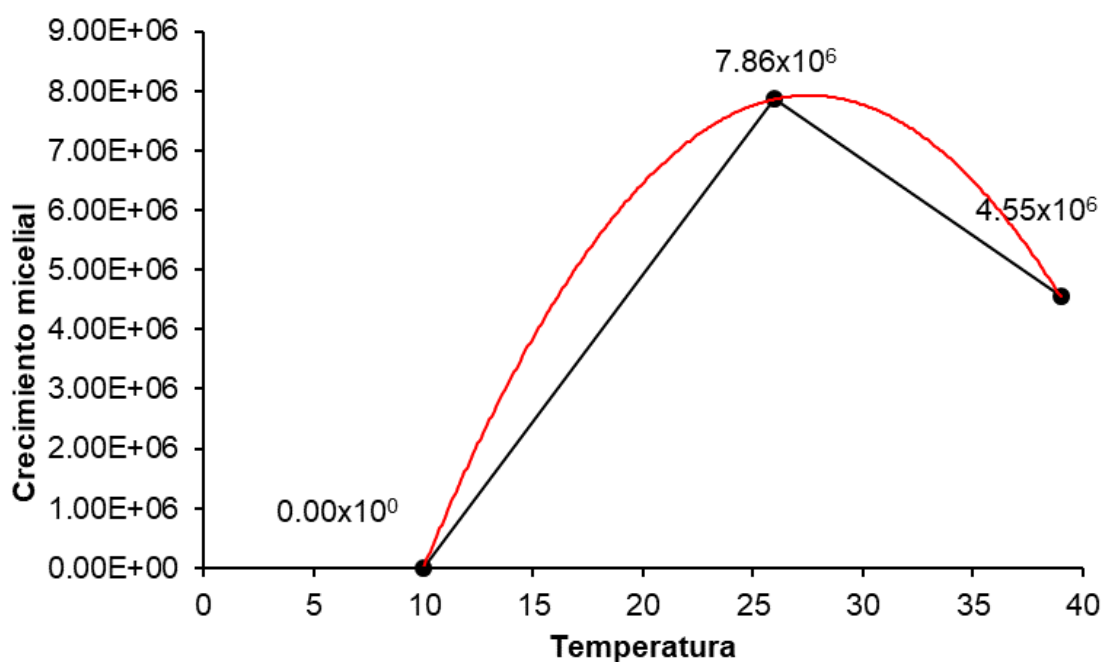


Figura 24. Desarrollo micelial de *Pestalotiopsis guepinii* cultivado en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA), en tres niveles de temperatura y producción de conidias/ml, a los 09 días de evaluación.

4.2.3.4. Ecuación lineal del crecimiento micelial

Según los resultados obtenidos para los nueve días de evaluaciones diarias de los radios del crecimiento micelial del patógeno, desarrollados en los tres niveles de temperatura en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA), de cada repetición por tratamiento (Anexo. Cuadro 43) se obtuvo el radio promedio de crecimiento micelial diario de cada tratamiento, obteniendo de esta manera el radio promedio de crecimiento micelial (r_x), el RPC de cada tratamiento (RPC_t) que es el mismo utilizado en la prueba de Tuckey a un 95% de confiabilidad y un 5% de error (Cuadro 16), y el R^2_t (coeficiente de regresión lineal) de cada tratamiento. Y se obtuvo la curva de

crecimiento micelial del patógeno con respecto al tiempo (nueve días) y la ecuación lineal (Figura 25).

Cuadro 16. Radios de crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* en tres niveles de temperatura en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA) en nueve días de evaluación.

Días	Tratamientos		
	10 °C	26.1 °C	30.2 °C
	T ₁	T ₂	T ₃
1	0.25	0.25	0.25
2	0.25	0.25	0.25
3	0.25	1.09	0.53
4	0.25	1.52	1.19
5	0.25	2.27	1.9
6	0.25	2.88	2.57
7	0.25	3.46	3.19
8	0.25	4.01	3.73
9	0.25	4.46	4.36
r _x	0.3	4	3.7
RPC _t	0.03	0.5	0.47
R ² _t	0	0.99	0.976

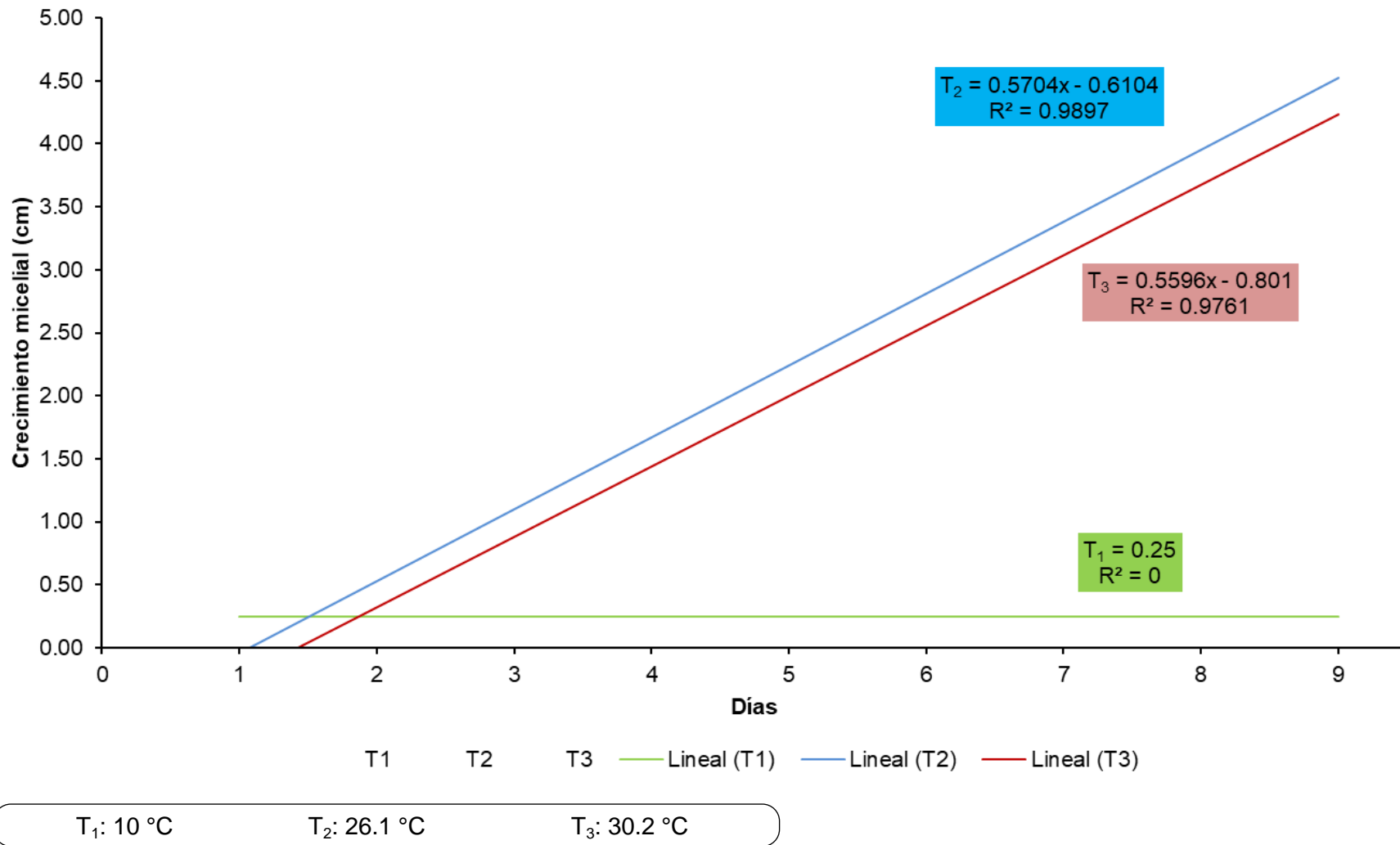


Figura 25. Ecuación lineal del crecimiento micelial (cm) de los tratamientos en estudio (medios caseros).

V. DISCUSIÓN

5.1. Aislamiento, identificación y caracterización del síntoma del agente causal de la mancha foliar

Estas características de la colonia coinciden con lo reportado por PAÉZ y RODRÍGUEZ (2014) para el desarrollo de *Pestalotia* sp. en medio PDA, sin embargo, éste manifiesta que el color de la colonia en el envés es de color salmón y complementa que la consistencia de textura seca. Además, la presencia de pequeñas gotitas de color negro brillante coincide con lo mencionado por OCHOA (2005) que señala la presencia de puntos de color negro brillante, en aislamiento de *Pestalotia* sp. en el cultivo de camu camu.

La forma de la conidia observada en el microscopio con pigmentación oscura y las células del extremo de color hialino, la conidia presentaba apéndices, coincide con lo descrito por BARNETT y HUNTER (1992) en donde manifiesta que *Pestalotia* sp. es de forma ovoide compuesta por tres o más celdas con pigmentos oscuros, pero el centro de las células es claro, con extremos puntiagudos con bigotes o apéndices al final de las células.

La presencia de acervulo en el tejido acondicionado en la cámara húmeda coincidiendo con lo reportado por BARNETT y HUNTER (1992) y SUTTON (1980) referente a la formación de acervulos por *Pestalotia* sp.

La identificación mediante las claves dicotómicas de BARNETT y HUNTER (1992) determinaron al género *Pestalotia* como el agente causal de la mancha foliar en anturio, coincide con lo reportado por PAÉZ y RODRÍGUEZ (2014) que diagnosticaron al género *Pestalotia* sp. como enfermedad en plantas de anturio en el municipio Antonio Pinto Salinas en Venezuela.

Sin embargo, la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematodología de la Universidad Nacional Agraria La Molina, identificaron la especie *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steayaert, como el agente causal de la mancha foliar en las plantas de anturio.

Debemos indicar que las claves dicotómicas de BARNETT y HUNTER (1999) no mencionan al género *Pestalotiopsis*, es por eso que PAÉZ y RODRÍGUEZ (2014) en su trabajo de investigación concluyeron a *Pestalotia* como el agente causal, porque utilizaron las claves de H. L. Barnett & Barry B. Hunter, por lo tanto, no reportan a *Pestalotiopsis*, sino a *Pestalotia* sp. como patógeno de plantas de anturio. Sin embargo autores como SUTTON (1980) en las claves dicotómicas mencionan al género *Pestalotiopsis* y otros autores, como BARRON (1968) manifestaron en 1968 que existía una controversia.

MAHARACHCHIKUMBURA *et al.* (2011) manifiesta que no está claro, si *Pestalotia* es muy distinto de *Pestalotiopsis*, además indica que la nomenclatura del género está confusa y los nombres en las bases de datos puede ser los sinónimos. Los datos moleculares todavía no han sido substancialmente aplicados para la diferenciación a nivel de especie y nombres aplicados a los datos en GenBank es dudoso, como ellos no se une a cualquier material del tipo.

En la base de datos, MYCOBANK (2016) menciona que la especie de *Pestalotiopsis guepinii* es sinónimo de *Pestalotia guepinii*, tal como se detalla a continuación: *Pestalotiopsis guepinii* \equiv *Pestalotia guepinii* Desm., Annales des Sciences Naturelles Botanique 13:182 (1840) [MB#199009]. *Pestalotia guepinii* \equiv *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert, Bulletin du Jardin Botanique de l'État à Bruxelles.

Considerando que las claves dicotómicas de BARNETT y HUNTER (1999) es únicamente para determinar el género de un hongo del grupo de hongos anamórficos y no considera la especiación de las mismas, es decir para nuestro caso se identificó el género *Pestalotia*, sin embargo al momento de obtener la especie, se utilizó claves dicotómicas de autores que consideran al género *Pestalotia* y *Pestalotiopsis* como géneros y que permiten especiar a tales hongos, además considerando los reportes de la base de datos de MYCOBANK que manifiesta la existencia de sinonimias, podemos decir que la especie que está causando las manchas foliares necróticas en hojas y espatas es *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert.

De acuerdo a los resultados obtenidos (Cuadro 7 y Figura 15), el patógeno tiene una incidencia de 100 y 55.6%, cuando es inoculado mediante tratamiento T₁ (Inoculación de rodajas de PDA con el patógeno debajo de la epidermis) y el tratamiento T₄ (Inoculación de rodajas de PDA con el patógeno sobre heridas mecánicas del tejido vegetal provocadas con el abrasivo carborudum), mientras que los demás tratamientos no se presentó la enfermedad. Asimismo, el tratamiento T₁ a los cinco días de la inoculación,

presentó más del 50% incidencias del patógeno, mientras que el tratamiento T₄ presentó más del 50% de incidencia de esta enfermedad al séptimo día de inoculación, y al séptimo día el tratamiento T₁ tuvo una incidencia del 100%.

El síntoma es del tipo preneocrótico y necrótico, de acuerdo a la clasificación descrita por AMES (1974), donde se observa manchas amarillentas el cual es un síntoma preneocrótico, es decir aquel síntoma que anteceden a la muerte celular o del tejido, tal como lo menciona AMES (1974), y manchas necróticas de color marrón a negruzco a plateado, que corresponderían a un síntoma necrótico, donde involucran muerte celular y de tejidos, tal como lo menciona AMES (1974), estas manchas necróticas muchas veces están acompañados de un halo color amarillo y plateado, debido a que las manchas amarillentas se tornan de color marrón claro, a medida que la enfermedad avanza, toma una coloración más oscura, tomando su coloración marrón a negruzco plateado, desde el centro de la mancha hacia fuera, apreciándose alrededor de la mancha un halo color amarillo y plateado

5.2. Evaluación del crecimiento del agente causal en diferentes medios de cultivos, pH y temperatura

5.2.1. Prueba del crecimiento micelial con medios semisintéticos

5.2.1.1. Análisis de varianza ($\alpha=0.05$)

Para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* (Figura 17) de los resultados obtenidos en el RPC del hongo, de acuerdo a la prueba de F

del ANVA (Cuadro 8), se encontró diferencias estadísticas significativas, esto quiere decir según CALZADA (1986) que uno o algunos de los tratamientos (medios de cultivo) influenciaron en el RPC del patógeno.

El coeficiente de variabilidad fue de 6.83%, esto significa según CALZADA (1986) que existe excelente homogeneidad en el comportamiento entre las unidades experimentales de cada uno los tratamientos, es decir desarrollo micelial de *P. guepinii* en cada uno de los medios de cultivo de un mismo tratamiento tuvieron un comportamiento de excelente homogeneidad.

5.2.1.2. Prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$)

De acuerdo a la prueba de Tuckey (Cuadro 9 y Figura 18), para el RPC de *Pestalotiopsis guepinii* desarrollados en medios de cultivo, se encontró diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento T₁₀ (PEaA=0.45) con respecto a todos los demás tratamientos, es decir el crecimiento micelial de este hongo en el medio T₁₀ (PEaA =0.45) fue superior estadísticamente, al ser desarrollado in vitro en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio, con respecto a los demás tratamientos. Sin embargo, entre los tratamientos T₉ (PHaA=0.41), T₁ (PDA=0.39), (EMA=0.38) y el T₆ (AZ=0.37) no existe diferencias estadísticas significativas, además entre los tratamientos (EMA=0.38), T₆ (AZ=0.37), T₇ (JT=0.35), T₂ (V8=0.35), T₃ (OMA=0.35) y T₄ (CMA=0.34) tampoco existió diferencias estadísticas significativas, es decir el patógeno se desarrolló en estos medios de cultivo de una manera similar. Siendo el tratamiento T₈ (AA=0.25) el que fue estadísticamente inferior a todos los tratamientos, al obtener el menor valor de RPC, con respecto a todos los tratamientos.

Según el análisis de los costos respecto a la preparación de los medios de cultivos (Cuadro 9) y Anexo: (Cuadro45 - 46), se puede observar que el medio de cultivo Agar Zanahoria T₆ (AZ) y el medio Agar Agar T₈ (AA) con 09.00 n.s por litro de medio, son los medios de menor costo, sin embargo no son los medios indicados, debido a que el medio T₆ (AZ) al término de la evaluación se obtuvo 0.0 conidias/ml y el medio T₈ (AA) con respecto al RPC fue estadísticamente inferior a todos los tratamientos con un RPC de 0.25 cm/día (Cuadro 9).

En cambio el medio T₁₀ (PEaA) fue estadísticamente superior a los demás tratamientos obteniendo un costo de 10.0 n.s. por litro y con 7.47×10^6 conidias/ml, el tratamiento T₁₀ (PHaA) podría ser otra opción por tener un costo de preparación de 9.5 n.s. por litro, sin embargo no fue estadísticamente similar o superior al T₁₀ (PEaA) y obtuvo 9.31×10^5 conidias/ml menor que el tratamiento T₁₀ (PEaA), el tratamiento T₁ (PDA) también fue descartado por tener un costo muy elevado de preparación 18.3 n.s. por litro y ser estadísticamente inferior al tratamiento T₁₀ (PEaA), a pesar que obtuvo 8.94×10^6 conidias/ml es decir obtuvo más conidias por mililitro que el tratamiento T₁₀ (PEaA) y el tratamiento (EMA) fue descartado por tres las razones, por ser inferior estadísticamente T₁₀ (PEaA), costo elevado de elaboración del medio con 17.8 n.s. por litro y por no obtener resultados en la producción de conidias con 0.0 conidias/ml. Por lo tanto se recomendaría el tratamiento T₁₀ (PEaA) para el aislamiento, por obtener un mejor RPC, costo deseable de preparación y producción de conidias, con la finalidad se realizar estudios posteriores in vitro como pruebas de: fungicidas, extractos vegetales, temperatura, pH y otros.

5.2.1.3. Curva de crecimiento

El R^2_t (Coeficiente de regresión lineal) de cada tratamiento (Cuadro 10), el cual fue mayor de 0.9 en cada uno de los tratamientos, lo que indica que los datos obtenidos tienen un comportamiento muy aceptable y uniforme.

En la curva de crecimiento micelial del patógeno con respecto al tiempo (10 días) y la ecuación lineal (Figura 19), se obtuvo para todos los tratamientos un coeficiente de determinación " R^2 " o coeficiente de correlación " r " superior a 0.9 (Figura 18), es decir cercanos a la unidad, estos valores de los coeficientes de correlación estaría confirmando que la ecuación lineal de primer grado nos permitirá explicar desarrollo *Pestalotiopsis guepinii* en cada uno de los medios de cultivo, tal como lo indica GUTIÉRREZ y DE LA VARRA (2012), que el R^2 mide la proporción de la variabilidad en los datos (Y) que explica por el modelo de regresión.

Esto estaría confirmando que la ecuación lineal de primer grado nos permitirá explicar el crecimiento micelial del patógeno, en cada uno de los medios de cultivos que fueron estudiados, de una manera muy fácil y sencilla.

5.2.2. Prueba del crecimiento micelial en niveles de pH

5.2.2.1. Análisis de varianza ($\alpha=0.05$)

Para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii* en diferentes niveles de pH en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA), de acuerdo a la prueba de F del ANVA (Cuadro 11), se encontró diferencias estadísticas

significativas, esto quiere decir según CALZADA (1986) que uno o algunos de los tratamientos (medios de cultivo con diferentes niveles de pH) influenciaron en el RPC del patógeno

El coeficiente de variabilidad fue de 5.71%, esto significa según CALZADA (1986) que existe excelente homogeneidad en el comportamiento entre las unidades experimentales de cada uno los tratamientos, es decir desarrollo micelial de *P. guepinii* en el medio de cultivo PEaA con diferentes niveles de pH, de un mismo tratamiento tuvieron un comportamiento de excelente homogeneidad.

5.2.2.2. Prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$)

De acuerdo a la prueba de Tuckey (Cuadro 12 y Figura 20), para el RPC de *Pestalotiopsis guepinii* desarrollados en diferentes niveles de pH en el medio PEaA, no se encontró diferencias estadísticas significativas entre todos los tratamientos, es decir el crecimiento micelial de este hongo en diferentes niveles de pH fue similar estadísticamente en todos los tratamientos, al ser desarrollado in vitro en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio. Siendo el tratamiento T₉ (pH=8.27), numéricamente inferior a todos los tratamientos, al obtener el menor valor de RPC con 0.19 cm/día, con respecto a todos los tratamientos. En tal sentido podemos deducir que el hongo puede desarrollarse en pH ácidos y alcalinos que varían entre los rangos de 4.18 a 8.17 de pH.

Con respecto al número de conidias por mililitro se muestran resultados muy variables (Cuadro 12 y Figura 21) los cuales al parecer la

producción de conidias no estarían determinado por el pH sino por otros factores externos, donde el tratamiento (pH=5.78) fue numéricamente superior al obtener 1.03×10^7 conidias/ml con respecto a los demás tratamientos, siendo numéricamente inferior el tratamiento T₉ (pH=8.27) con 1.67×10^5 conidias/ml, los resultados variables (Figura 21) pueden deberse a diferentes factores, como número de repeticiones para realizar el conteo de conidias, lugar de muestreo de las conidias con el sacabocado y otros, por lo que se necesitaría realizar estudios más profundos para determinar la correlación entre el pH y la producción de conidias/mililitro.

Sin embargo, podemos deducir de acuerdo a nuestros resultados obtenidos, que en los niveles de pH evaluados del hongo *P. guepinii* se está desarrollándose en el medio de cultivo PEaA, así mismo está produciendo conidias entre los rangos de pH 4.18 - 8.17, obteniendo un margen de producción desde 1.67×10^5 hasta 1.03×10^7 conidias/ml, es decir el hongo puede desarrollarse y producir sus estructuras propagativas tanto en pH ácidos y alcalinos que varían entre los rangos de 4.18 a 8.17 de pH.

5.2.2.3. Curva de crecimiento

El R^2_t (Coeficiente de regresión lineal) de cada tratamiento (Cuadro 13), fue mayor de 0.9 en cada uno de los tratamientos, lo que indica que los datos obtenidos tienen un comportamiento muy aceptable y uniforme. En la curva de crecimiento micelial del patógeno con respecto al tiempo (ocho días) y la ecuación lineal (Figura 22), se obtuvo para todos los tratamientos un coeficiente de determinación superior a 0.9 (Figura 22), es decir cercanos a la

unidad, este valor del coeficiente estaría confirmando que la ecuación lineal de primer grado permitirá explicar desarrollo *Pestalotiopsis guepinii* en cada nivel de pH en el medio de cultivo PEaA, tal como lo indica GUTIÉRREZ y DE LA VARRA (2012), que el R^2 mide la proporción de la variabilidad en los datos (Y) que explica por el modelo de regresión. Para nuestro caso los valores de R^2 de 0.9941, 0.9810, 0.9960, 0.9973, 0.9953, 0.9952, 0.9992, 0.9976 y 0.9982 para los niveles de pH de 4.18, 4.83, 5.36, 5.38, 5.78, 6.34, 7.08, 7.78 y 8.27 respectivamente, estarían indicando que el 99.41, 98.10, 99.60, 99.73, 99.53, 99.52, 99.92, 99.76 y 99.82% de la variación observada para el crecimiento micelial de *P: guepinii* en diferentes niveles de pH, es explicado por el modelo. Así mismo GUTIÉRREZ y DE LA VARRA (2012), indican que los valores de “r” cercanos “1” tiene una relación lineal positiva fuerte. Es importante notar que solo en el caso particular en el modelo de la línea recta existe una relación directa entre r y R^2 , es decir $R^2 = r^2$. Esto estaría confirmando que la ecuación lineal de primer grado permitirá explicar el crecimiento micelial del patógeno en cada uno de los niveles de pH que fue estudiado, en el medio de cultivo PEaA, de una manera muy fácil y sencilla.

5.2.3. Prueba del crecimiento micelial en diferentes niveles de temperaturas

5.2.3.1. Análisis de varianza ($\alpha=0.05$)

Para el crecimiento micelial de *Pestalotiopsis guepinii*, en tres niveles de temperatura de incubación en el medio Agar Espata de Anturio (PEaA), de acuerdo a la prueba de F del ANVA (Cuadro 14), se encontró

diferencias estadísticas significativas, esto quiere decir según CALZADA (1986) que uno o algunos de los tratamientos (diferentes temperaturas de incubación) influenciaron en el RPC del patógeno.

El coeficiente de variabilidad fue de 2.44%, esto significa según CALZADA (1986) que existe excelente homogeneidad en el comportamiento entre las unidades experimentales de cada uno los tratamientos, es decir desarrollo micelial de *P. guepinii* en el medio de cultivo PEaA con diferentes temperaturas de incubación de un mismo tratamiento tuvieron un comportamiento de excelente homogeneidad.

5.2.3.2. Prueba de Tuckey ($\alpha=0.05$)

De acuerdo a la prueba de Tuckey($\alpha = 0.05$) (Cuadro 15 y Figura 23), para el RPC de *Pestalotiopsis guepinii* desarrollados en diferentes niveles de temperatura en el medio de cultivo PEaA, se encontró diferencias estadísticas significativas, entre el tratamiento T₂ (26.1 °C) con un RPC de 0.56 cm/día y el resto de los tratamientos, es decir el crecimiento micelial de este hongo a la temperatura de 26.1 °C fue superior estadísticamente a todos los demás tratamientos, al ser desarrollado in vitro en el medio de cultivo Agar Espata de Anturio. Siendo el tratamiento T₁ (10 °C), estadísticamente inferior a todos los tratamientos, al obtener el menor valor de RPC con 0.03 cm/día, con respecto a todos los tratamientos, debido a que el hongo no se desarrolló y solo se consideró el radio de la rodaja medio del hongo extraído con el sacabocado que fue sembrado sobre el medio PEaA.

En tal sentido podemos deducir que el hongo se desarrolla mucho mejor a temperaturas de 26 °C que a temperaturas iguales o mayores que 30.1 °C y no se está desarrollando a temperaturas de 10 °C (Figura 20). Sin embargo, se requiera realizar estudios más profundos a diferentes niveles de temperatura como por ejemplo a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C para determinar los rangos óptimos de temperatura en que el hongo se desarrolla en toda su plenitud.

Con respecto al número de conidias por mililitro se muestran distintos resultados para los tres niveles de temperatura (Cuadro 15 y Figura 24) en la figura se observa que a la temperatura de 10 °C no existió producción de conidias, mientras que a temperaturas de 26.1 °C hubo la mayor producción de conidias por mililitro, seguido de la temperatura de 30.2 °C, dando la apariencia de la producción de conidias versus temperatura la forma de una campana (Figura 24), pero debemos señalar que el RPC a la temperatura de 10 °C fue muy inferior respecto a las temperaturas debido a que el hongo no se desarrolló, a diferencia que a la temperatura de 30.2 °C si hubo un crecimiento micelial considerable y existe producción de conidias.

Estudios más profundos, ayudarán a determinar a qué rangos de temperaturas el hongo se desarrolla de manera óptima y producir sus estructuras propagativas en mayor proporción, estas variables serán de mucha utilidad dentro en un programa de manejo integrado de la enfermedad, para la toma de decisiones de métodos de control preventivos y curativos, de la enfermedad.

5.2.3.3. Curva de crecimiento

El R^2_t (Coeficiente de regresión lineal) (Cuadro 16) de cada tratamiento, fue mayor de 0.9 en cada uno de los tratamientos, excepto el tratamiento T_1 (10 °C) que el hongo no se desarrolló, lo que indica que los datos obtenidos tienen un comportamiento muy aceptable y uniforme. En la curva de crecimiento micelial del patógeno con respecto al tiempo (nueve días) y la ecuación lineal (Figura 25), se obtuvo para todos los tratamientos un coeficiente de determinación o coeficiente de correlación superior a 0.9 (Figura 25), es decir cercanos a la unidad, este valor del coeficiente de correlación estaría confirmando que la ecuación lineal de primer grado permitirá explicar el desarrollo de *Pestalotiopsis guepinii* en cada uno de los medios de cultivo, tal como lo indica GUTIÉRREZ y DE LA VARRA (2012), que el R^2 mide la proporción de variabilidad en los datos (Y) que explica el modelo de regresión.

Para nuestro caso los valores de R^2 de 0.9897 y 0.9761 para los niveles de temperatura de 26.1 y 30.2 °C respectivamente, estarían indicando que el 98.97 y 97.61% de la variación observada para el crecimiento micelial de *P: guepinii* a las temperaturas de 26.1 y 30.2 °C, es explicado por el modelo. Así mismo GUTIÉRREZ y DE LA VARRA (2012), indican que los valores de "r" cercanos a "1" tiene una relación lineal positiva fuerte. Es importante notar que solo en el caso particular en el modelo de la línea recta de regresión existe una relación directa entre r y R^2 , es decir $R^2 = r^2$. Esto estaría confirmando que la ecuación lineal de primer grado permitirá explicar el crecimiento micelial del patógeno a las temperaturas de 26.1 y 30.2 °C que fueron estudiados.

VI. CONCLUSIONES

1. Se identificó a *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert como el causante de la mancha foliar en plantas de *Anthurium andraeanum* L. (anturio) en la zona de Tingo María.
2. Se observó síntomas del tipo preneocróticos y necróticos, como amarillamiento localizado y manchas necróticas de color marrón negruzco plateado observados en campo y en la prueba de patogenicidad.
3. *Pestalotiopsis guepinii* se desarrolló en todos los medios de cultivo, siendo el mejor medio de cultivo el Agar Espata de Anturio T₁₀ (PEaA), en los niveles de pH no se encontró diferencias en el crecimiento micelial, como en la producción de conidias y obtuvo el mejor desarrollo micelial a la temperatura de 26.1 °C, con una mayor producción de conidias/ml, a 10 °C el hongo no se desarrolla.

VII. RECOMENDACIONES

1. Seguir con los trabajos de aislamientos e identificación de otros patógenos de las plantas de anturios y otras ornamentales de interés comercial como las heliconias y orquídeas.
2. Realizar ensayos in vitro de control químico y biológico para el control de *Pestalotiopsis guepinii* en plantas de anturio.
3. Que la Universidad invierta más en el equipamiento de equipos en los laboratorios, para abrir paso al desarrollo de la investigación más sostenible de la Universidad.
4. Que se necesita estudios más profundos para determinar el crecimiento micelial del hongo en diferentes niveles de pH y temperatura para conocer a qué rangos de pH y temperaturas el hongo se desarrolla de manera óptima y produce sus estructuras propagativas en mayor proporción, para ser consideradas dentro del manejo integrado de la enfermedad.

VIII. ABSTRACT

In recent years in the zone of Tingo María, the *Anthurium* spp. “anturio” crop and the commercialization of its flowers has become more and more important and one of the problems is the presence of fungal diseases. The objective was to isolate, identify and evaluate the cause of leaf spot on *Anthurium andraeanum* L. “anturio” plants in the Tingo María zone. The samples, with symptoms of sick foliar tissue, were collected and taken to the Universidad Nacional Agraria de la Selva’s Entomopathogenic Laboratory for isolation in a culture medium and the induction of spores in a petri dish. The fungus was identified using the H. L. Barnett & Barry B. Hunter key from 1999 and the species was confirmed at the Universidad Nacional Agraria la Molina’s plant clinic. Pathogenicity, mycelial growth through semisynthetic mediums of potato dextrose agar, V8 juice, oatmeal agar, cornmeal agar, malt extract agar, carrot agar, tomato juice agar, water agar, anturio leaf agar and anturio husk agar were done. For the mycelial growth test at different pH levels, the anturio husk agar (PEaA) was used as a medium at pH levels of 4.18, 4.83, 5.36, 5.38, 5.78, 6.34, 7.08, 7.78 and 8.27. For the mycelial growth test at different temperature levels, the anturio husk agar (PEaA) was used as a medium at temperatures of 10 °C, 26.1°C and 30.2°C. The cause of the leaf spot on the anturio was *Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert, with symptoms of the necrotic and pre-necrotic types observed, such as localized yellowing and blackish silvery brown necrotic spots. The anturio husk agar (PEaA)

medium achieved the best quantitative variables by being statistically superior to the rest of the treatments (RPC 0.45 cm/day) and a production of 7.47×10^6 conidia/ml. No significant statistical differences were reached in the mycelial growth and the production of conidia at the different pH levels, with a temperature of 26.1 °C the fungus reached a RPC of 0.56 cm/day, statistically superior to the rest of the treatments, obtaining the greatest production of conidia/ml (6.67×10^6); at a temperature of 10 °C, the fungus did not develop and as a result there is no production of conidia.

Keywords: *Anthurium andraeanum* L., fungi, symptoms, mycelial, husk

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRICULTURE, FISHERIES AND FORESTRY–AUSTRALIA. 2001. Import Risk Analysis (IRA) for the Importation of Fresh Pineapple Fruit. Australia. 106 p.
- AGRIOS, G. 2002. Fitopatología. Departamento de Fitopatología de la Universidad de Massachusetts. Editorial Limusa. 7ma reimpresión de la 2 ed. 635 p.
- ÁLVAREZ, R.E., CABRERA DE A., M.G., SOSA DE C., N.T. 1998. Manchas foliares de la hortensia (*Hydrangea* sp.) en el Nordeste de la Argentina. [En línea]: Unne, (<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/agrarias/a-042.pdf>, documentos, 22 Feb. 2018).
- AMES, T. 1974. Fitopatología general. Lima, Perú, UNA - La Molina. 150 p.
- BARNET, H.L., HUNTER, B. 1992. Ilustración de géneros de hongos imperfectos. 3 ed. s.l., Infomusa. 100 p.
- BARNET, H.L., HUNTER, B. 1998. Ilustración de géneros de hongos imperfectos. 4 ed. s.l., Infomusa. 100 p.
- BARRON, G.L. 1968. The Genera of Hyphomycetes from soil. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. p. 252-251.
- BARRON, G.L. 1968. The Genera of Hyphomycetes from soil. The Williams & Wilkins Company. Baltimore. p. 252-251.

- CALZADA, J. 1986. Métodos estadísticos para la investigación. 5ed. Ed. Milagros, Lima, Perú. 673 p.
- CALZADA, J. 1986. Métodos estadísticos para la investigación. 5 ed. Milagros, Lima, Perú. 673 p.
- CHIRINOS, J. 2009. Instituto Nacional de Investigaciones agrícola. [En línea]: Inia, (http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://sian.inia.gob.ve/inia_divulga/divulga_14/rid14_chirinos_40-42.pdf, documento, 22 Feb. 2018).
- CÚNDOM, M.A., CABRERA, M.G., GUTIÉRREZ, S.A. 2008. *Pestalotiopsis guepinii*, nuevo patógeno de *Codiaeum variegatum* en Corrientes, Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. 1 p.
- ERPER, I., CELIK, H. 2011. First report of *Pestalotiopsis guepinii* on *Vaccinium corymbosum* in Turkey. 93(4): 87 p.
- FERNÁNDEZ, R.L., RIVERA, M.C., VARSALLONA, B., WRIGHT, E.R. 2015. Disease Prevalence and Symptoms Caused by *Alternaria tenuissima* and *Pestalotiopsis guepinii* on Blueberry in Entre Ríos and Buenos Aires, Argentina. American Journal of Plant Sciences. [En línea]: Scirp, (<http://www.scirp.org/journal/ajps>, documentos, 20 Mar. 2016).
- FRENCH, E.R., HEBERT, T.T. 1982. Métodos de investigación Fitopatología. 1 ed. San José, Costa Rica, IICA. 275 p.
- GONZALEZ, C.A., SELEME, F.D.V., JURI, C.M. 2002. Identificación del patógeno que causa el tizón de las coníferas en Catamarca. Congreso

- Regional de Ciencia y Tecnología NOA. Universidad Nacional de Catamarca. [En línea]: Unca, (<http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/CD%20INTERACTIVOS/NOA2002/Identificacion%20Patogeno%20Tizon.pdf>, documento, 22 Feb. 2018).
- GUTIÉRREZ, H., DE LA VARA, R. 2012. Análisis y diseño de experimentos. 3 ed. s.l., MC Graw Hill. 489 p.
- INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM (ITIS). 2018. ITIS Report, *Anthurium andraeanum* Linden Taxonomic Serial N°: 798648. [En línea]: Itis, (https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=811044#null, documento, 23 Ene. 2018).
- KARACA, G.H., ERPER, I. 2001. First report of *Pestalotiopsis guepinii* causing twig blight on hazelnut and walnut turkey. New Disease Report. Plant Pathology. 415 p.
- KRUSCHEWSKY, M.C., LUZ, M.N., BEZERRA, J.L. 2014. O gênero *Pestalotiopsis* (*ascomycota*, 'coelomycetes') no Brasil. Agrotropica, Centro de Pesquisas do Cacau. 26(2):89-98. [En línea]: Ceplac, (http://www.ceplac.gov.br/paginas/agrotropica/revistas/agrotropica_26_2.pdf, documentos, 22 Feb. 2018).
- MAHARACHCHIKUMBURA, S.S.N., GUO, L.D., CHUKEATIROTE, E., BAHKALI, A.H., HYDE, K.D. 2011. *Pestalotiopsis*: morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity. Springer. 50:167-187.

- MURGUIA, J. 1996. El cultivo de Anturios. 1 ed. San José, Costa Rica. 238 p.
- MYCOBANK. 2018a. Pestalotia. International Mycological Association (IMA). [En línea]: Mycobank, (<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=39813&Fields=All>, documentos, 23 Ene. 2018).
- MYCOBANK. 2018b. *Pestalotiopsis guepinii*. International Mycological Association (IMA). [En línea]: Mycobank, (<http://www.mycobank.org/BioloMICS.aspx?Table=Mycobank&Rec=36264&Fields=All>, documentos, 23 Ene. 2018).
- OCHOA, T.R. 2005. Patógenos foliares y radicales en el cultivo de camu camu (*Myrciaria dubia*) en Pucallpa. Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria. Estación Experimental de Pucallpa. 9 p.
- OLIVEIRA, F.D.CH., TEIXEIRA, F.J. 2012. A diversidade microbiológica da *Caatinga cearense*. Ciências Agrárias. Essentia, Sobral. 14(1):11-34.
- OLIVEIRA, F.D.CH., TEIXEIRA, F.J. 2012. A diversidade microbiológica da *Caatinga cearense*. Ciências Agrárias. Essentia, Sobral. 14(1):11-34..
- PÁES, I., RODRÍGUEZ, M. 2014. Diagnóstico de enfermedades fúngicas em el cultivo de *Anthurium* spp. en el municipio Antonio Pinto Salinas. Universidad Nacional Experimental Sur del Lago "Jesus Maria Semprum". Venezuela. 86 p.
- PROEXANT. 1996. Promoción de exportaciones agrícolas no tradicionales. s.d.t. [En línea]: Proexant, (http://www.proexant.org.ec/HT_Anturio.html, documentos, 24 Sep. 2007).

- ROMERO, M.A., VARO, R., SÁNCHEZ, M.E., TRAPERO, A. 2009. Mancha Foliar de *Pestalotiopsis* en viveros forestales. Consejería del Medio Ambiente. Universidad de Córdoba. 4 p.
- SÁNCHEZ, J.L. 2008. Etiología y control químico in vitro del agente causal de la mancha foliar en orquídea, “Orejade burro” *Oncidium cavendishianum* Bateman y “Flor de muerto” *Laelia autumnalis* Lindl. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México. [En línea]: Scribd, (<https://es.scribd.com/document/236392707/Prueba-de-Patogenicidad-en-Pestalotia>, documentos, 22 de Feb. 2018).
- SANTHA, P., MARY, C.A., DANYA, M.K. 2001. Occurrence of rotting disease in Anthurium. *Journal of Tropical Agriculture*. 39:79-79.
- SOSA, N.T., ALVAREZ, R.E., CABRERA, M.G. 2003. Ocurrencia de *Pestalotia* sp. causando lesiones necróticas en plantas de Jazmín del Cabo (*Gardenia Augusta*), en Corrientes, Argentina. Universidad Nacional del Nordeste Comunicación es Científicas y Tecnológicas. Argentina. [En línea]: Unne, (<http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/05-Agrarias/A-019.pdf>., documentos, 22 Feb. 2018).
- SUTTON, B.C. 1980. The Coelomycetes. Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stroma. Commonwealth Mycological Institute Kew. Surrey – England. p. 251-252.
- TUITE, J. 1969. Plant Pathological Methods Fungi and Bactery. Burgess Publishing Company. Minneapolis-USA. 239 p.

VAN HERK, M. 1998. Guía del cultivo del Anthurium. 1 ed. Bleiwijk – Holanda.
278 p.

WATANABE, K., DOI, Y., KOBAYASHI, T. 1998. Conidiomatal development of
Pestalotiopsis guepinii and *P. neglecta* on leaves of *Gardenia jasminoides*.
Mycoscience. 39:71-75.

ANEXOS

Apéndice 1. Medios de cultivo

Anexo A. Medio de cultivos probados en la prueba de crecimiento micelial

a. Agar Papa Dextrosa “Potato Dextrose Agar” (PDA)

Insumos:

Trozos de papa	250 g
Dextrosa	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	Enrazar a 1000 ml.

b. Agar Jugo – V8 (V8).

Insumos:

Jugo V8 (tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, espinaca, berro)	200 ml
CaCO ₃	3 g
Agar	15 g
Agua destilada	Enrazar a 1000 ml.

c. Agar Avena “Oat Meal Agar” (OMA)

Insumos:

Avena Kuaker.....	70 g
-------------------	------

Agar	15 g
Agua destilada	Enrazar a 1000 ml.

d. Agar Harina de Maiz “Corn Meal Agar” (CMA)

Insumos:

Harina de Maíz.....	60 g
Dextrosa	15 g
Peptona	15 g
Agar	15 g
Agua destilada	Enrazar a 1000 ml.

e. Agar Zanahoria “Carrot Agar” (CA)

Insumos:

Zanahoria	20 g
Agar	20 g
Agua destilada	Enrazar a 1000 ml.

f. Agar Extracto de Malta (EMA)

Insumos:

Extracto de Malta	25 g
Agar	15 g

Agua destilada Enrazar a 1000 ml.

g. Agar Hoja de Anturio (AHa)

Insumos:

Agar 15 g

Hojas de Anturios..... 100 g

Agua destilada Enrazar a 1000 ml.

h. Agar Espata de Anturio (AEa)

Insumos:

Agar 15 g

Inflorescencia de 100 g

Agua destilada Enrazar a 1000 ml

i. Agar Jugo Tomate



Insumos:

Jugo Tomate 100 g

Agar 15 g

Agua destilada Enrazar a 1000 ml.

Apéndice 2. Prueba de crecimiento micelial en diez medios de cultivo



UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA LA MOLINA
Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología
Av. La Universidad s/n - La Molina Apdo. 056 L-12
Telefax: 349-6631 rpm # 9470-14023
e-mail: clinica@lamolina.edu.pe

La Molina, 17 de Setiembre de 2015
FI-AF 343-2015 LAC 108
JFT 333

Srta.
Koily Karina Sandoval Rojas
Huánuco
Presente.

De nuestra consideración:


El resultado de la identificación de una muestra de Colonia de *Pestalotiopsis sp.* aislado de planta de *Anthurium*, procedente de Vivero Castillo Grande, Tingo María, Huánuco; es el siguiente:

- MÉTODO**
Repique a medio de cultivo PDA (Papa-Dextrosa Agar) y Agar V-8 de *Pestalotiopsis sp.* Examen macroscópico para caracterización de la colonia y examen microscópico para determinación de las características morfológicas de las estructuras fungosas formadas. Utilización de la bibliografía correspondiente para la identificación de la especie
- RESULTADOS**
Colonia afelpada de color blanco por el haz y de color salmón suave por el envés; forma abundante cantidad de acérvulos de color negro en anillos concéntricos; sobre todo en el medio PDA; colonia de borde entero y forma circular; alcanza un diámetro de 63 mm en medio PDA y 60 mm en medio Agar V-8 a los 5 días de incubación a 24°C. Hifas hialinas, tabicadas. Acérvulos de forma circular a lenticular, solitarios o gregarios de 68 µm (45 a 120 µm). Conidias, en acérvulos, abundantes y miden 32 µm (28 a 35 µm) x 7 µm (6 a 7.5 µm); emergen a la madurez formando gotitas de color negro-brillante. Conidioforos hialinos, no ramificados, muy pequeños de forma cilíndrica a obpiriforme. Conidias de forma fusoides, rectas y algunas ligeramente curvadas, formadas por cinco células; las dos células extremas son hialinas con bordes truncados y las tres células medianas son de color marrón del tipo concolor; célula apical con dos a tres (generalmente tres) apéndices tubulares hialinos y no ramificados de 23 µm de longitud (15 a 27 µm); la célula basal tiene un solo apéndice tubular, recto, corto y central de 5 µm de longitud.
Según las características observadas se ha determinado la siguiente especie:
***Pestalotiopsis guepinii* (Desm.) Steyaert**
- REFERENCIAS**
 - <http://www.mycobank.org>
 - Maharachchikumbura, S.S.N., Hyde, K.D., Groenewald, J.Z., Xu, J., and P.W. Crous. 2014. *Pestalotiopsis* revisited. *Studies in Mycology* 79: 121-186.
 - Sutton, B. C. 1980. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England, 696 p.

Nos despedimos de ustedes recordándoles que la Clínica de Diagnóstico está a su disposición para cualquier consulta.

Atentamente,

Mg. Sc. **Liliana Aragón Caballero**
ESPECIALISTA
CLÍNICA DE DIAGNOSIS



Ph.D. **Tomas Melgarejo Gutiérrez**
COORDINADOR
CLÍNICA DE DIAGNOSIS

LAC/hmg
c.c. Archivo

Figura 26. Resultados de la identificación de la Clínica de Diagnóstico de Fitopatología y Nematología de la Universidad Nacional Agraria la Molina, se identificó a *Pestalotiopsis guepinii* aislado en plantas de Anturio.

Apéndice 3. Prueba de crecimiento micelial en diez medios de cultivo

Anexo A. Registro de las evaluaciones diarias (diámetro del eje X y Y) del crecimiento micelial de los hongos.

Cuadro 17. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Papa Dextrosa, en 10 días de evaluación.

Días	Repetición Fecha	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom		
		X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
2	20/07/2014	1.1	1.1	0.9	1.1	1.0	0.9	1.0	1.2	0.8	1.1	1.1	1.0	0.9	1.5	1.5	0.6	0.9	0.9	0.7	0.9	0.7	0.51	
3	21/07/2014	1.9	1.5	1.9	1.9	1.2	1.8	1.9	2.1	1.0	1.8	1.9	1.7	2.1	2.2	2.5	0.9	1.8	1.5	0.9	1.6	0.9	0.85	
4	22/07/2014	2.1	2.1	3.0	3.0	2.7	3.1	3.0	3.0	2.8	2.7	3.1	3.0	2.9	2.9	3.0	2.9	2.2	2.3	2.9	2.9	2.9	1.39	
5	23/07/2014	3.4	3.5	4.0	4.0	3.7	4.0	4.1	3.9	3.6	3.6	4.2	4.1	3.9	3.9	4.1	4.0	3.7	3.9	4.0	4.0	4.0	1.94	
6	24/07/2014	5.0	4.5	5.2	5.2	4.7	5.1	5.2	5.3	4.7	4.8	5.6	5.2	5.1	4.9	5.3	5.2	4.9	5.0	5.1	5.2	5.1	2.53	
7	25/07/2014	5.3	5.2	6.1	6.2	5.3	5.9	6.4	6.4	5.5	5.4	6.1	6.7	6.1	6.1	6.2	6.1	5.7	6.0	6.0	6.2	6.0	2.97	
8	26/07/2014	6.3	5.9	6.9	7.2	6.0	6.9	7.0	7.0	6.2	6.2	6.8	7.1	7.2	7.0	7.3	7.2	6.9	7.0	7.2	7.0	7.2	3.41	
9	27/07/2014	6.9	6.9	7.9	8.0	6.3	7.3	7.8	7.8	7.1	6.8	7.9	7.8	7.5	7.5	7.9	7.9	7.7	7.7	7.4	8.3	7.4	3.76	
10	28/07/2014	7.3	7.3	8.3	8.1	7.5	7.7	8.0	8.0	7.5	7.2	8.0	8.0	7.8	7.8	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.0	8.3	3.92
	r _x	3.65		4.10		3.80		4.00		3.68		4.00		3.90		4.00		4.00		4.08		3.92		
	RPC	0.37		0.41		0.38		0.40		0.37		0.40		0.39		0.40		0.40		0.41		0.39		

Cuadro 18. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Jugo V8, en 10 días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.9	0.7	0.9	0.8	0.7	0.9	0.6	0.9	0.6	0.7	0.7	0.9	0.9	0.8	1.0	1.0	0.9	1.0	0.7	1.0	0.42
3	21/07/2014	1.8	1.8	1.2	1.4	1.4	1.4	1.3	1.3	1.1	1.0	1.5	1.6	1.4	1.7	1.8	1.9	1.5	1.4	1.3	1.5	0.73
4	22/07/2014	2.6	2.7	2.7	2.6	2.4	2.5	2.5	2.8	2.6	2.9	2.3	2.6	2.3	2.2	2.3	2.2	2.3	2.3	2.7	2.9	1.26
5	23/07/2014	3.1	3.3	3.5	3.5	3.4	3.4	3.4	3.5	3.4	3.7	3.5	3.5	3.1	3.7	3.1	3.0	3.5	3.2	3.7	3.7	1.71
6	24/07/2014	4.0	4.4	4.5	4.5	4.4	4.4	4.4	4.8	4.5	4.8	4.7	4.6	4.1	4.4	4.2	3.8	4.3	4.2	4.7	4.2	2.20
7	25/07/2014	4.6	4.7	5.4	5.0	4.8	4.7	5.2	5.6	5.3	5.6	5.5	5.4	4.9	5.1	4.6	4.8	5.2	5.1	5.7	5.6	2.57
8	26/07/2014	5.7	6.1	5.6	5.6	5.5	5.3	6.0	6.4	6.6	6.8	6.5	6.2	6.0	6.2	5.5	5.4	6.2	6.3	6.9	6.7	3.04
9	27/07/2014	6.5	6.2	6.0	6.0	5.9	5.9	7.0	6.8	7.3	7.3	7.2	6.9	6.5	7.0	6.6	6.2	6.5	6.6	7.1	6.9	3.31
10	28/07/2014	6.7	6.7	6.3	6.3	6.0	6.0	7.2	7.5	7.4	7.4	7.3	7.6	7.4	7.5	6.8	7.0	7.0	7.5	7.3	7.3	3.51
	r _x	3.35		3.15		3.00		3.68		3.70		3.73		3.73		3.45		3.63		3.65		3.51
	RPC	0.34		0.32		0.30		0.37		0.37		0.37		0.37		0.35		0.36		0.37		0.35

Cuadro 19. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Avena Quaker (OMA), en 10 días de evaluación.

Días	Repetición Fecha	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
		X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.7	0.7	0.6	0.6	0.9	0.9	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.9	0.6	0.9	0.6	0.6	0.9	0.9	0.6	0.7	0.33
3	21/07/2014	1.0	1.0	0.9	1.1	1.9	1.9	1.0	1.0	0.9	1.5	1.5	2.1	2.1	2.0	0.9	0.9	1.2	1.2	1.5	1.5	0.68
4	22/07/2014	1.4	1.4	1.2	1.2	2.4	2.4	1.4	1.4	1.9	2.0	3.2	3.3	3.9	3.2	1.5	1.7	1.7	1.8	2.9	2.9	1.07
5	23/07/2014	1.6	1.6	1.4	1.4	2.9	2.7	1.9	1.9	2.3	2.3	4.0	4.9	4.1	3.7	2.3	2.8	2.4	2.2	4.5	4.3	1.38
6	24/07/2014	3.6	3.2	2.3	2.2	4.0	4.4	2.2	2.5	3.6	3.6	5.7	5.3	4.9	4.6	2.9	3.0	3.2	2.9	5.7	5.4	1.88
7	25/07/2014	4.0	4.6	3.5	3.5	4.5	5.0	3.0	3.0	4.1	4.1	6.7	5.5	5.4	4.8	4.0	3.6	3.6	3.5	6.2	5.9	2.21
8	26/07/2014	5.9	6.6	4.8	4.2	6.2	6.0	4.6	4.6	5.8	5.8	8.5	6.9	6.6	6.3	5.5	5.5	5.6	5.9	7.6	7.7	3.02
9	27/07/2014	7.0	7.0	5.8	5.4	6.5	6.4	5.1	5.5	6.2	6.2	8.5	7.4	6.9	6.5	6.0	5.9	6.2	6.0	8.2	8.0	3.27
10	28/07/2014	7.4	7.1	6.0	5.5	6.6	6.7	5.7	6.4	6.3	6.6	8.5	7.6	7.2	7.3	6.8	6.7	7.0	6.7	8.4	8.5	3.48
	r _x	3.63		2.88		3.33		3.03		3.23		4.03		3.63		3.38		3.43		4.23		3.48
	RPC	0.36		0.29		0.33		0.30		0.32		0.40		0.36		0.34		0.34		0.42		0.35

Cuadro 20. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Harina de Maíz (CMA), en 10 días de evaluación.

Días	Repetición Fecha	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
		X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.7	0.6	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	0.6	0.7	0.6	0.9	0.9	0.6	0.8	0.7	0.6	0.7	0.7	0.8	0.7	0.35
3	21/07/2014	1.0	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	1.3	0.9	1.0	1.0	1.3	1.4	1.1	0.9	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	0.51
4	22/07/2014	1.5	1.5	1.3	2.0	1.4	1.3	2.3	2.3	2.2	2.3	2.2	2.0	1.3	1.4	1.4	1.3	1.4	1.2	1.2	1.2	0.82
5	23/07/2014	2.5	2.5	3.2	3.0	2.8	2.8	3.3	4.0	3.6	3.6	3.0	3.4	3.0	3.1	2.9	2.8	2.8	3.0	2.9	2.8	1.53
6	24/07/2014	3.1	3.2	3.8	3.7	3.8	3.8	5.0	4.7	4.9	4.5	3.8	3.9	4.0	3.8	4.0	3.5	3.6	3.5	3.8	4.2	1.97
7	25/07/2014	3.7	3.5	4.3	4.2	5.2	4.7	5.0	5.0	5.0	4.7	4.3	4.3	4.6	4.6	4.3	4.3	4.2	4.2	4.7	4.5	2.23
8	26/07/2014	5.2	5.0	5.6	5.8	6.0	6.3	5.3	5.3	7.0	7.1	6.0	6.0	5.1	5.7	6.3	5.9	6.1	5.8	4.9	5.1	2.89
9	27/07/2014	5.5	5.3	6.2	6.2	6.3	6.5	5.7	5.7	7.1	7.2	6.4	6.4	5.9	6.0	6.7	6.5	6.3	6.3	5.2	5.1	3.06
10	28/07/2014	6.8	6.7	6.7	6.7	6.7	6.7	6.6	6.3	7.8	7.5	6.8	6.8	6.4	6.5	7.3	7.3	7.8	7.8	5.9	6.0	3.43
r _x		3.38		3.35		3.35		3.23		3.83		3.40		3.23		3.65		3.90		2.98		3.43
RPC		0.34		0.34		0.34		0.32		0.38		0.34		0.32		0.37		0.39		0.30		0.34

Cuadro 21. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Extracto de Malta (EMA), en 10 días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.6	0.7	0.7	0.8	0.7	0.6	0.5	0.6	0.7	0.6	0.7	0.8	0.9	0.7	0.6	0.5	0.7	0.7	0.7	0.6	0.32
3	21/07/2014	1.4	1.3	1.5	1.6	1.7	1.8	1.2	1.4	1.8	1.7	1.3	1.5	1.6	1.6	1.5	1.6	1.7	1.8	1.4	1.4	0.77
4	22/07/2014	2.7	2.7	2.5	2.5	2.9	2.3	2.3	2.5	2.9	2.6	2.5	2.7	2.6	2.7	2.6	2.5	2.6	2.5	2.4	2.4	1.29
5	23/07/2014	3.7	3.7	3.4	3.5	3.9	3.3	3.3	3.6	3.9	3.7	3.7	3.9	3.6	3.8	3.5	3.5	3.8	3.6	3.5	3.3	1.81
6	24/07/2014	4.8	4.7	4.6	4.5	5.1	4.7	4.5	4.7	5.0	4.7	4.9	5.1	4.7	4.9	4.6	4.6	5.0	4.9	4.7	4.4	2.38
7	25/07/2014	5.4	5.3	5.3	5.3	5.7	5.0	5.3	5.5	5.5	5.6	5.8	6.0	5.7	5.7	5.5	5.4	5.8	5.7	5.3	5.3	2.75
8	26/07/2014	6.5	6.2	6.6	6.6	6.3	6.6	6.3	6.7	7.2	6.8	7.1	7.2	6.5	6.7	6.4	6.4	6.9	6.9	6.4	6.6	3.32
9	27/07/2014	7.0	6.7	7.3	7.2	7.4	6.9	7.0	7.0	7.7	7.7	7.6	7.7	7.0	7.4	7.3	7.0	7.0	7.0	6.9	7.0	3.60
10	28/07/2014	7.5	7.2	7.7	7.7	7.4	7.0	7.7	7.4	8.0	8.0	8.0	8.0	7.5	7.9	7.6	7.6	8.0	8.0	7.3	7.5	3.83
	r _x	3.68		3.85		3.60		3.78		4.00		4.00		3.85		3.80		4.00		3.70		3.83
	RPC	0.37		0.39		0.36		0.38		0.40		0.40		0.39		0.38		0.40		0.37		0.38

Cuadro 22. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Zanahoria (AZ), en 10 días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	1.5	0.9	1.0	1.0	1.0	1.2	0.9	1.2	1.2	0.9	0.8	1.0	1.1	1.3	1.0	1.2	1.1	1.1	1.0	1.0	0.54
3	21/07/2014	2.0	1.5	1.9	1.9	2.1	2.2	1.8	1.7	1.7	1.8	1.9	2.1	1.2	2.3	1.9	2.1	2.1	2.5	1.9	1.7	0.96
4	22/07/2014	3.0	2.9	3.1	3.1	3.2	3.2	2.6	2.5	2.8	2.8	3.0	3.0	3.2	3.1	3.0	3.1	3.2	3.1	2.1	2.1	1.45
5	23/07/2014	4.1	3.7	4.4	4.3	4.4	4.1	3.5	3.5	4.0	3.9	4.2	4.2	4.3	4.5	4.1	4.1	4.3	4.1	3.1	3.1	2.00
6	24/07/2014	4.7	4.7	5.7	5.5	5.0	5.0	4.7	4.4	5.4	4.7	5.4	5.6	5.8	6.0	5.3	5.4	5.5	5.3	3.8	3.6	2.54
7	25/07/2014	4.8	4.8	6.5	5.7	5.7	5.3	4.7	4.8	5.9	5.3	6.5	6.5	6.7	7.3	6.0	6.4	6.1	6.1	4.5	4.5	2.85
8	26/07/2014	5.6	5.7	6.7	6.4	6.7	6.0	5.9	5.9	6.2	5.9	6.8	6.8	6.9	8.0	6.2	6.9	7.3	7.2	6.0	6.0	3.23
9	27/07/2014	6.8	6.8	7.2	6.8	7.2	6.9	6.3	6.3	7.7	7.9	7.4	7.4	8.3	9.0	7.4	7.2	7.9	7.5	7.0	6.9	3.65
10	28/07/2014	6.9	6.9	7.8	6.9	7.3	7.0	6.5	6.5	7.8	8.0	7.5	7.5	8.4	9.0	7.5	7.3	8.0	7.6	7.1	7.0	3.71
	r _x	3.45		3.68		3.58		3.25		3.95		3.75		4.35		3.70		3.90		3.53		3.71
	RPC	0.35		0.37		0.36		0.33		0.40		0.38		0.44		0.37		0.39		0.35		0.37

Cuadro 23. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Jugo Tomate (JT), en 10 días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom	
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y				
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
2	20/07/2014	0.7	0.6	0.6	0.6	0.8	0.9	0.6	0.6	0.7	0.8	1.7	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	0.7	0.36
3	21/07/2014	1.0	1.0	1.2	1.2	1.2	1.2	1.5	1.5	1.4	1.4	1.3	1.2	1.4	1.0	1.0	1.3	1.4	1.5	1.6	1.6	0.65	
4	22/07/2014	1.7	1.8	2.5	2.8	2.3	2.2	2.6	2.7	2.0	2.0	2.5	2.7	2.2	2.5	2.4	2.4	3.0	3.0	2.9	2.9	1.23	
5	23/07/2014	3.1	3.0	4.6	5.4	3.5	3.2	3.6	3.5	3.0	3.0	3.3	3.2	3.5	3.8	3.2	3.2	4.0	4.0	3.9	4.0	1.80	
6	24/07/2014	4.1	4.3	5.8	5.5	5.0	4.7	5.0	4.7	4.3	4.4	4.6	4.8	4.5	4.8	4.2	4.2	5.0	5.2	5.2	5.0	2.38	
7	25/07/2014	4.9	5.1	5.8	5.0	5.3	5.2	5.7	5.2	5.1	5.2	5.5	5.4	5.5	5.6	5.2	5.2	5.7	5.8	5.4	5.4	2.68	
8	26/07/2014	6.0	6.5	5.9	6.7	6.4	6.2	6.7	6.6	6.0	6.1	6.5	6.4	7.2	6.8	6.3	6.3	6.4	6.9	5.6	5.5	3.18	
9	27/07/2014	6.7	6.7	5.9	6.7	6.8	6.7	7.3	6.8	6.4	6.4	7.0	7.0	7.4	7.3	6.8	6.8	6.5	7.3	5.7	5.7	3.35	
10	28/07/2014	6.9	7.0	6.0	7.0	7.5	7.3	7.3	7.3	6.9	6.8	7.7	7.7	7.5	7.5	7.5	7.4	7.0	7.6	6.0	6.0	3.55	
	r _x	3.48		3.25		3.70		3.65		3.43		3.85		3.75		3.73		3.65		3.00		3.55	
	RPC	0.35		0.33		0.37		0.37		0.34		0.39		0.38		0.37		0.37		0.30		0.35	

Cuadro 24. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Agua (AA), en 10 días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom		
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
2	20/07/2014	0.7	0.7	0.5	0.5	0.7	0.7	0.7	0.8	0.5	0.5	0.5	0.6	0.6	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7	0.6	0.8	0.6	0.32	
3	21/07/2014	1.4	1.4	0.8	0.7	1.0	0.9	1.1	1.0	0.8	1.0	1.0	1.0	1.3	1.2	1.1	0.9	0.9	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1	0.52
4	22/07/2014	2.4	2.4	1.5	1.6	2.0	2.1	2.4	2.3	1.9	1.9	1.9	1.9	2.1	2.1	2.4	2.1	2.1	2.2	2.4	2.2	2.4	2.2	1.05
5	23/07/2014	3.2	3.1	2.1	2.1	2.3	2.7	3.2	3.2	2.7	2.5	2.6	2.6	2.3	2.4	3.3	3.1	2.9	2.9	3.5	3.1	3.5	3.1	1.40
6	24/07/2014	3.7	3.6	2.8	2.7	3.7	3.4	4.2	3.9	3.3	3.3	3.2	3.3	3.3	3.2	4.1	4.0	4.3	3.9	3.9	3.7	3.9	3.7	1.79
7	25/07/2014	3.8	3.8	3.1	3.1	4.2	4.2	4.3	4.0	4.3	4.0	3.6	3.7	3.7	3.5	4.2	4.3	4.3	4.3	4.2	3.9	4.2	3.9	1.96
8	26/07/2014	3.8	4.5	3.5	3.2	4.9	4.6	4.8	4.6	4.9	4.9	4.2	5.0	4.2	4.3	4.6	4.5	4.6	4.4	4.7	4.7	4.7	4.7	2.22
9	27/07/2014	4.0	4.5	3.8	4.0	4.9	4.6	5.0	4.8	5.0	5.0	4.5	5.1	4.7	4.7	5.4	5.1	5.5	5.5	5.2	5.3	5.2	5.3	2.42
10	28/07/2014	5.0	4.7	4.0	4.2	5.0	4.8	5.1	4.9	5.2	5.2	4.7	5.2	4.9	4.9	5.5	5.2	5.6	5.6	5.4	5.5	5.4	5.5	2.52
	r _x	2.43		2.05		2.45		2.50		2.60		2.48		2.45		2.68		2.80		2.73		2.52		
	RPC	0.24		0.21		0.25		0.25		0.26		0.25		0.25		0.27		0.28		0.27		0.25		

Cuadro 25. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de cultivo Agar Hoja de Anturio (PHaA), en 10 días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
2	20/07/2014	0.9	1.0	1.1	0.9	1.1	1.2	1.4	0.9	1.5	1.2	1.1	1.0	1.2	1.3	1.0	1.7	1.5	1.6	1.0	1.2	0.60
3	21/07/2014	1.4	1.4	1.3	1.6	1.7	1.9	1.9	1.8	1.6	1.7	1.4	1.5	1.6	1.7	1.8	1.9	1.8	1.7	1.7	1.6	0.83
4	22/07/2014	2.4	2.3	2.4	2.4	2.7	2.9	2.7	2.7	2.7	2.6	2.4	2.4	2.3	2.3	2.7	2.4	2.2	2.1	1.9	2.0	1.21
5	23/07/2014	3.3	3.3	3.5	3.3	3.8	3.8	3.6	3.7	3.7	3.7	3.5	3.4	3.8	3.8	3.7	3.4	3.2	3.2	2.7	2.7	1.73
6	24/07/2014	4.3	4.3	4.6	4.5	4.5	4.7	4.6	4.8	4.7	4.7	4.6	4.6	4.9	4.9	4.1	4.3	4.2	4.3	3.8	3.8	2.23
7	25/07/2014	5.1	5.0	5.7	5.7	5.8	5.7	5.4	5.5	5.6	5.7	5.4	5.4	6.1	5.7	5.5	5.0	4.8	4.8	4.3	4.3	2.66
8	26/07/2014	6.3	6.2	7.1	6.9	7.2	7.1	6.9	7.1	7.0	7.1	6.9	6.8	7.1	7.0	6.6	6.3	6.0	6.0	5.6	5.6	3.32
9	27/07/2014	7.0	6.9	7.8	7.8	7.9	7.8	7.7	7.8	7.6	7.8	7.6	7.4	8.0	8.0	7.5	7.0	6.6	6.6	6.3	6.1	3.68
10	28/07/2014	7.8	8.5	8.5	8.5	8.3	8.1	8.4	8.7	8.4	8.5	8.8	8.2	8.3	8.3	7.7	7.7	7.5	7.5	7.5	7.4	4.07
	r _x	4.08		4.25		4.10		4.28		4.23		4.25		4.15		3.85		3.75		3.73		4.07
	RPC	0.41		0.43		0.41		0.43		0.42		0.43		0.42		0.39		0.38		0.37		0.41

Anexo B. Promedio de las evaluaciones diarias (diámetro del eje X y Y) del crecimiento micelial de *P. guepinii* en diez medios de cultivo, en 10 días de evaluación.

Cuadro 17. Promedio del crecimiento micelial de *P. guepinii* en diez medios de cultivo, en 10 días de evaluación.

Tratamientos	PDA	V8	OMA	CMA	EMA	AZ	JT	AA	PHaA	PEaA
Días	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄		T ₆	T ₇	T ₈	T ₉	T ₁₀
1	0.37	0.34	0.36	0.34	0.37	0.35	0.35	0.24	0.41	0.45
2	0.41	0.32	0.29	0.34	0.39	0.37	0.33	0.21	0.43	0.45
3	0.38	0.30	0.33	0.34	0.36	0.36	0.37	0.25	0.41	0.45
4	0.40	0.37	0.30	0.32	0.38	0.33	0.37	0.25	0.43	0.45
5	0.37	0.37	0.32	0.38	0.40	0.40	0.34	0.26	0.42	0.45
6	0.40	0.37	0.40	0.34	0.40	0.38	0.39	0.25	0.43	0.45
7	0.39	0.37	0.36	0.32	0.39	0.44	0.38	0.25	0.42	0.45
8	0.40	0.35	0.34	0.37	0.38	0.37	0.37	0.27	0.39	0.45
9	0.40	0.36	0.34	0.39	0.40	0.39	0.37	0.28	0.38	0.45
10	0.41	0.37	0.42	0.30	0.37	0.35	0.30	0.27	0.37	0.45
Suma	3.92	3.51	3.48	3.43	3.83	3.71	3.55	2.52	4.07	4.50
Promedio	0.39	0.35	0.35	0.34	0.38	0.37	0.35	0.25	0.41	0.45

Anexo C. Número de conidias por mililitro de *P. guepinii* en los diez medios de cultivo, al 11^{avo} día de la siembra

Cuadro 28. Número de conidias por mililitro de *P. guepinii* en los diez medios de cultivo, al 11^{avo} día de la siembra.

N°	MC	C	Conteo						Conidias x 1 ml				Fórmula	S.O.	Conidia/ml
			1 ^{ero}	G.A.	2 ^{do}	G.A.	3 ^{ero}	G.A.	1 ^{ero}	2 ^{do}	3 ^{ero}	X			
1	Agar Papa Dextrosa (PDA)	A	26	1	15	1.2	8	1.3	32	12.9	9.2	17.9	8.94E+05	10	8.94x10 ⁶
		B	37		16		16								
2	Jugo V8 (V8)	A	8	1.2	17	1.3	12	1.3	7	12.3	15.4	11.5	5.73E+05	10	5.73x10 ⁶
		B	8		15		28								
3	Agar Avena Quaker (OMA)	A	0	1.3	0	1.1	0	1.3	0	0.9	0.0	0.3	1.52E+04	10	1.52x10 ⁶
		B	0		1		0								
4	Agar Harina de Maiz (CMA)	A	0	1.4	0	1.3	0	1.3	0	0.0	0.0	0.0	0.00E+00	10	0.00x10 ⁶
		B	0		0		0								
5	Agar Extracto de Malta (EMA)	A	0	1.4	0	1.4	0	1.1	0	0.0	0.0	0.0	0.00E+00	10	0.00x10 ⁶
		B	0		0		0								
6	Agar Zanahoria (AZ)	A	0	1.4	0	1.2	0	1.3	0	0.0	0.0	0.0	0.00E+00	10	0.00x10 ⁶
		B	0		0		0								
7	Agar Jugo Tomate (JT)	A	3	1.2	6	1.4	0	1.2	1	3.6	0.0	1.6	8.04E+04	10	8.04x10 ⁶
		B	0		4		0								
8	Agar Agua (AA)	A	3	1.2	0	1.5	1	1.2	3	0.7	0.4	1.3	6.67E+04	10	6.67x10 ⁶
		B	4		2		0								
9	Agar Hoja de Anturio (PHaA)	A	0	1.2	1	1.2	2	1	1	3.8	1.0	1.9	9.31E+04	10	9.31x10 ⁵
		B	2		8		0								
10	Agar Espata de Anturio (PEaA)	A	18	1.4	49	1.3	1	1.1	11	29.2	2.7	14.3	7.17E+05	10	7.47x10 ⁶
		B	13		27		5								

Apéndice 4. Prueba de crecimiento micelial en nueve niveles de pH en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA).

Anexo A. Registro de las evaluaciones diarias (diámetro del eje X y Y) del crecimiento micelial de los hongos en nueve niveles de pH en medio de cultivo Agar Espata de Anturio (PEaA).

Cuadro 29. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 4.18, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom		
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
2	20/07/2014	0.7	0.7	0.9	0.9	0.9	0.9	0.8	0.7	0.7	0.8	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.7	0.39
3	21/07/2014	1.2	1.1	1.4	1.4	1.3	1.2	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	1.3	1.5	1.4	1.3	1.4	1.4	1.3	1.2	1.1	1.2	1.1	0.66
4	22/07/2014	1.9	1.8	1.9	1.9	1.9	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9	1.8	1.9	2.0	2.0	1.9	2.0	2.0	1.9	1.7	1.6	1.7	1.6	0.94
5	23/07/2014	2.4	2.4	2.4	2.3	2.5	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.7	2.8	2.7	2.9	2.3	2.3	2.6	2.5	2.1	2.1	1.23
6	24/07/2014	3.0	2.8	2.8	2.7	2.9	2.8	3.0	2.9	2.8	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	2.7	2.7	3.2	3.1	2.8	2.8	2.8	2.8	1.45
7	25/07/2014	3.5	3.3	3.1	3.1	3.4	3.6	3.6	3.4	3.3	3.3	4.0	4.0	3.4	3.4	3.4	3.5	4.0	4.5	3.5	3.5	3.5	3.5	1.77
8	26/07/2014	4.3	4.5	3.7	3.8	4.1	4.0	4.3	4.1	4.2	4.1	4.5	4.5	4.5	4.5	4.2	4.1	4.5	4.5	3.7	3.8	3.7	3.8	2.10
	r _x	2.20		1.88		2.03		2.10		2.08		2.25		2.25		2.08		2.25		1.88		2.10		
	RPC	0.28		0.23		0.25		0.26		0.26		0.28		0.28		0.26		0.28		0.23		0.26		

Cuadro 30. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 4.83, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom		
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
2	20/07/2014	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6	0.8	0.9	0.6	0.6	0.8	0.8	0.7	7.0	0.7	0.6	0.8	0.8	0.7	0.8	0.7	0.8	0.50
3	21/07/2014	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.2	1.3	1.2	1.2	1.2	1.0	1.2	1.2	1.2	1.1	1.2	1.1	1.2	0.59
4	22/07/2014	1.9	1.9	1.8	1.7	1.8	1.8	1.7	1.8	1.8	1.7	1.6	1.6	1.6	1.7	1.3	1.7	1.8	1.7	1.6	1.8	1.6	1.8	0.86
5	23/07/2014	2.4	2.4	2.4	2.3	2.4	2.4	2.3	2.4	2.3	2.0	2.3	2.0	2.1	2.2	2.2	2.3	2.2	2.3	2.2	2.4	2.2	2.4	1.14
6	24/07/2014	3.4	3.4	3.5	3.2	3.4	3.5	3.3	3.4	2.8	2.9	2.8	2.7	2.7	2.7	2.9	2.8	3.0	3.0	2.8	2.9	2.8	2.9	1.53
7	25/07/2014	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.9	4.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.7	3.7	3.4	3.5	3.4	3.5	1.88
8	26/07/2014	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.9	3.9	3.5	3.5	3.8	3.8	4.0	4.0	4.5	4.5	4.0	4.0	4.0	4.0	2.09
	r _x	2.25		2.25		2.25		2.25		1.95		1.75		1.90		2.00		2.25		2.00		2.09		
	RPC	0.28		0.28		0.28		0.28		0.24		0.22		0.24		0.25		0.28		0.25		0.26		

Cuadro 31. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 5.36, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom	
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.8	0.8	0.9	0.8	0.7	0.8	0.9	0.8	0.5	0.7	0.7	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.0	0.8	0.8	0.8	0.8	0.40
3	21/07/2014	1.4	1.4	1.4	1.5	1.2	1.3	1.3	1.2	1.0	1.3	1.2	1.3	1.3	1.4	1.5	1.6	1.4	1.3	1.3	1.2	1.2	0.66
4	22/07/2014	1.9	1.9	1.8	2.1	1.8	1.8	1.9	1.8	1.5	1.5	1.7	1.7	1.8	1.8	2.0	2.0	1.8	1.7	2.0	1.9	1.9	0.91
5	23/07/2014	2.5	2.5	2.5	2.5	2.4	2.4	2.4	2.4	2.2	2.2	2.2	2.4	2.4	2.5	2.5	2.5	2.5	2.3	2.5	2.4	2.4	1.21
6	24/07/2014	2.7	2.7	2.7	2.9	2.8	2.9	2.9	2.8	2.6	2.6	2.7	2.8	3.0	2.8	3.0	3.0	3.0	2.9	2.9	2.7	2.7	1.41
7	25/07/2014	3.3	3.3	3.5	3.5	3.5	3.4	3.4	3.5	3.2	3.2	3.2	3.2	3.5	3.4	3.7	3.5	3.7	3.8	3.3	3.4	3.4	1.71
8	26/07/2014	4.3	4.3	4.3	4.3	4.0	4.1	3.9	3.9	3.6	3.6	3.6	3.6	4.0	3.9	4.2	3.9	4.0	4.0	4.3	3.8	3.8	1.99
	r _x	2.15		2.15		2.03		1.95		1.80		1.80		1.98		2.03		2.00		2.03		1.99	
	RPC	0.27		0.27		0.25		0.24		0.23		0.23		0.25		0.25		0.25		0.25		0.25	

Cuadro 32. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 5.38, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom	
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	1.0	0.9	0.9	0.9	1.2	1.0	0.8	0.9	1.0	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.44
3	21/07/2014	1.6	1.7	1.6	1.6	1.7	1.6	1.4	1.4	1.6	1.5	1.3	1.3	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.4	1.4	1.4	1.4	0.74
4	22/07/2014	2.1	2.0	2.1	2.0	2.2	2.1	2.0	2.0	2.1	2.0	2.1	2.2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	1.9	1.9	1.02
5	23/07/2014	2.6	2.5	2.7	2.4	2.8	2.7	2.6	2.6	2.5	2.5	2.7	2.9	2.6	2.7	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.6	2.5	1.30
6	24/07/2014	3.0	3.0	2.9	2.9	3.0	2.9	2.9	2.8	2.9	2.8	2.9	3.0	2.9	2.9	3.0	3.0	2.7	2.8	3.4	3.5	1.48	
7	25/07/2014	3.5	3.2	3.4	3.5	3.6	3.7	3.4	3.5	3.9	3.4	3.5	3.7	3.6	3.6	3.5	3.5	3.6	3.8	3.5	3.8	1.78	
8	26/07/2014	4.0	4.2	4.2	4.1	4.1	4.2	4.1	3.9	4.3	4.1	4.2	4.2	4.5	4.5	4.3	4.2	4.1	4.0	4.1	4.3	2.09	
	r _x	2.05		2.08		2.08		2.00		2.10		2.10		2.25		2.13		2.03		2.10		2.09	
	RPC	0.26		0.26		0.26		0.25		0.26		0.26		0.28		0.27		0.25		0.26		0.26	

Cuadro 33. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 5.78, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom	
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.8	0.8	0.9	0.9	0.7	0.6	0.8	0.8	0.9	0.9	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	0.9	1.2	1.1	0.7	0.8		0.44
3	21/07/2014	1.3	1.3	1.5	1.5	1.3	1.5	1.3	1.4	1.6	1.5	1.4	1.4	1.5	1.5	1.4	1.4	1.7	1.7	1.2	1.2		0.72
4	22/07/2014	1.9	1.8	2.2	2.2	1.8	2.1	1.8	1.9	1.9	2.0	1.8	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	2.3	2.1	2.3	2.4		0.95
5	23/07/2014	2.5	2.6	2.5	2.6	2.4	2.5	2.4	2.5	2.6	2.7	2.6	2.6	3.0	3.0	2.9	2.9	2.7	2.6	2.7	2.9		1.33
6	24/07/2014	2.7	2.8	3.0	2.9	3.1	2.8	3.2	3.1	3.0	3.1	3.2	3.2	3.2	3.5	3.0	3.0	3.2	3.2	3.2	3.2		1.54
7	25/07/2014	3.6	3.5	3.4	3.6	3.4	3.3	3.4	3.5	3.7	3.7	3.7	3.8	3.5	3.8	3.5	3.5	3.6	3.6	3.6	3.6		1.78
8	26/07/2014	4.0	4.0	3.8	4.0	3.9	3.8	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.1	3.9	4.2	3.8	4.0	4.0	4.0	4.2	4.2		2.00
	r _x	2.00		1.95		1.93		2.00		2.00		2.03		2.03		1.95		2.00		2.10			2.00
	RPC	0.25		0.24		0.24		0.25		0.25		0.25		0.25		0.24		0.25		0.26			0.25

Cuadro 34. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH =6.34, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom	
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.7	0.8	0.8	0.8	1.0	1.1	0.8	0.8	1.0	1.0	1.1	1.3	0.8	0.9	0.9	0.9	0.8	0.8	0.8	0.9	0.45	
3	21/07/2014	1.4	1.2	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.4	1.6	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4	1.6	1.4	1.9	1.9	1.4	1.4	0.74	
4	22/07/2014	2.3	2.1	2.0	2.0	2.2	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.1	2.3	2.0	2.0	2.0	1.9	2.0	1.9	1.8	1.9	1.01	
5	23/07/2014	2.5	2.8	2.3	2.3	2.5	2.5	2.2	2.3	2.3	2.3	2.2	2.4	2.5	2.3	2.4	2.3	2.2	2.2	2.1	2.2	1.17	
6	24/07/2014	3.0	3.3	3.0	3.0	3.0	3.1	3.0	3.0	3.1	3.0	3.2	3.1	3.4	3.0	3.2	3.2	3.0	3.0	3.0	3.0	1.54	
7	25/07/2014	3.8	3.5	3.6	3.6	3.7	3.5	3.6	3.6	3.5	3.5	3.6	3.9	3.7	3.7	3.7	3.5	3.6	3.6	3.6	3.6	1.81	
8	26/07/2014	4.2	4.5	4.0	4.2	4.1	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.2	4.5	4.2	4.5	4.5	4.5	4.0	4.0	4.5	4.5	2.11	
	r _x	2.18		2.05		2.03		2.00		2.00		2.18		2.18		2.25		2.00		2.25		2.11	
	RPC	0.27		0.26		0.25		0.25		0.25		0.27		0.27		0.28		0.25		0.28		0.26	

Cuadro 35. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 7.08, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	1.0	1.0	1.0	1.2	1.0	1.2	0.9	0.8	0.9	0.9	1.0	1.1	1.3	1.2	1.1	1.2	1.2	1.0	1.0	1.0	0.53
3	21/07/2014	1.5	1.5	1.7	1.7	1.6	1.7	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.8	1.8	1.7	1.5	1.8	1.8	1.7	1.4	1.5	0.80
4	22/07/2014	2.0	2.0	2.3	2.3	2.1	2.2	2.0	2.0	1.9	1.9	2.1	2.2	2.4	2.2	2.1	2.3	2.4	2.4	2.1	2.3	1.08
5	23/07/2014	2.7	2.7	2.8	2.8	2.6	2.7	2.6	2.5	2.7	2.9	2.9	2.8	2.6	3.0	2.7	2.9	2.9	2.9	2.5	2.5	1.30
6	24/07/2014	3.1	3.2	3.3	3.3	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.0	3.3	3.2	3.2	3.2	3.2	3.2	3.4	3.0	3.0	3.0	1.58
7	25/07/2014	3.7	3.7	3.7	4.0	3.6	3.8	3.6	3.5	3.4	3.6	3.5	3.9	4.0	3.7	3.7	4.0	4.0	3.9	3.6	3.7	1.87
8	26/07/2014	4.0	4.0	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	3.9	4.0	4.1	4.2	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.5	4.2	4.2	2.17
	r _x	2.00		2.25		2.25		2.25		1.98		2.08		2.25		2.25		2.25		2.10		2.17
	RPC	0.25		0.28		0.28		0.28		0.25		0.26		0.28		0.28		0.28		0.26		0.27

Cuadro 36. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 7.78, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom	
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	1.0	1.0	0.9	0.8	1.0	0.9	0.9	0.8	0.9	0.8	0.8	0.7	0.9	0.9	1.0	1.0	0.9	0.8	0.7	0.8	0.8	0.44
3	21/07/2014	1.6	1.6	1.4	1.5	1.5	1.4	1.3	1.3	1.3	1.3	1.4	1.3	1.5	1.5	1.4	1.4	1.4	1.3	1.3	1.2	1.2	0.70
4	22/07/2014	2.0	2.0	1.9	1.9	1.9	1.9	2.0	1.9	1.9	1.9	1.9	1.8	2.0	2.0	1.9	1.9	1.9	1.8	1.9	1.8	1.8	0.96
5	23/07/2014	2.3	2.5	2.3	2.5	2.5	2.5	2.5	2.3	2.5	2.4	2.5	2.4	2.5	2.5	2.4	2.4	2.4	2.2	2.3	2.2	2.2	1.20
6	24/07/2014	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.1	3.0	3.1	3.0	3.0	3.1	3.3	3.0	3.2	3.0	3.0	3.0	3.0	2.9	2.9	2.9	1.53
7	25/07/2014	3.5	3.2	3.3	3.3	3.4	3.4	3.4	3.4	3.9	3.8	3.8	3.8	3.4	3.5	3.3	3.5	3.3	3.2	3.3	3.6	3.6	1.73
8	26/07/2014	4.1	4.1	4.0	4.0	4.0	4.0	3.9	3.9	4.3	4.2	4.0	4.0	4.1	4.0	4.0	4.1	4.1	4.2	4.0	4.2	4.2	2.03
	r _x	2.05		2.00		2.00		1.95		2.13		2.00		2.03		2.03		2.08		2.05		2.03	
	RPC	0.26		0.25		0.25		0.24		0.27		0.25		0.25		0.25		0.26		0.26		0.25	

Cuadro 37. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) a un pH = 8.27, en ocho días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom	
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y		
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.8	0.8	0.6	0.7	0.7	0.8	0.7	0.7	0.8	0.9	0.6	0.6	0.7	0.6	0.7	0.7	0.9	0.8	0.8	0.9	0.8	0.37
3	21/07/2014	1.3	1.3	1.0	1.1	1.1	1.0	1.3	1.2	1.3	1.3	1.0	1.1	1.2	1.2	1.3	1.2	1.3	1.4	1.3	1.4	1.3	0.61
4	22/07/2014	1.6	1.6	1.4	1.5	1.4	1.4	1.5	1.5	1.6	1.7	1.4	1.5	1.5	1.5	1.6	1.5	1.7	1.7	1.8	1.7	1.8	0.78
5	23/07/2014	2.0	2.0	1.8	1.9	1.6	1.6	1.9	1.9	2.1	2.1	1.6	1.7	1.7	1.7	2.0	2.0	2.0	2.3	2.2	2.3	2.2	0.96
6	24/07/2014	2.2	2.3	2.2	2.2	2.0	2.0	2.3	2.3	2.5	2.5	2.0	2.0	2.1	2.1	2.3	2.3	2.5	2.7	2.6	2.7	2.6	1.15
7	25/07/2014	2.8	2.7	2.5	2.5	2.2	2.2	2.5	2.5	2.8	2.8	2.5	2.5	2.9	2.9	2.7	2.7	2.9	3.0	2.9	3.0	2.9	1.34
8	26/07/2014	3.2	3.2	3.0	2.8	2.6	2.6	2.8	2.9	3.1	3.1	3.0	3.0	3.1	3.1	3.1	3.4	3.5	3.2	3.4	3.4	3.4	1.54
	r _x	1.60		1.45		1.30		1.43		1.55		1.50		1.55		1.63		1.68		1.70		1.54	
	RPC	0.20		0.18		0.16		0.18		0.19		0.19		0.19		0.20		0.21		0.21		0.19	

Anexo B. Promedio de las evaluaciones diarias (diámetro del eje X y Y) del crecimiento micelial de *P. guepinii* en nueve niveles de pH en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA), en ocho días de evaluación.

Cuadro 38. Promedio del crecimiento micelial de *P. guepinii*, en nueve niveles de pH, en el medio de Agar Espata de Anturio (PEaA) de cultivo, en 10 días de evaluación.

Tratamientos	PDA	V8	OMA	CMA	EMA	AZ	JT	AA	PHaA
Días	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄		T ₆	T ₇	T ₈	T ₉
1	0.28	0.28	0.27	0.26	0.25	0.27	0.25	0.26	0.20
2	0.23	0.28	0.27	0.26	0.24	0.26	0.28	0.25	0.18
3	0.25	0.28	0.25	0.26	0.24	0.25	0.28	0.25	0.16
4	0.26	0.28	0.24	0.25	0.25	0.25	0.28	0.24	0.18
5	0.26	0.24	0.23	0.26	0.25	0.25	0.25	0.27	0.19
6	0.28	0.22	0.23	0.26	0.25	0.27	0.26	0.25	0.19
7	0.28	0.24	0.25	0.28	0.25	0.27	0.28	0.25	0.19
8	0.26	0.25	0.25	0.27	0.24	0.28	0.28	0.25	0.20
Suma	2.11	2.08	1.98	2.10	1.98	2.11	2.16	2.02	1.50
Promedio	0.21	0.21	0.20	0.21	0.20	0.21	0.22	0.20	0.15

Cuadro 41. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* una temperatura 26.1 °C en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA), en nueve días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom		
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y			
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
2	20/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	
3	21/07/2014	1.9	2.0	2.4	2.4	1.7	2.0	2.0	2.1	2.3	2.5	2.1	2.2	1.8	2.1	2.5	2.5	2.2	2.1	2.4	2.2	2.4	2.2	1.09
4	22/07/2014	2.8	2.8	3.4	3.3	2.5	2.9	2.9	2.9	3.0	3.2	3.2	3.5	2.6	2.7	3.4	3.4	3.0	3.2	3.0	3.0	3.0	3.0	1.52
5	23/07/2014	4.3	4.3	5.0	4.8	4.0	4.4	4.3	4.4	4.5	4.7	4.7	5.0	3.8	3.5	4.9	4.9	5.0	4.8	4.7	4.7	4.7	4.7	2.27
6	24/07/2014	5.5	5.5	6.1	5.9	5.2	5.7	5.7	5.7	5.9	5.9	6.1	6.4	4.9	4.9	6.1	6.1	5.8	6.2	5.8	5.8	5.8	5.8	2.88
7	25/07/2014	6.8	6.8	7.1	7.0	6.5	6.9	6.9	6.9	7.1	7.0	7.0	7.3	6.0	6.0	7.3	7.3	7.3	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	3.46
8	26/07/2014	8.0	8.0	7.9	7.8	7.7	8.0	8.3	8.0	8.3	8.2	8.0	8.5	7.2	6.6	8.2	8.3	8.6	8.3	8.2	8.2	8.2	8.2	4.01
9	27/07/2014	9.0	9.0	9.0	9.0	8.6	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	8.6	8.3	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	9.0	4.46
	r _x	4.50		4.50		4.40		4.50		4.50		4.50		4.23		4.50		4.50		4.50		4.50		4.46
	RPC	0.45		0.45		0.44		0.45		0.45		0.45		0.42		0.45		0.45		0.45		0.45		0.45

Cuadro 42. Registro del crecimiento micelial de *P. guepinii* una temperatura 30.2 °C en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA), en nueve días de evaluación.

Días	Repetición	r ₁		r ₂		r ₃		r ₄		r ₅		r ₆		r ₇		r ₈		r ₉		r ₁₀		Prom
	Fecha	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	X	Y	
1	19/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
2	20/07/2014	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25
3	21/07/2014	1.1	1.2	1.0	1.1	1.2	1.3	0.9	1.0	1.4	1.1	1.2	1.2	0.8	0.8	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	0.53
4	22/07/2014	2.7	2.4	2.1	2.5	2.4	2.4	2.3	2.3	2.7	2.7	2.3	2.3	2.3	2.2	2.4	2.3	2.7	2.3	2.2	2.2	1.19
5	23/07/2014	4.1	3.9	3.4	3.7	3.9	3.8	3.8	3.8	4.2	4.7	3.5	3.5	3.5	3.6	3.9	3.8	3.9	3.6	3.8	3.5	1.90
6	24/07/2014	5.5	5.4	4.8	5.1	5.2	5.2	5.1	5.1	5.7	5.1	4.9	5.0	5.0	5.0	5.3	5.2	5.4	4.9	4.9	4.9	2.57
7	25/07/2014	6.7	6.7	6.0	6.3	6.4	6.4	6.4	6.4	6.9	6.5	6.2	6.3	6.4	6.4	6.6	6.4	6.6	6.0	6.0	6.1	3.19
8	26/07/2014	7.5	7.5	7.4	7.4	7.5	7.5	7.6	7.6	7.6	7.5	7.3	7.4	7.6	7.6	7.8	7.6	7.2	7.2	7.2	7.2	3.73
9	27/07/2014	8.2	8.5	8.5	8.6	8.7	8.7	8.7	8.8	9.0	9.0	8.5	8.7	8.9	8.8	8.8	8.9	9.0	8.6	8.6	8.9	4.36
	r _x	4.18		4.28		4.35		4.38		4.50		4.30		4.43		4.43		4.40		4.38		4.36
	RPC	0.42		0.43		0.44		0.44		0.45		0.43		0.44		0.44		0.44		0.44		0.44

Anexo B. Promedio de las evaluaciones diarias (diámetro del eje X y Y) del crecimiento micelial de *P. guepinii* en tres niveles de temperatura (10, 26.1 y 30.2 °C) en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA), en nueve días de evaluación.

Cuadro 43. Promedio del crecimiento micelial de *P. guepinii*, en tres niveles de temperatura (10, 26.1 y 30.2 °C) en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA), en nueve días de evaluación.

Tratamientos	10 °C	26.1 °C	30.2 °C
Días	T ₁	T ₂	T ₃
1	0.03	0.56	0.52
2	0.03	0.56	0.53
3	0.03	0.55	0.54
4	0.03	0.56	0.55
5	0.03	0.56	0.56
6	0.03	0.56	0.54
7	0.03	0.53	0.55
8	0.03	0.56	0.55
9	0.03	0.56	0.55
Suma	0.28	5.02	4.90
Promedio	0.03	0.50	0.49

Anexo C. Número de conidias por mililitro de *P. guepinii* en tres niveles de temperatura (10, 26.1 y 30.2 °C) en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA), al décimo día de la siembra.

Cuadro 44. Número de conidias por mililitro de *P. guepinii* en tres niveles de temperatura (10, 26.1 y 30.2 °C) en medio de Agar Espata de Anturio (PEaA), al décimo día de la siembra.

N°	T°	Conteo						Conidias x 1 ml				Formula	S.O.	Conidias/ml		
		C	1 ^{ero}	G.A.	2 ^{do}	G.A.	3 ^{ero}	G.A.	1 ^{ero}	2 ^{do}	3 ^{ero}				X	
1	10°C	A	0		0		0		0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.00E+00	10	0.00x10 ⁶
		B	0	1.2		0	1.3		0	0.0	0.0	0.0	0.0			
2	26°C	A	19		15		18		18	12.3	16.5	15.7	7.86E+05	10	6.67x10 ⁶	
		B	25	1.2		17	1.3		25							
3	30°C	A	15		9		16		11	6.1	10.0	9.1	4.55E+05	10	8.94x10 ⁶	
		B	12	1.2		8	1.4		12							

Cuadro 46. Reales para preparar 1 L de los medios semisintéticos.

Descripción	PDA	V8	OMA	CMA	EMA	AZ	JT	AA	PHaA	PEaA
Agar	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Dextrosa	9									
Papa	0.25									
Carbonato de Calcio		0.06								
Avena			0.084							
Harina de maíz				0.072						
Extracto de malta					8.75					
Zanahoria		0.3				0.024				
Tomate		0.45					0.05			
Hoja de anturio									0.5	1
Espata										
Berro		0.5								
Espinaca		0.5								
Perejil		0.375								
Lechuga		0.25								
Veterraca		0.5								
Apio		0.25								
Pectona				2.7						
Agua	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Total	18.3	12.2	9.1	11.8	17.8	9.0	9.1	9.0	9.5	10.0