



Universidad de San Carlos de Guatemala  
Dirección General de Investigación  
Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas

## INFORME FINAL

### EXTRACCIÓN Y FORMULACION ARTESANAL DE *Cladosporium uredinicola* BIOCONTROLADOR DE *Puccinia horiana*

#### EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

<b>Coordinador</b>	Ing. Agrónomo	Gustavo A. Alvarez Valenzuela
<b>Investigadora</b>	Inga. Agrónoma	María del Carmen Santos Bravo
<b>Auxiliar de investigación II</b>	Perito Agrónomo	Luis Fernando Centes Carrillo



Guatemala, enero de 2015.

M.Sc. Gerardo Arroyo Catalán  
Director General de Investigación

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador General de Programas

Ing. Agr. MARN Julio Rufino Salazar  
Coordinador Programa Universitario de Investigación en Ciencias Básicas  
PUICB

Ing. Agr. Gustavo Adolfo Alvarez Valenzuela  
Coordinador del proyecto.

Inga. Agra. María del Carmen Santos Bravo  
Investigadora

P. Agr. Luis Fernando Centes Carrillo  
Auxiliar de Investigación II

Partida Presupuestaria  
4.8.63.7.26  
Año de ejecución: 2014.

## CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN .....	10
2	ANTECEDENTES .....	11
3	JUSTIFICACIÓN .....	12
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	13
4.1	Descripción del problema .....	13
4.2	Definición del problema .....	13
4.3	Delimitación temporal y geográfica.....	13
5	MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE .....	14
5.1	Biocontrol.....	14
5.2	Fermentación solida .....	14
5.3	Cultivo de Crisantemo ( <i>Chrysanthemum x morifolium Ramat</i> ) .....	15
5.3.1	Antecedentes .....	15
5.4	<i>Puccinia horiana hennings</i> .....	15
5.4.1	Generalidades.....	15
5.4.2	Taxonomía .....	16
5.4.3	Sintomatología .....	16
5.4.4	Ecología y Epidemiología .....	17
5.5	<i>Cladosporium uredinicola</i> .....	17
6	OBJETIVOS .....	18
6.1	General.....	18
6.2	Específicos .....	18
7	Hipótesis.....	18
8	MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
8.1	Descripción de la ubicación geográfica.....	19
8.2	Período de la investigación.....	19
8.3	Bioprospección de cepas.....	19
8.4	Aislamiento inicial de <i>C. uredinicola</i> .....	21
8.5	Cultivos monosporicos en PDA .....	21

8.5.1	Variables Respuesta .....	22
8.6	Preparación y evaluación de sustratos de crecimiento masivo.....	23
8.6.1	Suspensión de esporas:.....	24
8.7	Procedimiento experimental .....	25
8.8	Control de calidad para formulaciones biológicas.....	28
8.8.1	Germinación de esporas .....	28
8.8.2	Definición de variables .....	28
8.9	Aplicación en campo.....	28
8.10	Tipos y formas de análisis de las variables.....	29
8.11	Metodología de análisis de la información .....	29
9	RESULTADOS .....	30
9.1	Obtención de la Cepa .....	30
9.1.1	Evaluación del índice velocidad crecimiento micelial IVCM .....	30
9.2	Medio óptimo para el crecimiento de <i>Cladosporium uredinicola</i> .....	33
9.2.1	Germinación a las 24 horas de conidios. ....	36
9.3	Matriz de Resultados .....	37
10	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	41
11	ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN .....	43
12	CONCLUSIONES .....	44
13	RECOMENDACIONES .....	45
14	BIBLIOGRAFÍA .....	46
15	ANEXOS .....	48

## INDICE DE ILUSTRACIONES

### INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Pústulas de roya blanca <i>Pucciana horiana</i> , sobre hoja de crisantemo. .....	16
Figura 2. Comparación de hojas de Crisantemo A. Presencia de roya blanca <i>P. horiana</i> , se observa la severidad del daño y la coloración blanca. B. Pústulas de <i>P. horiana</i> con presencia del hiperparásito <i>C. uredinicola</i> , se observa la coloración grisácea sobre las pústulas blancas de <i>P. horiana</i> . C: Pústula de <i>P. horiana</i> sana observada con ayuda de estereoscopio. D: Pústula de <i>P. horiana</i> parasitada por <i>C. uredinicola</i> observada con ayuda de estereoscopio. E: Corte transversal de pústula sana de <i>P. horiana</i> . F: Corte transversal de pustula parasitada de <i>P. horiana</i> . G: Teliospora sana de <i>P. horiana</i> . H: Estructuras del hiperparásito <i>C. uredinicola</i> . .....	20
Figura 3. Crecimiento de <i>C. uredinicola</i> a las 48 horas de realizada la siembra en medio agar- agua al 3%. .....	21
Figura 4. Diferentes etapas de crecimiento de <i>C. uredinicola</i> , en medio de cultivo PDA. A. Vista trasera de <i>C. uredinicola</i> a los dos días de germinado. B: Vista trasera de <i>C. uredinicola</i> a los cinco días germinado. C. Vista frontal de <i>C. uredinicola</i> Crecimiento a los 5 días de realizada la siembra. D. Crecimiento y características macroscópicas a los 30 días de realizada la siembra. ....	22
Figura 5: Descripción pictográfica de toma de mediciones para el diámetro de <i>Cladosporium uredinicola</i> . .....	23
Figura 6. Procedimiento empleado para obtener suspensión de esporas de <i>C. uredinicola</i> del aislado en medio PDA. ....	24
Figura 7. Bolsas preparadas con sustrato (arroz pre-cocido), A. Se observa que dentro de la bolsa se encuentra una considerable cantidad de agua, despedida por el grano. B. Agua dentro de la bolsa se observa densa y con un leve color amarillo (vista de cerca). .....	25
Figura 8. Sustrato inoculado y con crecimiento de <i>C. uredinicola</i> , el círculo rojo resalta el cambio observado en la textura y coloración del grano donde no se observa crecimiento de <i>C. uredinicola</i> . .....	26
Figura 9. Proceso de preparación de bolsas con sustratos. A. En la fotografía se observa beaker conteniendo arroz luego de esterilizar, corresponde a la fase 1. B. Bolsas preparadas con los sustratos: maíz, arroz pre-cocido y arroz. Después de ser autoclaveadas, corresponde a la fase 2. ....	27
Figura 10. Mapa de ubicación de los puntos donde se tomaron las cepas para el .....	32

Figura 11. Resultados del análisis estadístico realizado para evaluar el índice velocidad de crecimiento micelial de las cepas colectadas. .... 33

Figura 12: Análisis de Varianza y de Tukey efectuados para producción de conidios..... 34

Figura 13: Análisis de varianza de germinación a las 18 horas. .... 35

Figura 14: Análisis de varianza de germinación a las 24 horas de inoculado... 36

**INDICE DE TABLAS**

Tabla 1. Detalle de las lecturas realizadas a las cepas aisladas de C..... 31

# EXTRACCION Y FORMULACION ARTESANAL DE *Cladosporium uredinicola* BIOCONTROLADOR DE *Puccinia horiana*

## RESUMEN

La roya blanca *Puccinia horiana* P. Hennings (Basidiomycota: Uredinales), patógeno de *Chrysanthemum x morifolium* Ramat. (pro sp). (Eudicotiledonea: Asteraceae: Asterales), es una plaga de orden cuarentenario.

Durante los años 2012 y 2013 se han desarrollado estudios de Bioprospección para la detección de los agentes hiperparásitos *Sphaerellosis filum* y *Ampelomyces quisqualis*, durante dichas prospecciones se detectó la presencia de *Cladosporium* sp, (posiblemente *C. uredinicola*) sobre *P. horiana* en algunas localidades de San Juan Sacatepéquez y se observó la eficacia como agente biocontrolador.

En base a lo anterior se desarrolló la presente investigación con el objeto de extraer una cepa virulenta, aislarla y cultivarla en forma masiva en sustratos económicos para formular un fungicida eficiente, amigable con el ambiente y de bajo costo para los agricultores de la zona.

De tres cepas provenientes de diferentes sitios de muestreo, Camino a las Trojes (cepa 99), sector 2 Ojo de Agua (cepa 100), y camino a San Pedro (cepa 101), la cepa 99, proveniente de la aldea Camino a Las Trojes presento diferencia significativa en cuanto al índice velocidad de crecimiento micelial, (valor  $p$  0.0001) por lo que se considero altamente virulenta y de fácil crecimiento en medios simples.

La cepa se hizo crecer sobre varios sustratos que fueron: arroz blanco, arroz precocido y maíz quebrado, el mejor sustrato para el crecimiento de *C. uredinicola* fue maíz quebrado, se evaluó además la cantidad máxima de sustrato en crecimiento, el conteo de conidios se realizo en los tres sustratos a los, 8, 12 y 16 días. La cantidad de sustrato mas eficiente fue cuando se trabaja con bajas cantidades de sustrato, en este caso el peso de 100 gr de sustrato fue el que se seleccionó debido a menor contaminación y fácil manejo, además de obtener crecimiento uniforme. En cuanto al periodo de incubación en el sustrato seleccionado, según el análisis estadístico realizado a los 8, 12 y 16 días existe diferencia significativa (valor  $p$  0.0027) en cuanto a la densidad de conidios, para los 12 y 16 los valores son similares, en comparación a los 8 días que presenta menor concentración.

Con el sustrato seleccionado se inicio la producción de inculo en bolsas de nylon de 100 gr, Se realizo una prueba de campo con cuatro concentraciones de conidias por un periodo de 40 días, las aplicaciones se realizaron a los 0, 8, 12, 16 y 32 Días Después del Trasplante. De acuerdo a la variables de incidencia y severidad no se observaron diferencias con entre tratamientos y el testigo del agricultor.

En base a los resultados obtenidos se concluye que la cepa proveniente de la Aldea Camino a Las Trojes tiene mayor potencial de virulencia, que dicha cepa puede desarrollarse sobre maíz quebrado y que la cantidad óptima para la propagación masiva en medios artesanales son de 100 gr de sustrato en bolsas de nylon transparente. Es necesario evaluar la densidad de inóculo por área para establecer la dosis de campo.

Palabras Clave: Crisantemo, Roya Blanca, Hiperparásitos, Biocontroladores



## ABSTRACT

The white rust *Puccinia horiana* P. Hennings (Basidiomycota: Uredinales), pathogen *Chrysanthemum x morifolium* Ramat. (pro sp). (Eudicotiledonea: Asteraceae: Asterales), is a pest of quarantine order, originally from Japan, arrived in Europe in the 60 subsequently detected in Mexico and the US in the late 70s. USDA 2013. In Guatemala there is no record of its appearance, however in 2007-2008 is reported to *P. horiana*, as one of the major diseases of the crop in the Municipality of San Juan Sacatepequez, one of the regions of chrysanthemum greater productivity which is based on family income in the area. (Mejía 2008, Ramirez 2009).

In the years 2012 and 2013 were developed Bioprospecting studies for the detection of agents Sphaerellosis hyperparasites phylum and *Ampelomyces quisqualis* during these surveys the presence of *Cladosporium* sp was detected (possibly *C. uredinicola*) on *P. horiana* in some localities San Juan Sacatepequez and effectiveness as a biocontrol agent based on the above noted this research was developed with the aim of extracting a virulent strain, isolate and grow massively in economic substrates to formulate an effective fungicide, environmentally friendly and inexpensive for area farmers.

Three strains from different sampling sites, strain 99, proveniente Village Road to Las Trojes present significant difference in the rate of mycelial growth rate, so it was considered highly virulent and simple means easy growth.

The strain was grown on various substrates were: white rice, pre-cooked rice and corn broken, the better substrate for the growth of *C. uredinicola* was cracked corn, were also evaluated the maximum growth substrate, the count conidia was performed on the three substrates to 8, 12 and 16 days. The amount of substrate was more efficient when working with low amounts of substrate, in this case the weight of the substrate was 100 g which was selected due to less contamination and easy handling, in addition to obtaining a uniform growth. As the incubation period in the selected substrate, the statistical analysis according to the 8, 12 and 16 days there was a significant difference in the density of conidia, for the values 12 and 16 are similar, in comparison to the 8 days with the lowest concentration.

With the selected substrate production of inoculum in nylon bags 100 gr began, a field test was conducted with four concentrations of conidia for a period of 40 days, the applications were performed at 0, 8, 12, 16 and 32 days after transplantation. According to the incidence and severity variables, no differences were observed between treatments and the control of the farmer

Based on the results obtained showed that the strain from Village Road to Las Trojes has greater potential virulence, said strain can grow on cracked corn and the optimum amount for mass propagation in craft media are 100g substrate in transparent plastic bags.

Keywords: *Chrysanthemum*, *Puccinia horiana*, White rust, *Cladosporium uredinicola*, hyperparasites, biocontrol,

## 1 INTRODUCCIÓN

La roya blanca *Puccinia horiana* P. Hennings (Basidiomycota: Uredinales), según la North American Plant Organization (2007), lo describe como un patógeno de *Chrysanthemum x morifolium* Ramat. (pro sp). (USDA 2013). (Eudicotiledonea: Asteraceae: Asterales). Es una plaga de orden cuarentenario, originaria de Japón, llegó a Europa en los 60's posteriormente detectada en México y EEUU a finales de los 70's. En Guatemala no se tiene registro de su aparición, sin embargo en el periodo 2007-2008 se reporta a *P. horiana*, como una de las principales enfermedades (Mejía 2008, Ramírez 2009). Alcanzando un 90% de incidencia sobre el cultivo en el Municipio de San Juan Sacatepéquez, reduciendo drásticamente la producción, al cultivo base de economía familiar en el área.

La roya blanca, *Puccinia horiana* Hennings es específica para el crisantemo (Mejía, 2008), provoca pérdidas a los productores de San Juan y San Pedro Sacatepéquez, Guatemala y que además se ha expandido a otras regiones del país donde se cultiva crisantemo. Es una roya autoica microciclica, (Backer) y se encuentra en todas las plantaciones de crisantemos donde es difícil su control. Mejía 2008, debido a que los productores no ejecutan todas las medidas fitosanitarias, solo aplican fungicidas generando contaminación ambiental y de las personas debido a que no se protegen adecuadamente.

Durante el desarrollo de dos proyectos de investigación relacionados a la bioprospección de *Darluka filum* y *Ampelomyces quisqualis*, agentes de control biológico para Royas y Cenicillas en 2012 y 2013 se observó constantemente la presencia del hongo *Cladosporium* sp. sobre *Puccinia horiana* que en forma natural se encuentra en algunas áreas de producción y se observa alta eficiencia en la inhibición del agente fitopatógeno el cual podría ser empleado como un fungicida natural específico y eficaz para el control de *P. horiana* de allí la idea de extraerlo aislarlo, purificarlo y propagarlo en forma masiva en sustratos naturales y de bajo costo y evaluar su viabilidad biológica y económica para que los productores puedan acceder a una tecnología simple para su producción a nivel comercial.

## 2 ANTECEDENTES

Durante los años 2012 y 2013 se han desarrollado estudios de prospección para la detección de agentes biocontroladores, *Sphaerellosis filum* y *Ampelomyces quisqualis*. (Alvarez, 2012), (Alvarez, 2013), Como dato preliminar de dichas prospecciones se detectó la presencia de *Cladosporium* sp, (posiblemente *C. uredinicola*) sobre *P. horiana* en algunas localidades de San Juan Sacatepéquez y se observó su eficiencia como agente biocontrolador.

Derivado de este hallazgo y en base a referencias de experiencias en otros países con dicho agente sobre *P. horiana* (García, 2005) se propone realizar la extracción y formulación artesanal de *Cladosporium* sp., para formular un fungicida eficiente, amigable con el ambiente y de bajo costo para los agricultores de la zona.

Se busca beneficiar con la presente investigación a un aproximado de quinientos productores de los cuales depende similar número de familias de los municipios de San Juan y San Pedro Sacatepéquez, Guatemala, donde el crisantemo es la flor más cultivada y comercializada, y es la fuente de ingresos de la población que se dedica a su cultivo.

### 3 JUSTIFICACIÓN

El cultivo del crisantemo en el municipio de San Juan Sacatepéquez es la base de la economía familiar para los agricultores de la zona que en su mayoría se dedican a la explotación comercial de flores de corte y una de sus principales limitantes es la roya blanca *Puccinia horiana*, una enfermedad que afecta la calidad y la productividad por el uso de fungicidas químicos que han sido ineficientes y por otro lado provocan intoxicación de personas y contaminación ambiental.

Durante el desarrollo de los proyectos CONCYT 022-2012 “Bioprospección de *Darluca phyllum* y detección de cepas virulentas para control de royas de importancia económica en la región central de Guatemala” y DIGI 4.8.63.6.58 “Bioprospección de los hiperparásitos *Cicinobolus cesatii* de bary 1870 y *Eudarluca caricis* (biv.) O.e. erikss. 1966, sobre cultivos y plantas adyacentes en la región central de Guatemala”, Se ha detectado en algunas áreas del municipio de San Juan Sacatepéquez, que *P. horiana* tiene baja prevalencia debido a que se encuentra afectada por un agente hiperparásito, *Cladosporium* sp. (Posiblemente *C. uredinicola*) el cual se encuentra en forma natural y según comentario de algunos agricultores entrevistados “allí no necesitan aplicar venenos para la roya” esto es debido a que *C. uredinicola* posee depsidos, que son una clase esteroides intermoleculares formados a partir de ácidos fenoicos y benzoicos y que actúan como antibióticos entre otras de sus propiedades. (Sheta, W., USDA, APHIS 1996).

En base a lo anterior se propone extraer cepas en los sitios ya identificados, aislarlas, cultivarlas, purificarlas y reproducirla en forma masiva en un medio simple para que se pueda formular en forma artesanal, que sea de fácil maniobrabilidad y viable en el control de la roya. Con ello se estaría facilitando a los productores acceder a la aplicación del conocimiento generado en su zona, obtener un fungicida económico, amigable con el ambiente y reducir el uso de agroquímicos en beneficio de ellos y las familias y a la vez proporcionar una herramienta nueva para generar ingresos ya sea a ASOFLORSA o algunos de sus agremiados al hacerse cargo de la producción y comercialización del nuevo producto generado.

Por último luego de la investigación y las evaluaciones pertinentes de campo se puede proceder a patentar la cepa de *C. uredinicola* como parte de los logros obtenidos en la investigación.

## 4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 4.1 Descripción del problema

La roya blanca, *Puccinia horiana Hennings* es específica para el crisantemo (Mejía, 2008), provoca pérdidas a los productores de San Juan y San Pedro Sacatepéquez, Guatemala y que además se ha expandido a otras regiones del país donde se cultiva crisantemo. Es una roya autoica microcíclica, (Backer) y se encuentra en todas las plantaciones de crisantemos donde es difícil su control, Mejía 2008. Debido a que los productores no ejecutan todas las medidas fitosanitarias, solo aplican fungicidas generando contaminación ambiental y de las personas debido a que no se protegen adecuadamente.

### 4.2 Definición del problema

Durante el desarrollo de dos proyectos de investigación relacionados a la bioprospección de *Darluca filum* y *Ampelomyces quisqualis*, agentes de control biológico para Royas y Cenicillas en 2012 y 2013 se observó constantemente la presencia del hongo *Cladosporium* sp. sobre *Puccinia horiana* que en forma natural se encuentra en algunas áreas de producción y se observa alta eficiencia en la inhibición del agente fitopatógeno el cual podría ser empleado como un fungicida natural específico y eficaz para el control de *P. horiana* de allí la idea de extraerlo aislarlo, purificarlo y propagarlo en forma masiva en sustratos naturales y de bajo costo y evaluar su viabilidad biológica y económica para que los productores puedan acceder a una tecnología simple para su producción a nivel comercial.

### 4.3 Delimitación temporal y geográfica

El estudio se realizará durante el periodo de febrero 2014 a enero de 2015, en las instalaciones del laboratorio del Centro de Diagnóstico Parasitológico de la FAUSAC y en el municipio de San Juan Sacatepéquez, con el apoyo de la asociación de floricultores de San Juan ASOFLORSA, por sus siglas que cuenta con más de 200 asociados (Mejía, 2008), distribuidos en las 13 aldeas, 31 caseríos, 3 fincas y 4 colonias con que cuenta el municipio (Ramírez, 2009).

## 5 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 5.1 Biocontrol

El término se refiere a la utilización de especies de insectos, plantas, hongos y bacterias para control de plagas y enfermedades. A nivel mundial se presenta como una alternativa viable y sostenible, como una solución a los problemas generados por el uso desmedido a través de los años de productos agroquímicos.

En general los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista, ellos son: antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (mico parasitismo, lisis enzimática), e inducción de resistencia (Cook & Baker, 1983). Dentro de los agentes biocontroladores se enlistan a continuación los más reconocidos: para el control de enfermedades: *Trichoderma* sp., *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis* Control de plagas: *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Verticillum lecanii*. Control de nematodos: *Paecilomyces lilacinus*.

### 5.2 Fermentación sólida

Puede ser definida como el crecimiento de microorganismos en materiales sólidos húmedos en la ausencia de agua libre. La habilidad de los microorganismos para crecer en un sustrato sólido es una función de sus requerimientos en cuanto a la actividad de agua, su capacidad de adherencia y penetración en el sustrato y su habilidad para asimilar mezclas de diferentes polisacáridos, debido a la naturaleza usualmente compleja de los mismos. Es un proceso en el cual un sustrato insoluble es fermentado con suficiente humedad pero sin agua libre. Recientemente ha aumentado el interés en este tipo de fermentación debido a que pueden obtenerse mayores concentraciones de producto (Chávez, 2006).

Este proceso fermentativo, se caracteriza principalmente por requerir bajos niveles económicos y a la vez obtener alta formación de biomasa y producto, lo cual se da por su bajo requerimiento de aplicación de aireación, control de temperatura y otros factores que si son de carácter necesario en un proceso de fermentación líquida (Vásquez, 2010).

### **5.3 Cultivo de Crisantemo (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat)**

#### **5.3.1 Antecedentes**

El cultivo de Crisantemo *Chrysanthemum x morifolium*, nativo de Asia y nordeste de Europa (Sheta et. al., 1996). Según la clasificación por CPC (Crop Protection Compendium), (CABI UK, 2007), pertenece a la familia Compositae y engloba flores de las más antiguas cultivadas. Mejía (2008) señala que las hojas pueden ser lobuladas o dentadas, ligulosas o rugosas, de tono variable entre el verde claro y oscuro, recubiertas de un polvillo blanquecino que le da un aspecto grisáceo y casi siempre aromáticas. Posee una inflorescencia en capítulo.

En Guatemala, el municipio de San Juan Sacatepéquez es considerado como uno de los principales productores de flores a nivel nacional, donde un 90% de la producción está constituida por Crisantemo, el 10% restante lo complementa el cultivo de rosa y clavel (Mejía 2008).

En el año 2005, se conformó la Asociación de Floricultores de San Juan - ASOFLORSA-, cuenta con alrededor de 200 floricultores, en el año 2008 se estimaba un total 500 invernaderos formales dedicados a la producción, distribuidos en las comunidades: Cruz Blanca, Comunidad de Zet, Comunidad de Ruiz, Loma Alta, Camino de San Pedro y Sajcavillá (Mejía 2008). Según Ramírez (2009) reporta a la roya blanca *Puccinia horiana hennings* y el trips *Frankliniella williamsi*, vector del virus *Tomato Spotted Wilt Virus* TSWV por sus siglas en inglés, conocido como Virus del manchado salvaje del tomate, como los problemas fisanitarios mas importantes en el en cultivo de crisantemo en area bajo estudio.

La importancia de la roya blanca radica en que es considerada como una plaga de importancia cuarentenaria en muchos países importadores. El crisantemo es un cultivo con potencial para la exportación y hasta el momento no se ha logrado un control de la enfermedad, por lo que las oportunidades de incursionar en el mercado internacional actualmente son nulas dado el carácter agresivo de este patógeno (Ramírez 2009).

### **5.4 *Puccinia horiana hennings***

#### **5.4.1 Generalidades**

Conocido como roya blanca asociada a crisantemo (*Chrysanthemum x morifolium* Ramat. (pro sp), necesita estar asociado a un material vegetal vivo para completar su ciclo de vida, por lo que se trata de un parasito. Es clasificada como una roya autoica, microcíclica, que no presenta huésped alterno. La roya blanca del crisantemo es una plaga específica de *Chrysanthemum x morifolium* Ramat, en las diferentes variedades (USDA 2013).

#### 5.4.2 Taxonomía

Phylum: *Basidiomycota*  
Clase: *Urediniomycetes*  
Orden: *Uredinales*  
Familia: *Pucciniaceae*  
Género: *Puccinia*  
Especie: *Puccinia horiana* (NAPPO 2007).

#### 5.4.3 Sintomatología

En cultivo de crisantemo, se puede identificar por lesiones cloróticas en el haz y en el envés de la hoja (Figura 1), puede presentar pústulas blanquecinas o rosadas, que atacan indistintamente las hojas a lo largo del tallo, la intensidad de la infección dependerá de la susceptibilidad de la variedad cultivada; en cultivos muy afectados las pústulas se pueden observar en brácteas y tallos, en flores se puede presentar necrosis con desarrollos ocasionales de pústulas.



**Figura 1.** Pústulas de roya blanca *Pucciana horiana*, sobre hoja de crisantemo.



#### 5.4.4 Ecología y Epidemiología

*Puccinia horiana* es una roya autoica, microcíclica. Las teliosporas, que son bicelulares, germinan produciendo basidiosporas unicelulares. Estas se dispersan con las corrientes de aire. No se conocen otras esporas. Las teliosporas y basidiosporas pueden germinar a temperaturas comprendidas entre 1 y 32 °C con temperaturas óptimas de 15 a 20 °C para las teliosporas y de 13 a 18 °C para las basidiosporas. Para estas germinaciones es indispensable una humedad relativa muy elevada (90% mínimo) (Mejía 2008). En las referidas condiciones óptimas, la germinación de teliosporas y descarga de basidiosporas en la superficie de las hojas es un proceso muy rápido. Sólo con 5 horas es suficiente para que una nueva infección se establezca. El período de incubación es de 7 a 10 días, pero con temperaturas alrededor de 30°C puede prolongarse a 8 semanas.

#### 5.5 *Cladosporium uredinicola*

*Cladosporium uredinicola*, es una de las especies más extendidas a nivel mundial. Incluye alrededor de 40 especies que viven naturalmente en el suelo, en material vegetal en descomposición y como patógenos de las plantas. *Cladosporium* sp., aparece después del colonizador primario. Es un colonizador muy común como *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp., cuando la roya blanca afecta severamente a la planta, puede presentarse necrosamiento de la flor, daño en los tallos, en las hojas y en las brácteas. *C. uredinicola* se ha reconocido como hiperparásito de *Puccinia horiana*, en Estados Unidos (Orlando Florida), Brasil, México, Colombia, Cuba, entre otros (Traquiar, Meloche, Jarvis, & Baker, 1984).

En México, en invernadero, la aplicación de *Cladosporium* sp., no redujo significativamente la incidencia, ni el número de pústulas desarrolladas en la última hoja infectada por *P. horiana*; sin embargo, se obtuvo una reducción significativa ( $p=0.05$ ) en la severidad con una (41%) y cuatro (84%) aplicaciones del antagonista con respecto al testigo sin aplicación (García, Zavaleta Rojas, Leyva, Simpson & Fuentes 2005).

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 General

- Obtener un fungicida biológico específico para *P. horiana* con tecnología básica formulado a base de *C. uredinicola*.

### 6.2 Específicos

- Obtener al menos una cepa altamente virulenta de fácil crecimiento en medios simples.
- Establecer el medio óptimo, accesible y de bajo costo para el crecimiento de *Cladosporium uredinicola* en forma masiva.
- Generar un proceso de formulación estandarizado con tecnología básica y de alto rendimiento de esporas de *C.uredinicola*.

## 7 Hipótesis

Se puede producir *C. urenidicola* utilizando un sustrato de bajo costo y en forma artesanal.

## 8 MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1 Descripción de la ubicación geográfica.

El municipio de San Juan Sacatepéquez, está situado al norte del departamento de Guatemala, de aproximadamente 242 km<sup>2</sup> y dista a 32 km de la ciudad capital, posee una altura promedio en la cabecera municipal de 1845 m.s.n.m. Sus colindancias municipales-departamentales son: al norte Granados Baja Verapaz, al este San Raymundo y Chinautla Guatemala, al sur Mixco y San Pedro Sacatepéquez Guatemala, y Santo Domingo Xenacoj Sacatepéquez, al oeste El Tejar y San Martín Jilotepeque Chimaltenango. El clima según el sistema Thornthwaite es semi-cálido, con invierno benigno, húmedo y de verano seco. La humedad relativa es de 76.9%, la precipitación media es de 1462.28 ml, con temperatura media de 18.78°C. . Ramírez (2009).

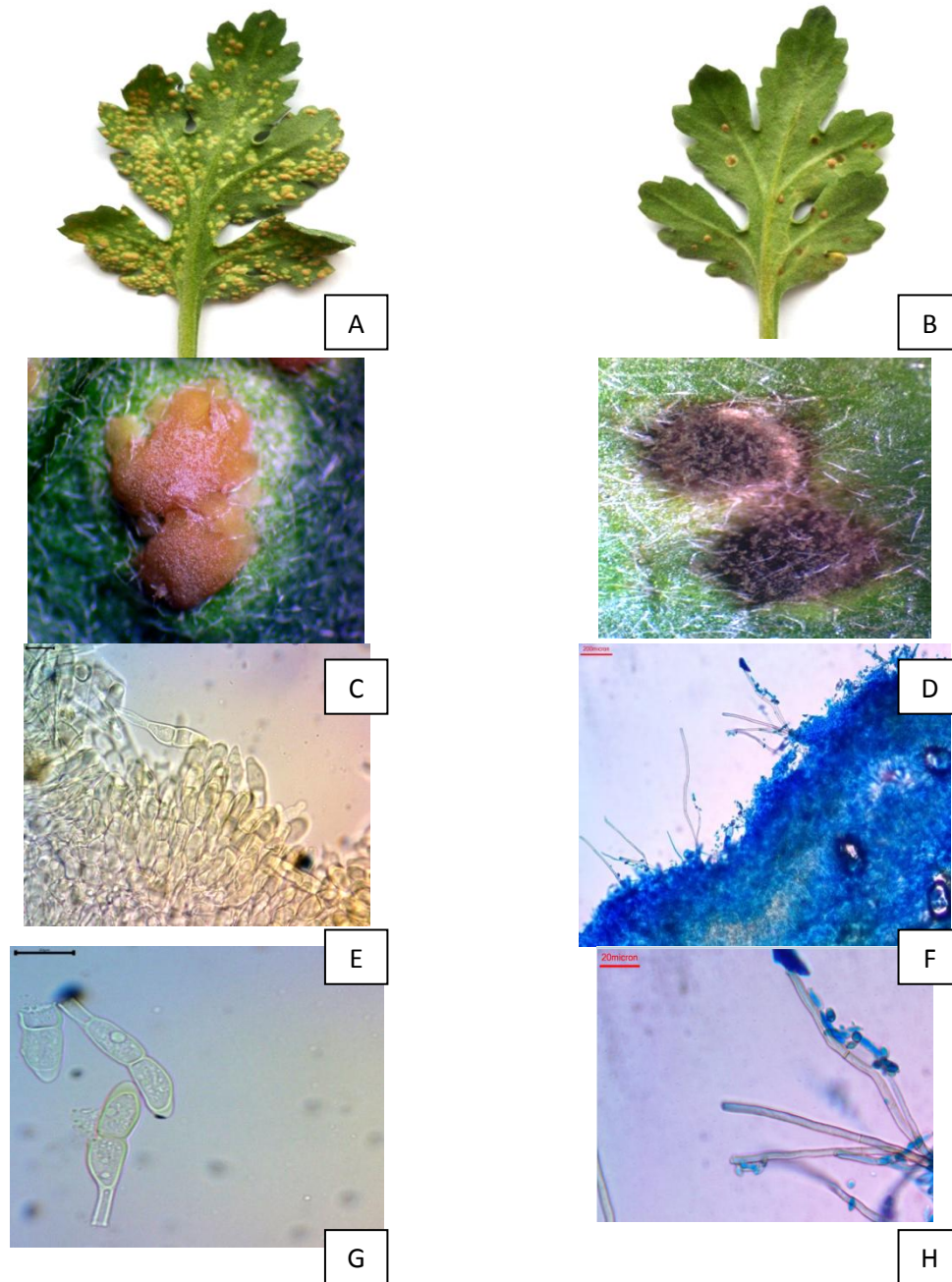
### 8.2 Período de la investigación

El estudio se realizó durante el periodo de febrero de 2014 a enero de 2015, con tres etapas de trabajo relacionadas entre sí, siendo de campo, de laboratorio y de gabinete. La primera la etapa de campo realizada en dos fases febrero colecta de cepas; y noviembre aplicación en campo. La fase de laboratorio de febrero a noviembre y la fase de gabinete de marzo 2014 a enero 2015.

### 8.3 Bioprospección de cepas

Se visitaron tres áreas de producción localizadas en diferentes zonas del municipio: Camino a las trojes (cepa 99), sector 2 Ojo de Agua (cepa 100), y camino a San Pedro (cepa 101). La información sobre las localidades se obtuvo por medio de socios de ASOFLORSA.

Se realizó la colecta de hojas con sintomatología de *P. horiana* con presencia del hiperparásito *Cladosporium uredinicola*, las muestras fueron colocadas en bolsas de nylon recubiertas con papel absorbente, se les asignó un código según las coordenadas de GPS del sitio de muestreo, posteriormente se colocaron dentro de una hielera para su traslado al Centro de Diagnóstico Parasitológico CDP-FAUSAC y la posterior caracterización de pústulas sanas y parasitadas de *P. horiana* (Figura 2).



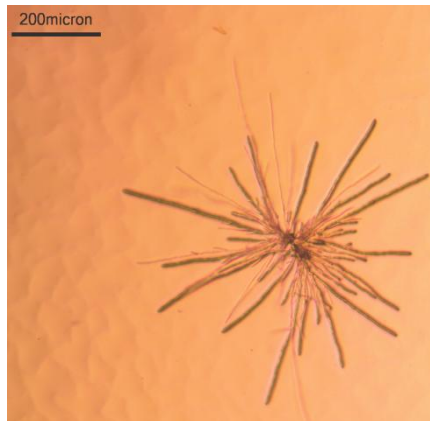
**Figura 2.** Comparación de hojas de Crisantemo **A.** Presencia de roya blanca *P. horiana*, se observa la severidad del daño y la coloración blanca. **B.** Pústulas de *P. horiana* con presencia del hiperparásito *C. uredinicola*, se observa la coloración grisácea sobre las pústulas blancas de *P. horiana*. **C:** Pústula de *P. horiana* sana observada con ayuda de estereoscopio. **D:** Pústula de *P. horiana* parasitada por *C. uredinicola* observada con ayuda de estereoscopio. **E:** Corte transversal de pústula sana de *P. horiana*. **F:** Corte transversal de pústula parasitada de *P. horiana*. **G:** Teliospora sana de *P. horiana*. **H:** Estructuras del hiperparásito *C. uredinicola*.

#### 8.4 Aislamiento inicial de *C. uredinicola*

La siembra de conidios se realizó el mismo día de realizado la recolecta de material vegetal con presencia del hiper parasito, debido a que es un agente de fácil contaminación. Este proceso se realizó en el laboratorio y se empleó el medio de cultivo Agar -Agua al 3%, según la técnica descrita por Goh en el año 1999, que recibe el nombre de Aislamiento de esporas con aguja de vidrio, misma que se describe a continuación:

Bajo el lente del estereoscopio se seleccionaron las hojas con mayor número de pústulas de *P. horiana* infectadas con *C. uredinicola*. Con ayuda de una aguja de disección estéril se transfirieron conidios de *C. uredinicola*, a una caja Petri con medio de cultivo Agar - agua al 3%, (ver Figura 3).

Con una aguja de vidrio estéril bajo el estereoscopio los conidios fueron arrastrados uno por uno de izquierda a derecha en la superficie de Agar. Las cajas de Petri inoculadas se sellaron con parafilm y se colocaron dentro de la incubadora a 26°C según la temperatura de incubación descrita por Garcia-Velasco (2005).

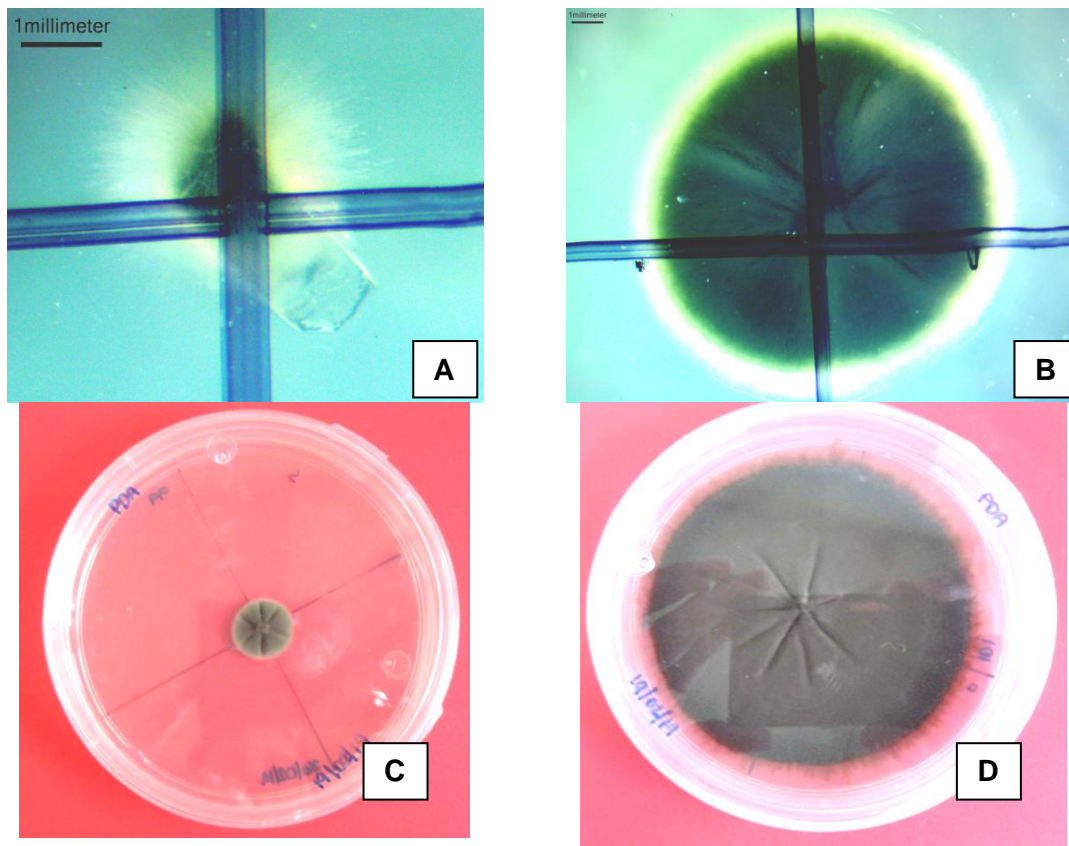


**Figura 3.** Crecimiento de *C. uredinicola* a las 48 horas de realizada la siembra en medio agar- agua al 3%.

#### 8.5 Cultivos monospóricos en PDA

A las 48 horas de realizado el aislamiento inicial se transfirió un conidio germinado por caja con medio de cultivo PDA con cinco repeticiones por cada una de las tres cepas, para obtener cultivos monospóricos según lo descrito por Goh (1999). Se incubaron a 26°C por espacio de 10 días; según la respuesta en base al

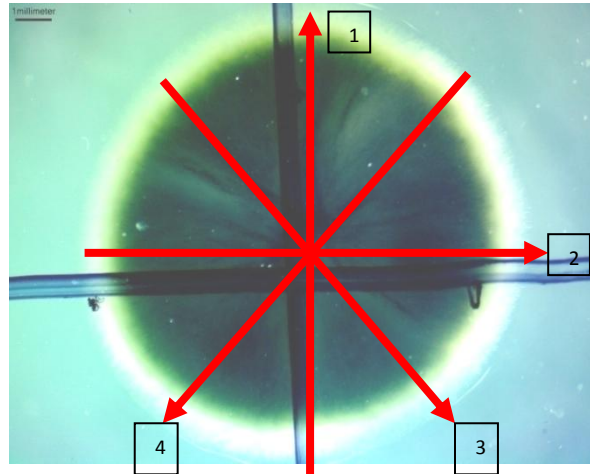
índice de velocidad de crecimiento micelial (IVCM) en el medio de cultivo como se ilustra en la Figura 4.



**Figura 4.** Diferentes etapas de crecimiento de *C. uredinicola*, en medio de cultivo PDA. A. Vista trasera de *C. uredinicola* a los dos días de germinado. B: Vista trasera de *C. uredinicola* a los cinco días germinado. C. Vista frontal de *C. uredinicola* Crecimiento a los 5 días de realizada la siembra. D. Crecimiento y características macroscópicas a los 30 días de realizada la siembra.

#### 8.5.1 Variables Respuesta

El índice velocidad de crecimiento micelial IVCM se realizó con ayuda de un estereoscopio y de la cámara digital Amscope para microscopia, utilizando el software Toup View previamente calibrado con una regla micrométrica, se realizaron las mediciones a los 4, 7, 8, y 10 días después de realizada la inoculación (ddi), para cada cepa se utilizaron 5 repeticiones y se realizaron 4 mediciones para sacar un promedio del diámetro del mismo ( Figura 5).



**Figura 5:** Descripción pictográfica de toma de mediciones para el diámetro de *Cladosporium uredinicola*.

Por medio de disoluciones se trabajó el promedio de esporas disponibles de cada una de las cepas (10ddi), el conteo se realizó con ayuda de la cámara de conteo Neubauer bajo el lente del microscopio. Los valores obtenidos se evaluaron estadísticamente empleando análisis de Tukey por medio del programa estadístico InfoStat.

## 8.6 Preparación y evaluación de sustratos de crecimiento masivo

Los sustratos utilizados fueron: arroz, arroz pre-cocido y maíz quebrado. Los plásticos con los que se iniciaron el proceso de evaluación fueron: bolsa simple de arroba calibre seis, bolsa doble de arroba calibre seis, plástico para forrar cuadernos simples y plástico para forrar cuaderno doble.

Debido a que no se adquiría la máquina de sellado de bolsas se procedió a realizar pruebas sellando las bolsas con mecheros a cada una de las bolsas se le colocaron 100 gramos de arroz y 70 cc de agua destilada. Luego de ser autoclaveadas por 7 minutos a 118°C, sin embargo el 60% de las bolsas sin esterilizar presentaban orificios en el sellado; por lo que se descarto el proceso.

Debido a los resultados negativos en la prueba anterior se gestiono el préstamo de una maquina selladora de plásticos con la cual se siguieron con las pruebas de sallado con los mismo cuatro tipo de bolsas. Los resultados fueron los siguientes después de un autoclaveado de siete minutos a 118°C: bolsa simple de arroba calibre seis (60% con orificios), bolsa doble de arroba calibre seis (50% con orificios), plástico para forrar cuadernos simples (90% con orificios) y plástico para forrar cuaderno doble (90%).

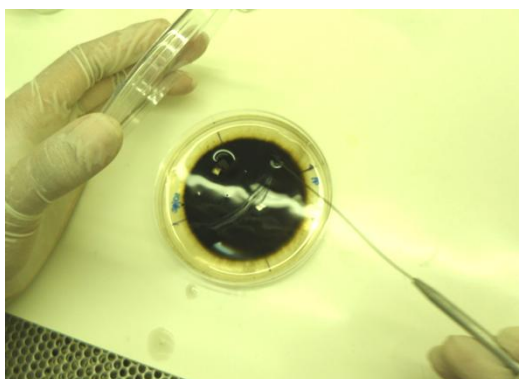


Seguido de esto se procedió a reducir a 50 gramos de arroz y su equivalente en agua, logrando los siguientes resultados: Los resultados fueron los siguientes después de un autoclaveado de siete minutos a 118°C: bolsa simple de arroba calibre seis (50% con orificios), bolsa doble de arroba calibre seis (30% con orificios), plástico para forrar cuadernos simples (80% con orificios) y plástico para forrar cuaderno doble (80%).

Debido al alto porcentaje de bolsas que presentaban orificios de diverso tamaño en su estructura se hizo una nueva evaluación con bolsas de 3 mm de grosor que son utilizadas para empaque al vacío en la industria alimenticia. El porcentaje de bolsas que presentaban orificios luego del mismo proceso de autoclaveado fue de 0% por lo que se determinó que el calibre de bolsa que soportaba la temperatura de la autoclave es de 3 mm de grosor y con las siguientes dimensiones 8" x 8" (pouches TRIPAC 8" x 8" x 3 mm).

#### 8.6.1 Suspensión de esporas:

Se realizó sobre la caja de Petri que contenía la cepa un estriado con ayuda de un aza bacteriológico y 10 ml de agua destilada con tween 20 al 0.05%, esto con la finalidad de desprender las esporas de *C. uredinicola*, como se observa en la figura 6, esto fue colocado dentro de un erlenmeyer, para luego ser diluido en 90 ml de agua destilada con tween 20 al 0.5% para la dispersión de los conidios. Para facilitar la lectura en la cámara de conteo Neubauer. Las disoluciones se hicieron hasta llegar a la concentración de  $1 \times 10^6$ .



**Figura 6.** Procedimiento empleado para obtener suspensión de esporas de *C. uredinicola* del aislado en medio PDA.

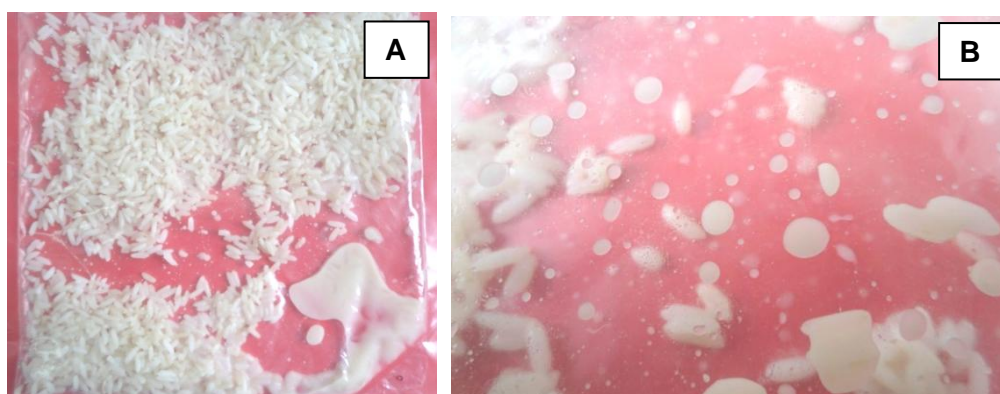
La evaluación de substratos se realizó en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. La variable respuesta será la cantidad de conidios por gramo a los ocho, doce y dieciséis días después de la inoculación.



## 8.7 Procedimiento experimental

Se realizó la preparación pesando 50 gramos de sustratos (arroz, arroz precocido, maíz quebrado), se agregaron 35 ml de agua destilada a las bolsas de sustrato y se dejó reposar por 24 horas para que el grano absorbiera el agua, posteriormente se esteriliza por 7 minutos a 118°C. Sin embargo después de realizada la inoculación con 10cc de suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios, los sustratos se encontraban contaminados con olor desagradable y coloración amarilla, así mismo algunas bolsas con sustrato se observaron que despidieron el agua absorbida como se observa en la

Figura 7 por lo que se concluyó que los sustratos necesitan menor cantidad de agua a manera de que no saturar con el agua agregada y aumentar el tiempo de esterilización.



**Figura 7.** Bolsas preparadas con sustrato (arroz pre-cocido), **A.** Se observa que dentro de la bolsa se encuentra una considerable cantidad de agua, despedida por el grano. **B.** Agua dentro de la bolsa se observa densa y con un leve color amarillo (vista de cerca).

Debido a los inconvenientes presentados se realizaron pruebas evaluando la cantidad de agua, temperatura y tiempo de esterilizar dejando absorber el agua por 24 horas, de la siguiente manera:

- a. 35ml agua a 118°C por 17 min.
- b. 30ml agua a 118°C por 12 min.
- c. 25ml agua a 118°C por 17 min.
- d. 30ml agua a 118°C por 17 min.

De las pruebas realizadas el tratamiento C., presento mejores características visuales, corresponde a 25 ml de agua a 118°C por 17 min, ya que presento un grano más cocido por lo tanto más estéril y absorción total del agua agregada. Sin

embargo un 50% de las bolsas autoclaveadas sufrieron deformaciones hasta romperse debido a la temperatura o tiempo dentro de la autoclave.

Posteriormente se realizaron pruebas de cantidad de suspensión de esporas a inocular, siendo: 10 cc, 5cc y 3cc por bolsa. El mejor resultado fue al aplicar 5 cc de suspensión de esporas presentando las características siguientes: no se despidió el agua que había absorbido, sin olor desagradable, ausencia de coloración amarilla.

Se realizó inoculación de suspensión de esporas presentando resultado positivo de germinación de los conidios de *C. uredinicola* en 11 repeticiones; sin embargo a los 6 días aproximadamente se observó una reacción desfavorable en la textura del grano, como se observa en la Figura 8.



**Figura 8.** Sustrato inoculado y con crecimiento de *C. uredinicola*, el círculo rojo resalta el cambio observado en la textura y coloración del grano donde no se observa crecimiento de *C. uredinicola*.

Se realizó la preparación de nuevo de bolsas con sustrato, se trabajó en dos fases:

Fase 1: Se agregó la misma cantidad de sustrato por bolsa 50 gramos y 35 ml de agua destilada. El grano se llevó a cocción por un periodo de 17 minutos a 121 °C en autoclave, para ello se realizó la relación de la cantidad de sustrato y agua empleada para 4 repeticiones, se colocó en un beaker de 1000 ml como se muestra en la Figura 9A donde se tomó el peso inicial y el peso final, se dejó enfriar por un periodo de una hora.

Fase 2: Se realizó la relación, y se volvió a pesar antes de llenar las bolsas, en esta segunda fase no se agregó agua, la bolsa se selló con grapas para evitar que el calor acumulado la rompiera; se procedió a esterilizar durante 17 minutos a 121 °C, como se observa en la figura 9B.



**Figura 9.** Proceso de preparación de bolsas con sustratos. **A.** En la fotografía se observa beaker conteniendo arroz luego de esterilizar, corresponde a la fase 1. **B.** Bolsas preparadas con los sustratos: maíz, arroz pre-cocido y arroz. Después de ser esterilizadas, corresponde a la fase 2.

Las bolsas con los sustratos se dejaron enfriar por un periodo de 12 horas y se procedió a realizar la inoculación dentro de la campana de flujo laminar, con 3 cc de una suspensión  $1 \times 10^6 / 10$  cc de *C. uredinicola*.

Se incubaron durante 8 días a  $25^\circ\text{C}$ , Chavez (2006); para así evaluar el periodo para la formación de conidios en cada uno de los sustratos. A los ocho días después de incubados se procedió a realizar suspensión de conidios en un lt de agua estéril/sustrato y se procedió a cuantificar el rendimiento de esporas por gr de sustrato.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente según su normalidad evaluando el rendimiento de esporas por gramo de sustrato en tres periodos de incubación de 8, 12 y 16 días, realizando las lecturas correspondientes con la cámara de Neubauer.

En base al rendimiento se procedió a seleccionar el sustrato óptimo a evaluar en campo.

## 8.8 Control de calidad para formulaciones biológicas

### 8.8.1 Germinación de esporas

Esta prueba permitió establecer la viabilidad del hongo. Este procedimiento se realizó con la solución preparada para determinar la concentración de esporas. Se prepararon cajas Petri con agar-agua y en el fondo de cada caja petri se definirán cinco puntos, correspondientes a los puntos en los cuales se depositaron las alícuotas que contenían las esporas. De la dilución preparada anteriormente se tomaron 5 ul que se depositaron en los cinco puntos establecidos, las cajas petri se incubaron a 26°C, durante 18 y 24 horas. Transcurridos el tiempo de incubación se agregó una gota de azul de lactofenol a cada alícuota para detener la germinación y ayudar a teñir las esporas del hongo (Chavez, 2006.)

Posteriormente se cortaron los cinco discos de agar donde fueron depositadas las alícuotas, estos se colocaron sobre una porta-objetos y fueron cubiertos por un cubre-objetos. Los montajes fueron observados al microscopio a 40x contando un mínimo de 100 esporas registrando germinadas y no germinadas por alícuotas. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de germinación (Chavez, 2006.)

### 8.8.2 Definición de variables

Debido a que el proyecto se efectuó en dos etapas de laboratorio y de campo, se tuvieron las siguientes variables para cada una de ellas:

De Laboratorio: Concentración de esporas en cada sustrato, porcentaje de germinación de esporas, pureza y número de días óptimo para aplicación en campo.

Las variables de campo fueron: incidencia de la enfermedad *Puccinia horiana*, severidad de la misma, dosis óptima para aplicación en campo.

## 8.9 Aplicación en campo

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico se seleccionó el sustrato que presento el óptimo crecimiento de *C. uredinicola*. La aplicación en campo se realizó evaluando cuatro concentraciones de conidias suspendidas en agua con solución Tween 20 al 0.5%, las aplicaciones se realizaron en un periodo de ocho días entre cada una, con un total de cuatro aplicaciones sobre una superficie de 1 m<sup>2</sup>. Las variables de respuesta fueron los índice de incidencia y severidad de *P. horiana* en cada uno de los tratamientos, así como también la tasa de incremento de *P. horiana* en el tiempo. Las dosis evaluadas en campo fueron:

- Dos bolsas de sustrato por 16 litros de agua = T4.
- Una bolsa de sustrato por 16 litros de agua = T3.
- 0.5 bolsas por 16 litros de agua = T2.
- 0.25 bolsas por 16 litros de agua = T1.
- Testigo absoluto = Testigo.

El arreglo estadístico para evaluar las variables de respuesta fue bloques al azar con cuatro repeticiones (bloques). Cada parcela bruta consta de 151 plantas y la parcela neta consto de 12 plantas ubicadas en el centro de cada parcela para formar una repetición. A continuación se muestra el croquis de distribución de bloques en campo al momento de la evaluación.

T3R3	Testigo 4
Testigo 3	T2R4
T1R3	T4R4
T4R3	T1R4
T2R3	T3R4
T1R2	T3R1
T4R2	T2R1
T2R2	Testigo 1
Testigo 2	T1R1
T3R2	T4R1

### 8.10 Tipos y formas de análisis de las variables

Los datos de laboratorio fueron: concentración de esporas (conidios por gramo de sustrato), porcentaje de germinación de esporas a los 18 y 24 horas, tiempo de incubación óptimo para aplicación en campo expresado en número de días. Las variables para campo son: porcentaje de incidencia de *P. horiana* y severidad, dosis expresada en bolsas por hectárea.

### 8.11 Metodología de análisis de la información

Para los datos numéricos obtenidos en laboratorio y campo se analizaron estadísticamente y compararon en tablas para expresar su variabilidad entre los distintos tratamientos, con un 95% de confiabilidad, se realizó un análisis de medias y con ello se determinó el mejor sustrato en laboratorio, días de mayor producción de conidios y el mejor tratamiento en campo.

## 9 RESULTADOS

### 9.1 Obtención de la Cepa

De acuerdo a la información proporcionada por miembros de la Asociación ASOFLORSA, se determinó tomar muestras en tres diferentes sitios de producción en las aldeas Camino a las Trojes (99), Sector 2 Ojo de agua (100) y Aldea Camino a San Pedro (101), distribuidos en diferentes áreas dentro del Municipio, como se observa en la Figura 10 en base a las coordenadas de la tabla 1.

**Tabla 1:** Coordenadas de los sitios donde se relizaron las extracciones de cepas.

Cepa	N		W		MSNM
	Grados	Minutos	Grados	Minutos	
99	14	43.655	90	40.691	1856
100	14	43.175	90	40.238	1851
101	14	41.966	90	38.570	2008

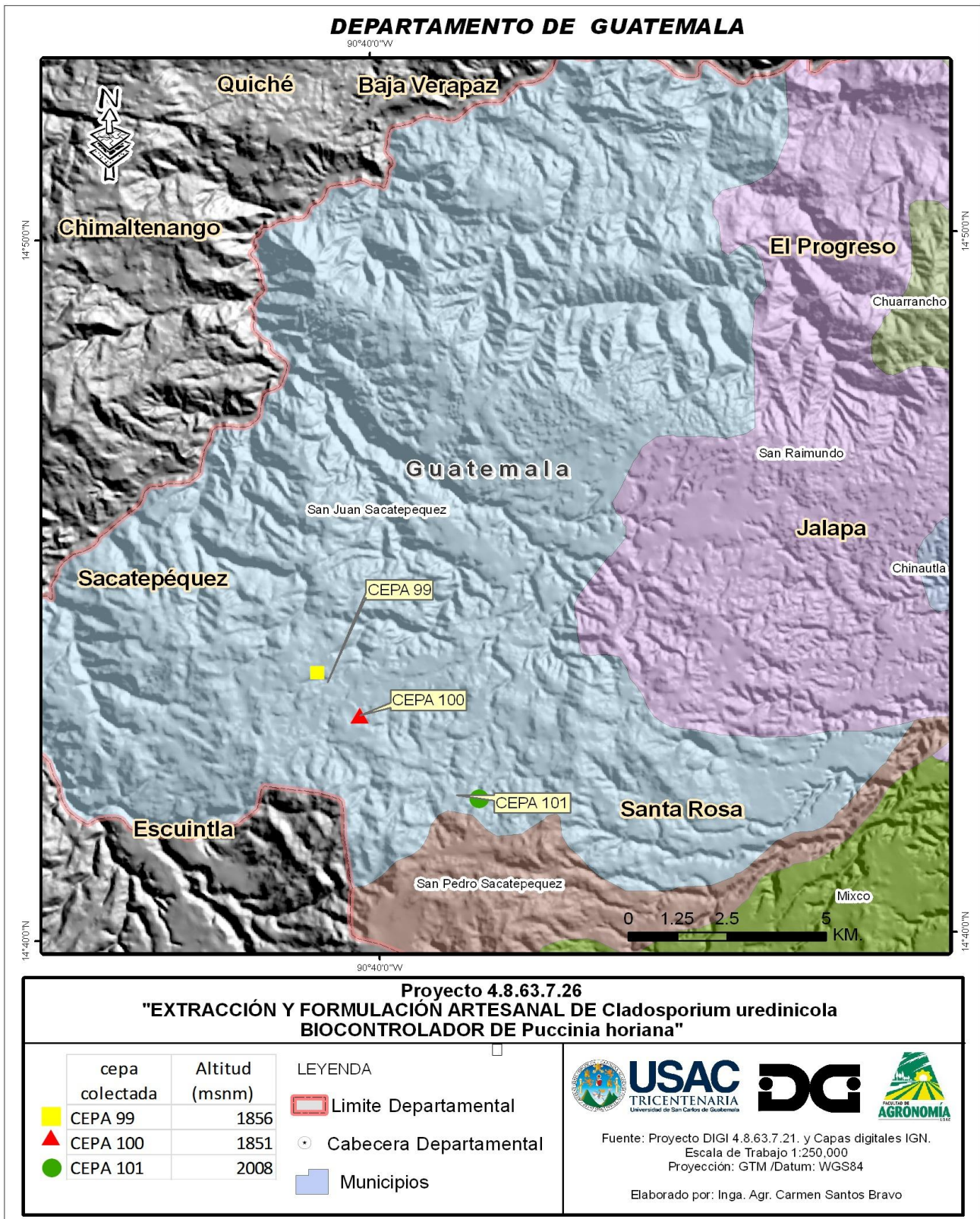
#### 9.1.1 Evaluación del índice velocidad crecimiento micelial IVCM

Se realizó un arreglo estadístico del tipo completamente al azar, en el cual se hicieron cinco repeticiones por tratamiento, siendo cada repetición una caja petri. Según la evaluación del índice velocidad crecimiento micelial IVCM, realizando las mediciones a los 4, 7, 8 y 10 días, como se observa en la Tabla 2 la cepa proveniente de camino a las trojes identificada como 99 presento los mejores resultados, con rango de IVCM a los 10 días de 1.82 a 1.95mm, mientras las otras dos cepas 100 y 101 se encuentran por debajo de 1.6 mm.

**Tabla 2.** Detalle de las lecturas realizadas a las cepas aisladas de *C. uredinicola*.

Cepa	Repetición	Promedio (4 Lecturas) mm				Sumatoria	IVCM
		28-feb	03-mar	04-mar	06-mar		
99	1	3.67879	11.23888	14.81039	18.49250	18.49250	1.84924957
	2	4.50629	12.05322	15.18997	19.54279	19.54279	1.95427929
	3	4.10135	11.52753	15.10890	18.47018	18.47018	1.8470183
	4	4.33987	11.14831	14.86186	18.28693	18.28693	1.82869272
	5	3.21362	11.25101	14.93866	18.74472	18.74472	1.87447236
100	1	1.75677	7.18745	10.14972	13.74637	13.74637	1.37463715
	2	1.94817	8.16349	11.08888	14.22714	14.22714	1.42271441
	3	2.21519	8.37895	11.77092	15.21721	15.21721	1.52172129
	4	1.45664	8.30086	11.67564	15.30208	15.30208	1.53020846
	5	1.70251	7.84906	10.75621	14.74523	14.74523	1.47452278
101	1	2.08311	8.45558	11.97953	16.33033	16.33033	1.63303282
	2	1.94860	8.16349	10.91438	15.46052	15.46052	1.54605209
	3	1.66438	8.37895	11.46117	15.82049	15.82049	1.58204918
	4	1.89574	8.30086	11.40221	15.39058	15.39058	1.539058
	5	1.86654	7.84906	10.75621	15.51882	15.51882	1.55188202





**Figura 10.** Mapa de ubicación de los puntos donde fueron extraídas las cepas de *C. uredinicola* para la evaluación a lo largo del presente estudio.



A los datos se les realizó análisis de varianza para verificar si existía diferencia significativa entre los tratamientos, por lo que se tiene la certeza que con un 95% de confianza existe diferencia significativa entre los tratamientos. Por lo que se procedió a analizar con prueba de medias de Tukey cuál de los tratamientos es el que estadísticamente representa la media más alta en IVCM, y con un 95% de confianza la cepa 99 presentó los mejores resultados de crecimiento en medio de cultivo PDA con una media de crecimiento de 1.87 mm por día (ver Figura 11).

Por lo tanto la cepa 99 se considera altamente virulenta por su velocidad de crecimiento y fácil crecimiento en medios simples.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna2	15	0,93	0,92	3,22

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,44	2	0,22	79,99	<0,0001
Columnal	0,44	2	0,22	79,99	<0,0001
Error	0,03	12	2,8E-03		
Total	0,48	14			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,08885

Error: 0,0028 gl: 12

Columnal Medias n E.E.

Cepa 99	1,87	5	0,02	A
Cepa 101	1,57	5	0,02	B
Cepa 100	1,46	5	0,02	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

**Figura 11.** Resultados del análisis estadístico realizado para evaluar el índice velocidad de crecimiento micelial de las cepas colectadas.

## 9.2 Medio óptimo para el crecimiento de *Cladosporium uredinicola*

El conteo de conidios se realizó en los tres sustratos propuestos: arroz, arroz pre-cocido y maíz quebrado, cabe resaltar que con las condiciones que se evaluaron de 35 ml de agua por 50 gramos de grano, cocido del arroz por 7 minutos a 118°C y luego esterilización por 18 minutos a 118°C, en el único sustrato que creció *Cladosporium uredinicola* fue en maíz quebrado.

Según el número de días para producción de conidios se realizó un análisis estadístico completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento, siendo

cada repetición una bolsa de sustrato, el análisis de varianza y de Tukey y fue efectuado con un 95% de confianza, como se observa en la figura 12.

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Numero de conidios	12	0,80	0,76	36,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.	681787677408854,00	2	340893838704427,00	18,57	0,0006	
Tratamiento	681787677408854,00	2	340893838704427,00	18,57	0,0006	
Error	165236374511719,00	9	18359597167968,70			
Total	847024051920573,00	11				

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8459269,53609  
 Error: 18359597167968,7461 gl: 9

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Maíz a los 18 días	21054687,50	4	2142405,03 A
Maíz a los 12 días	11851562,50	4	2142405,03 B
Maíz a los 8 días	2591406,25	4	2142405,03 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Figura 12:** Análisis de Varianza y de Tukey efectuados para producción de conidios.

Según lo analizado en la figura 12 con un 95% de confianza existe diferencia significativa entre los tratamientos efectuados (Maíz a los 8 días, 12 días y 16 días). Debido a esto se efectuó el análisis de media de Tukey con un 95% de confianza para verificar cual de los tres tratamientos es el que representa la mejor media, siendo esta Maíz a los 16 días con una producción de conidios de 21,054,687.50 conidios por ml de solución.

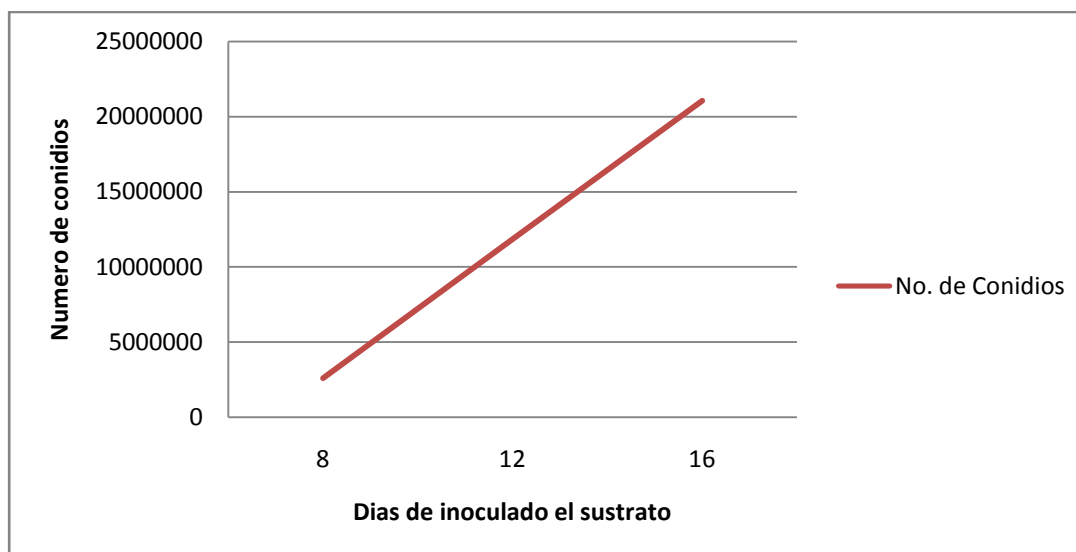
Pero según el análisis de Tukey se logra observar que las medias tienen aún un crecimiento exponencial, por lo que no se ha llegado a una constante en la curva de crecimiento en la producción de conidios por día según la tendencia que se muestra en la figura 12.

Germinación a las 18 horas.

Se realizó la prueba de germinación a las 18 horas, siendo cada uno de los tratamientos los siguientes tratamientos:

- Maíz a los 16 días
- Maíz a los 12 días.
- Maíz a los 8 días

Cada una de estas con cuatro repeticiones, y cada repetición una bolsa de sustrato con crecimiento de *Cladosporium uredicola*. Se realizó un análisis de varianza a las 18 horas de germinado con un 95% de confianza para verificar si existe diferencia significativa entre los tratamientos, como se observa en la figura 13.



**Figura 13:** Tendencia de crecimiento de la tasa de producción de conidios en relación al tiempo expresado en días después de inoculado.

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Numero de conidios	12	0,95	0,94	4,03

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1908,09	2	954,05	82,05	<0,0001
Tratamiento	1908,09	2	954,05	82,05	<0,0001
Error	104,64	9	11,63		
Total	2012,74	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=6,73187

Error: 11,6270 gl: 9

Tratamiento	Medias	n	E.E.	
Maiz a los 18 días	93,49	4	1,70	A
Maiz a los 12 días	93,46	4	1,70	A
Maiz a los 8 días	66,73	4	1,70	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

**Figura 14:** Análisis de varianza de germinación a las 18 horas.

Se concluye que con un 5% de nivel de significancia existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, por lo que con el análisis de Tukey, se concluye que no hay diferencia significativa entre la germinación a las horas de Maíz a los 16 días y Maíz a los 12 días; sin embargo si existe diferencia significativa con el maíz a los 8 días.

### 9.2.1 Germinación a las 24 horas de conidios.

Se realizó la prueba de germinación a las 18 horas, siendo cada uno de los tratamientos los siguientes tratamientos:

- Maíz a los 16 días
- Maíz a los 12 días.
- Maíz a los 8 días

Cada uno de estos con cuatro repeticiones, y cada repetición una bolsa de sustrato con crecimiento de *Cladosporium uredicola*. Se realizó un análisis de varianza a las 24 horas de germinado con un 95% de confianza para verificar si existe diferencia significativa entre los tratamientos, como se observa en la figura 14.

#### Análisis de la varianza

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Numero de conidios	12	0,73	0,67	1,50

#### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	51,87	2	25,94	12,21	0,0027
Tratamiento	51,87	2	25,94	12,21	0,0027
Error	19,12	9	2,12		
Total	70,99	11			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=2,87755

Error: 2,1244 gl: 9

Tratamiento	Medias	n	E.E.
Maiz a los 18 días	99,41	4	0,73 A
Maiz a los 12 días	98,14	4	0,73 A
Maiz a los 8 días	94,51	4	0,73 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

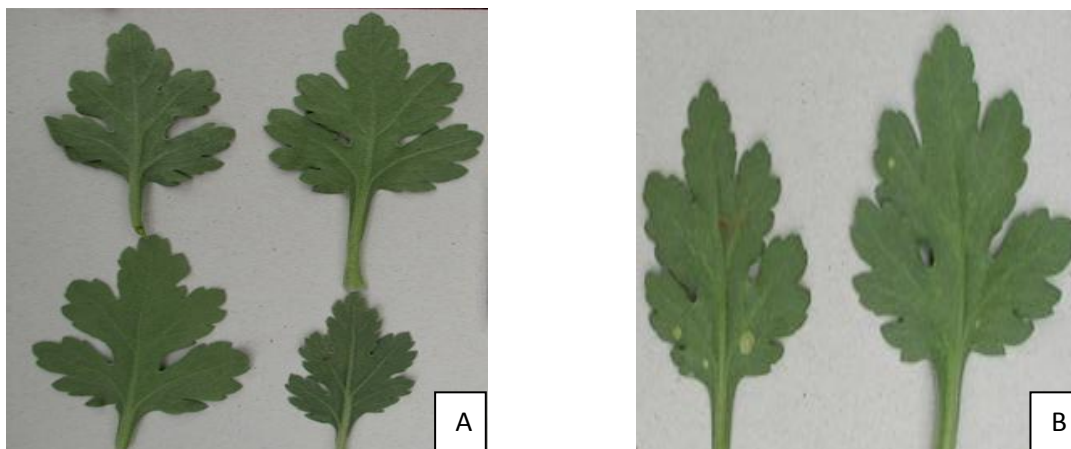
**Figura 15:** Análisis de varianza de germinación a las 24 horas de inoculado.

Se concluye que con un 5% de nivel de significancia existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos, por lo que con el análisis de Tukey, se concluye que no hay diferencia significativa entre la germinación a las horas de Maíz a los 16 días y Maíz a los 12 días; sin embargo si existe diferencia significativa con el maíz a los 8 días.

### 9.3 Evaluación en campo

#### 9.3.1 Análisis de severidad

Las hojas fueron cortadas a los cuarenta días del trasplante de la parcela neta que constaba de 12 plantas, las hojas de cada planta fueron cortadas, clasificadas y fotografiadas en campo en grupo de acuerdo a la presencia o ausencia del hongo como se observa en la figura doce.



**Figura 16:** Fotografías tomadas de las hojas de la planta número tres del testigo del bloque tres para análisis en ArcGis. A: Hojas sanas de crisantemo. B: Hojas con presencia de síntomas y signos de *P. horiana*.

Las fotografías fueron analizadas con el programa ArcGis, con el cual por medio de la función de regla que ofrece este se obtuvo el área total de la hoja y el área con síntomas y signos de *P. horiana*, los datos obtenidos se pueden observar según el bloque en las tablas 6, en la cual se presenta el promedio del porcentaje de severidad de las plantas de cada tratamiento que se encuentran en los bloques.

**Tabla 3:** Detalle de datos obtenidos según severidad en porcentaje en cada planta por tratamiento y bloque.

Bloque 1						Bloque 2					
Planta	Tratamiento					Planta	Tratamiento				
	T1R1	T2R1	T3R1	T4R1	Testigo 1		T1R2	T2R2	T3R2	T4R2	Testigo 2
<b>1</b>	0,30591	0,38311	0,42977	0,78481	0,15246	<b>1</b>	0,69788	0,70349	0,24111	0,22744	0,31614
<b>2</b>	0,85101	0,56635	0,26517	0,19273	1,35359	<b>2</b>	0,55012	0,63222	1,47629	1,33413	0,98059
<b>3</b>	0,11309	0,64314	0,48253	0,85478	0,39210	<b>3</b>	0,58472	0,66960	0,47662	0,50788	0,00000
<b>4</b>	0,26878	0,11749	0,23830	0,32878	0,78762	<b>4</b>	0,52813	0,27547	0,44568	0,39348	0,42711
<b>5</b>	0,58872	0,69815	0,40328	0,36294	0,33263	<b>5</b>	0,46993	0,65388	0,39412	0,62545	0,15751
<b>6</b>	0,24813	0,41569	0,31608	0,58347	0,69123	<b>6</b>	0,58796	1,34939	1,47461	0,58681	1,25256
<b>7</b>	0,22657	0,39676	0,60244	0,49732	0,54393	<b>7</b>	1,25068	1,46292	0,15832	0,35896	1,11930
<b>8</b>	0,16022	0,55286	0,15264	0,39058	0,28717	<b>8</b>	0,89774	0,73385	0,60599	0,13948	0,09203
<b>9</b>	0,57522	0,34316	0,63552	0,60050	0,61963	<b>9</b>	1,10236	0,39305	0,75800	0,64461	0,20711
<b>10</b>	1,71693	0,20024	0,28980	0,51390	0,33522	<b>10</b>	0,30041	0,21679	0,52485	1,18204	0,27521
<b>11</b>	0,14365	0,47163	0,76509	0,41883	0,17811	<b>11</b>	0,56171	0,70269	0,72130	0,81544	0,76291
<b>12</b>	0,56943	0,36627	1,43636	0,29230	0,27595	<b>12</b>	0,06771	1,41959	0,97229	0,56692	0,45125
Bloque 3						Bloque 4					
Planta	Tratamiento					Planta	Tratamiento				
	T1R3	T2R3	T2R3	T2R3	Testigo 3		T1R4	T2R4	T3R4	T4R4	Testigo 4
<b>1</b>	1,21074	0,38665	1,49109	1,85328	0,06342	<b>1</b>	0,26257	0,35804	0,01470	0,60688	0,27145
<b>2</b>	0,12122	0,50524	0,47546	1,38423	0,83680	<b>2</b>	0,32965	0,64228	0,47979	0,23821	0,31709
<b>3</b>	1,71690	0,57514	0,91878	0,38606	0,07552	<b>3</b>	0,41513	0,37055	0,64979	0,10255	0,12837
<b>4</b>	1,23681	0,92740	1,04237	0,41158	0,25442	<b>4</b>	0,87401	0,24341	0,11015	1,03846	0,65097
<b>5</b>	0,78775	0,54408	0,13356	0,78271	0,53559	<b>5</b>	1,15981	0,78788	0,18154	0,17483	0,64900
<b>6</b>	0,77903	1,08161	0,23766	0,48832	0,38769	<b>6</b>	0,16431	0,95670	0,61274	0,63820	0,24216
<b>7</b>	1,64183	1,58464	0,50969	0,51573	0,24479	<b>7</b>	0,56205	0,45555	0,56490	0,43483	3,11682
<b>8</b>	0,29091	1,21892	0,64586	0,58067	0,52673	<b>8</b>	0,05886	0,82392	0,44907	0,27011	0,74606
<b>9</b>	0,84740	0,34767	0,44177	1,44349	0,57201	<b>9</b>	0,54773	0,51801	0,46228	0,56828	1,02946
<b>10</b>	1,08067	0,98596	0,07458	1,01856	1,57616	<b>10</b>	0,25609	1,08492	0,36247	0,76935	0,11531
<b>11</b>	1,18326	0,84260	0,53498	0,38325	0,72909	<b>11</b>	0,71280	0,73365	0,07430	0,14045	0,65650
<b>12</b>	1,05975	0,30146	1,37066	0,43835	5,47495	<b>12</b>	1,62177	0,41069	0,83666	0,38166	0,25689

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente con ANDEVA y se afirma que con un 95% de confianza no existe diferencia significativa entre los tratamientos analizados; como se observa en la tabla siete, por lo que no fue necesario realizar el análisis de medias de Tukey.

**Tabla 4:** ANDEVA según severidad.

**Análisis de la varianza**

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Columna3	20	0,75	0,60	16,89

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,40	7	0,06	5,09	0,0069
Columna1	0,04	4	0,01	0,81	0,5413
Columna2	0,36	3	0,12	10,80	0,0010
Error	0,13	12	0,01		
Total	0,53	19			

#### 9.4 Matriz de Resultados

Objetivo Específico	Resultado Esperado	Resultado Obtenido
<p><b>Obtener al menos una cepa altamente virulenta de fácil crecimiento en medios simples.</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aislar por lo menos una cepa de <i>C. uredinicola</i> proveniente de la región de San Juan Sacatepéquez.</li> <li>2. Obtener cepa con características idóneas para su reproducción masiva.</li> </ol>	<p>Se obtuvo una cepa, la # 99 proveniente de Aldea Camino a las Trojes, que presentó las mejores características de crecimiento el índice de velocidad de crecimiento miceliar en medio de cultivo PDA,</p>
<p><b>Establecer el medio óptimo, accesible y de bajo costo para el crecimiento de <i>Cladosporium uredinicola</i> en forma masiva.</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>3. Identificar al menos un medio de fácil crecimiento y de bajo costo económico.</li> </ol>	<p>Se estableció al sustrato maíz quebrado como el medio óptimo para el crecimiento masivo de <i>C. uredinicola</i>.</p>
<p><b>Generar un proceso de formulación estandarizado con tecnología básica y de alto rendimiento de esporas de <i>C. uredinicola</i>.</b></p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>4. Obtener un proceso con pasos básicos y que conlleve a la formulación artesanal de <i>C. uredinicola</i>, para el control de <i>P. horiana</i>.</li> <li>5. Realizar una prueba de campo piloto que contribuya a la evaluación del aislado obtenido, evaluado mediante condiciones de campo.</li> </ol>	<p>Se generó un proceso de formulación para la producción masiva de <i>C. uredinicola</i> con las condiciones óptimas y utilizando tecnología básica y con un alto rendimiento de esporas. Se realizo la prueba de campo evaluando incidencia y severidad a los 40 días.</p>



## 10 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las tres cepas obtenidas de tres localidades del municipio de San Juan Sacatepéquez fueron localizadas en plantaciones donde la severidad de *P. horiana* era de baja a moderada y el criterio de selección de campo fue de obtener hojas con bajo nivel de daño por la roya, como un parámetro de búsqueda, para lo cual se buscaron hojas con pocas pústulas de roya y las pústulas deberían de estar deprimidas, a partir de este criterio se inicio la preselección del especímenes con potencial biológico de virulencia del hiperparásito. Se considera que en un campo de cultivo donde prevalece el agente fitopatógeno y su endófito es posible detectar diferentes grados de virulencia, según Sheta (1996) en detecciones realizadas por el servicio de cuarentena de Estados Unidos, realizaron observaciones y concluyen que hay diferentes grados de virulencia del hiperparásito, y confirma lo realizado por en comparación con lo reportado por Traquair (1984).

Uno de los patrones de muestreo que se utilizaron fue la búsqueda en plantaciones en abandono, es decir ya cultivadas y cosechadas, de los sitios muestreados no fue posible la detección probablemente debido a que durante el proceso del cultivo se realizaron aplicaciones de fungicidas sintéticos, y que la intensidad de uso ó la residualidad de los mismos ha incidido en que no se manifieste la presencia del hiperparásito. *C. uredinicola* en el cultivo de crisantemo en condiciones de abandono.

Lo anterior abre una nueva línea de investigaciones, ya que aunque las cepas sean virulentas pero si son sensibles a fungicidas sintéticos habría que evaluar y hacer pruebas de hipersensibilidad y de tolerancia para que cuando se esté en proceso de aplicación, ya que según Chalfoun, (2007) se ha comprobado en café que cuando se aplican fungicidas del grupo de los benzimidazoles la población de *C. cladosporoides* en café se reduce drásticamente a diferencia cuando se aplican productos a base de cobre.

De las cepas evaluadas el primer parámetro que se utiliza es el índice velocidad de crecimiento micelial IVCM ya que refleja la capacidad de adaptación a crecimiento en medios sintéticos, según lo descrito por Chávez, (2006), y en base a los resultados obtenidos entre localidades existe diferencia en cuanto a este parámetro entre las diferentes cepas. Esta diferencia se utilizo para seleccionar la cepa que posteriormente se utilizo para el desarrollo en medios de propagación masiva. También habría que evaluar otros medios de aislamientos ya que los aislamientos obtenidos solo se procesaron en medio PDA, mas sin embargo otros medios ofrecen una respuesta similar o mejor, entonces para poder evaluar las cepas se propone que también se evalúen medios para evaluar el

índice de velocidad de crecimiento y la capacidad de esporulación, tal como lo plantea Riascos (2011) que caracterizó cepas de *Cladosporium* sp., donde utilizó medios como Agar sin nutrientes (ASN), Agar avena (AA), papa dextrosa Agar (PDA) y lo comparó con el manual Pantone<sup>R</sup>.

La evaluación de sustratos generó una metodología que se adaptó a las condiciones requeridas por *C. uredinicola*, en base a varias pruebas donde se calcularon volúmenes de agua, periodos de esterilización, materiales para fabricación de bolsas resistentes a esterilización por vapor entre otras pruebas realizadas para la propagación masiva donde el sustrato que mejor resultado presentó fue el maíz quebrado pre-cocido, se compara con *Trichoderma* sp., agente de control biológico que ha sido mayormente utilizado y trabajado en forma masiva en granos de arroz. (Chávez, 2006).

Aunque en materia de propagación de especies fungosas con fines de control biológico se han realizado muchos trabajos y evaluado varios tipos de sustratos, simples y combinados, como lo reporta Graboswqui (2007), donde evaluaron arroz, caña de azúcar, harina de maíz, levadura, azúcar en varias combinaciones y concentraciones, es necesario seguir evaluando mas sustratos y obtener el idóneo con fines de propagación masiva de una manera mas industrializada.

El ensayo en campo bajo las condiciones que se evaluó posterior a la cosecha regular de fin de año, no mostro diferencia significativa en las variables de incidencia y severidad en los tratamientos formulados de *C. uredinicola* sobre plántulas de crisantemo con presencia de pústulas de *P. horiana*, se considera que entre los factores que pudieron incidir es la concentración de unidades formadoras de colonia que se aplicaron por área, en base a lo anterior se plantea y recomienda realizar evaluaciones de concentraciones de esporas por volumen de agua o por área de aplicación bajo diferentes condiciones de campo y en diferentes estadios de crecimiento *P. horiana*. Esto porque se considera que la evaluación debe alcanzar las diferentes etapas fenológicas del cultivo desde el momento del trasplante de aquejes hasta la etapa de floración, que es donde según productores la roya alcanza mayor incidencia y severidad en las plantaciones.

## **11 ACTIVIDADES DE GESTIÓN, VINCULACIÓN Y DIVULGACIÓN**

En cuanto al cumplimiento de gestión se mantuvo un acercamiento con asociados a ASOFLORSA, quienes muestran su interés por la realización de la investigación. En cuanto a divulgación al llevar a cabo la parte de aplicación en campo se mantuvo la comunicación y participación de equipo de trabajo así como productores a quienes por medio de una presentación llevada a cabo durante el mes de noviembre se les informo de los resultados obtenidos en la etapa de laboratorio y sobre la importancia de la prueba a realizar en campo.

## 12 CONCLUSIONES

- Se obtuvo una cepa virulenta y de fácil crecimiento en sustrato bajo condiciones de laboratorio.
- La cepa fue obtenida en la Aldea Camino a las Trojes en el sitio marcado por las coordenadas 14°. 43.655´N, 90° 40.691´O. a 1856 msnm.
- El medio de mejor respuesta para el desarrollo masivo de *C. uredinicola*, es el maíz quebrado
- Se generó una metodología adecuada con tecnología básica para la producción masiva.
- Se acepta la hipótesis planteada, debido a que se logro producir *C. uredinicola* utilizando sustrato de bajo costo y elaborado de forma artesanal.
- En campo definitivo no se obtuvo respuesta de control probablemente debido a que la densidad de la concentración por área de unidades formadoras de colonia (UFCs) no haya sido la adecuada.

### 13 RECOMENDACIONES

- Realizar evaluaciones de concentraciones mínimas por área de unidades formadoras de colonia (UFCs), frecuencia de aplicación tomando en cuenta el estado fenológico de la planta y bajo distintas condiciones ambientales.
- Evaluar las condiciones bioclimáticas que afectan o favorecen el desarrollo de *Cladosporium* sobre *P. horiana*.
- Patentar la cepa como parte de los logros generados de la presente investigación y de los aportes de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 14 BIBLIOGRAFÍA

- Álvarez, G., Centes, L., & Robles, C. (2012). *Bioprospección de cepas silvestres de Sphaerellopsis filum y su potencial en el control de puccinia horiana en San Juan y San Pedro Sacatepequez*. FODECYT 022-2012 (En ejecución) .
- Álvarez, G., Santos, M., & Centes, L. (2013). *Bioprospección de los hiperparásitos Cicinobolus cesatii de Bary y Eudarluca caricis (Biv.) O.E. Erikss sobre cultivos y plantas adyacentes en la región central de Guatemala*. Guatemala: Dirección General de Investigación, USAC.
- CABI. (2007). *CPC-Crop protection compendium*. UK : CAB International.
- Campbell, R. (1989). *Biological control of microbial plant pathogen*. Cambridge: University Press.
- Chavéz García, M. P. (2006). Producción de Trichoderma sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Bogotá, D.C., Pontificia Universidad Javeriana.
- Chalfoun, S. Luz da Cunha R., Luiz de Carvalho, V., Nogueira, D. A. (2007) Selectivity of cupric and systemic fungicides on *Cladosporium cladosporioides* in coffee plants. *Summa phytopathol.* 33:1 Botucatu. Recuperado: Febrero de 2014, de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-54052007000100016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-54052007000100016)
- Claro, O. (2006). *Métodos artesanales de producción de bioplaguicidas a partir de hongos entomopatógenos y antagonistas*. Recuperado el Octubre de 2013, de Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV): <http://www.inisav.cu/OtraPub/METOS%ATESANALES%20DE20PRODUCCION%20DE%20BIOPLAGUICIDAS.pdf>
- Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). *The nature and practice of biological control of plant pathogen*. St. Paul Minnesota, Us. : American Phytopathological Society.
- De Maddeiros, L., Sampaio, O. M., Silva, D., Rodrigues, E., & Veiga, T. A. (2012). *Journal of the Brazilian Chemical society*. Recuperado: Febrero de 2014, de [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532012000800018&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532012000800018&lng=pt&nrm=iso)

- García, R., Zavaleta, E., Rojas, R., Leyva, S., Simpson, J., & Fuentes, G. (2005). Antagonismo de *Cladosporium* sp. contra *Puccinia horiana* Henn. causante de la roya blanca del crisantemo (*dendranthema grandiflora* Tzvelev). *Revista Mexicana de Fitopatología, A. C. Mexical Journal Othytopatology* , vol. 23, número 001.
- Goh, T. K. (1999). Single-spore isolation using a hand-made glass needle. *Revista Fungal Diversity* , 47-63.
- Graboswqui, C. J., Orrego, A., Stauffer, A. (2007). Eficiencia de sustratos sobre la esporulación de hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y *Paecilomyces* sp. *Investigación Agraria*, 7:1, Paraguay. Recuperado: Febrero de 2014, de <http://www.agr.una.py/revista/index.php/ria/article/view/134>
- Mejía, L. (2008). *Estudio de Royas en Crysantemum morifolium* RAMAT, San Juan Sacatepéquez, Guatemala. Guatemala.
- Monzón, A. (2001). *Producción y uso de hongos entomopatógenos*. Recuperado Noviembre de 2013, de Manejo integrado de plagas en Costa Rica: <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rev63/pag95-103.pdf>
- NAPPO (North American Plant Protection Organization, U. (2007). *Notificaciones oficiales de plagas, Sistema de alerta fitosanitaria: roya blanca de los crisantemos (Puccinia horiana Henn.)* . Recuperado el Octubre de 2013, de <http://www.pestalert.org/espanol/viewArchPestAlert.cfm?rid=18&keyword=puccinia%20horiana>
- Ramírez, S. S. (2009). *Trabajo de EPS realizado en la Asociación de Floricultores Sanjuaneros (ASOFLORSA) San Juan Sacatepéquez* . Guatemala: Facultad de Agronomía. Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Riascos, D. H. Caracterización etiológica de la Roña de la gulupa (*Passiflora edulis* Sims.) en la región del Sumapaz (Cundinamarca). Recuperado: Febrero de 2014, de <http://www.bdigital.unal.edu.co/6253/1/790749.2011.pdf>
- Sheta, W. (1996). *Detection of cladosporium uredinicola in pustoles of Chrysantemum White Rust (Puccinia horiana)*. Recuperado el 07 de Marzo de 2014, de Plant Disease Back Issue Abstracts: [https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Abstracts/PD\\_80\\_0599A.htm](https://www.apsnet.org/publications/PlantDisease/BackIssues/Documents/1996Abstracts/PD_80_0599A.htm)

Taquiar, J. A., Meloche, R. B., Jarvis, W. R., & Baker, K. W. (1984). *Hyperparasitism of Puccinia violae by Cladosporium uredinicola*. Obtenido de Canadian Journal of Botany: [http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b84-030?journalCode=cjb1#.Uea\\_99Lkov5](http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b84-030?journalCode=cjb1#.Uea_99Lkov5)

USDA. (s.f.). *Classification for Kingdom Plantae Down to Species Chrysanthemum morifolium Ramat.* Recuperado Octubre de 2013: <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=C HMO14>

Vásquez, J. A. (2010). *Caracterización Microbiológica y Producción de Trichoderma harzianum y Trichoderma viride en cultivo artesanal*. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana.

## 15 ANEXOS

### LISTADO DE TODOS LOS INTEGRANTES DEL EQUIPO DE INVESTIGACIÓN

<b>Contratados por la contraparte y colaboradores</b>	
Ing. Agr. Gustavo Adolfo Alvarez V.	Coordinador
Inga. Agr. María del Carmen Santos Bravo	Investigadora
P. Agro. Luis Fernando Centes Carrillo	Auxiliar de Investigación II
Br. Alba Marilia Noj Suruy	Colaborador contrapartida (Estudiante de EPS)

### CONTRATADOS POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN

<b>CONTRATADOS POR LA DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN</b>				
<b>NOMBRE</b>	<b>CATEGORÍA</b>	<b>REGISTRO DE PERSONAL</b>	<b>PAGO</b>	
			<b>SI</b>	<b>NO</b>
María del Carmen Santos Bravo	Investigador	20130253	X	
Luis Fernando Centes Carrillo	Auxiliar de Investigación II	20130255	X	



<b>Nombre</b>	<b>Firma</b>
María del Carmen Santos Bravo	
Luis Fernando Centes Carrillo	

---

Ing. Agr. Gustavo A. Álvarez  
**COORDINADOR**

---

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
**Coordinador PUICB**

---

Ing. Agr. Julio Rufino Salazar  
**Coordinador General de Programas**