

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA

The seal of the University of San Carlos of Guatemala is a circular emblem. It features a central figure of a knight on a white horse, holding a lance. Above the knight is a golden crown with a cross on top. The background of the seal includes two golden columns, a lion rampant, and a mountain range. The Latin motto "CETERAS ORBIS CONSPICUA CAROLINA ACADEMIA COACTEMALENSIS INTER" is inscribed around the perimeter of the seal.

**Trabajo de graduación: Evaluación de la  
reproducción *in vitro* de *Pratylenchus coffeae* en  
zanahoria**

MARIO ANDRES AREVALO PINTO

GUATEMALA, NOVIEMBRE DE 2017



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA

**Trabajo de graduación: Evaluación de la  
reproducción *in vitro* de *Pratylenchus coffeae* en  
zanahoria**

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

POR

MARIO ANDRES AREVALO PINTO

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRÓNOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA, NOVIEMBRE 2017



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

DOCTOR CARLOS GUILLERMO ALVARADO CEREZO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	Ing. Agr. Mario Antonio Godínez López
VOCAL PRIMERO	Dr. Tomas Antonio Padilla Cámara
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. M. A. César Linneo García Contreras
VOCAL TERCERO	Ing. Agr. M.Sc. Erberto Raúl Alfaro Ortiz
VOCAL CUARTO	P. Agr. Walter Yasmany Godoy Santos
VOCAL QUINTO	P. Cont. Neydi Yassmine Juracán Morales
SECRETARIO	Ing. Agr. Juan Alberto Herrero Ardón

Guatemala, noviembre de 2017



Guatemala, noviembre de 2017

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

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el TRABAJO DE GRADUACIÓN: **Evaluación de la reproducción *in vitro* de *Pratylenchus coffeae* en zanahoria**, como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado de Licenciado.

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

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Mario Andres Arevalo Pinto



## **ACTO QUE DEDICO**

**A:**

**Dios:**

Por darme la oportunidad de alcanzar esta meta en mi vida, por tus bendiciones hacia mi persona y mi familia. Tú sabes lo que yo pedía, ahora solo agradezco.

**Mi Mamá:**

Karla Denisse Aida Isabel Pinto Marroquín por sacarme adelante, apoyarme incondicionalmente, amarme con el alma, por tus enseñanzas, comprensión y guiarme por buen camino para alcanzar esta meta.

**Mi hermano:**

Juan Sebastián Arevalo Pinto por estar siempre, su amor y comprensión conmigo. A pesar de todas las adversidades que pueda tener la vida, si lo deseas de corazón, con esmero, perseverancia y una actitud positiva todo se logra. Que esto te sirva de ejemplo y motive para seguir tus sueños.

**Mi abuelo:**

Mario Arévalo Nuila (Q. E. P. D.) por estar siempre y en cada momento de mi vida, por ser mi ejemplo e inspiración para salir adelante y por los consejos que han sido de gran ayuda para mi vida y crecimiento. Este logro es el resultado de lo que me enseñaste en la vida, ya que siempre fuiste una persona honesta, cariñosa, luchadora, entregada a tu trabajo, pero más que todo eso, un excelente ser humano que siempre salió avante de la adversidad. Me duele en el alma que no estés físicamente en este momento, pero espero que te sientas

orgulloso donde quiera que estés. Te amo entrañablemente.

**Mi abuela:**

Cecilia Guerra de Arevalo que con la sabiduría de Dios me has guiado por el buen camino. Gracias por estar siempre conmigo, por tu paciencia, cariño, por tus consejos y por el amor que me has dado. Gracias por llevarme en tus oraciones porque estoy seguro que siempre lo haces.

**Mi abuela y tía abuela:**

Yolanda Marroquín (Q. E. P. D.) y Celeste Aida Marroquín por ser mis maestras particulares del colegio y de la vida, por sus consejos, sus enseñanzas y todos los momentos vividos. Las llevo siempre en mi memoria y mi corazón.

**Mis tíos:**

Marco Arevalo e Isabel Arias por confiar en mí, darme la oportunidad de aprender, trabajar y sobre todo por su apoyo durante el camino hasta este logro.

**Familia materna:**

Especialmente a las familias: Cabrera Pinto, Lefevbre Cabrera y Ayala Marroquín por ser la fortaleza de mis fortalezas, por estar siempre conmigo y sobre todo por su incondicional apoyo.

**Familia paterna:**

Por su apoyo para alcanzar este logro y por el cariño que me han dado.

**Mis amigos:**

A mis amigos de la vida especialmente Madeline Martínez, Andrea Romina Allara, Diego González y Rolando Riley por darme la mano cuando la vida me dio

la espalda, estar conmigo en los momentos de adversidad y alentarme a salir adelante.

**A los que no se lograr  
nombrar:**

Pero que en la palabra "GRACIAS" se reflejen cada uno de sus nombres.

## TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO

**A:**

- Dios:** Por permitirme lograr esta meta en mi vida, por todas tus bendiciones y el poder compartir esta satisfacción con mi gente.
- Mi patria:** Guatemala, poseedora de tanta diversidad, he allí tu belleza y riqueza.
- Mi alma mater:** Universidad de San Carlos de Guatemala, por darme la oportunidad de obtener este triunfo.
- Facultad de Agronomía y personal docente:** Especialmente al Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin y Dr. Amílcar Sánchez quienes con su apoyo y asesoría profesional contribuyeron en mi crecimiento en esta nueva etapa de formación profesional.
- Mi abuelo:** Mario Arévalo Nuila (Q. E. P. D.) por haber sido mi mejor amigo, un ejemplo de padre y el mejor abuelo para mí. Es por ello que te dedico este trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A:**

- Dios:** Por la vida y la oportunidad de terminar esta fase.
- Mi familia:** Por su amor y apoyo incondicional a lo largo del camino hacia este logro. Dios los bendiga.
- Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin:** Por su dedicación y ayuda en el desarrollo de este trabajo y formación profesional con mi persona.
- Dr. Amílcar Sánchez:** Por su asesoría, apoyo brindado en esta investigación.
- Agroexpertos:** Por haberme dado la oportunidad de formarme como persona y profesional.
- Pegón Piloncito:** Por darme la oportunidad de realizar mi ejercicio profesional supervisado (EPS).
- Compañeros de la facultad:** Por los momentos que pasamos y hacer mi estadía en la facultad más amena y alegre.

## ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO	PÁGINA
<b>CAPÍTULO I DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL PROGRAMA DE MEJORA CONTINUA DE LA EMPRESA PEGÓN PILONCITO, S.A.....</b>	<b>1</b>
1.1 PRESENTACIÓN.....	2
1.2 MARCO REFERENCIAL.....	3
1.2.1 Localización.....	3
1.3 OBJETIVOS.....	4
1.3.1 General.....	4
1.3.2 Específicos.....	4
1.4 METODOLOGÍA.....	4
1.4.1 Primera fase de gabinete.....	4
1.4.2 Fase de campo.....	4
1.4.3 Segundo fase de gabinete.....	5
1.4.4 Análisis de la información.....	5
1.4.5 Tercera fase de gabinete.....	5
1.5 RESULTADOS.....	5
1.5.1 Proyectos de Pegón Piloncito.....	5
1.5.2 Priorización de actividades.....	7
1.6 CONCLUSIONES.....	7
1.7 RECOMENDACIONES.....	8
1.8 BIBLIOGRAFÍA.....	8
<b>CAPÍTULO II EVALUACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN <i>in vitro</i> DE <i>Pratylenchus coffeae</i> EN ZANAHORIA.....</b>	<b>10</b>
2.1 PRESENTACIÓN.....	11
2.2 MARCO TEÓRICO.....	12
2.2.1 Marco conceptual.....	12
2.2.1.1 Biología general de los nematodos fitoparásitos.....	12
2.2.1.2 Tipos de nematodos fitoparásitos.....	12

	PÁGINA
2.2.1.3	<i>Pratylenchus coffeae</i> ..... 13
2.2.1.4	Reproducción <i>in vitro</i> de nematodos..... 18
2.2.2	Marco referencial..... 20
2.2.2.1	ANALAB..... 20
2.2.2.2	Ubicación geográfica El Platanar..... 20
2.3	OBJETIVOS..... 22
2.3.1	General..... 22
2.3.2	Específicos..... 22
2.4	HIPÓTESIS..... 22
2.5	METODOLOGÍA..... 22
2.5.1	Procedimiento..... 22
2.5.1.1	Preparación del medio de cultivo agar y agua (1%)..... 23
2.5.1.2	Preparación de los discos y cilindros de zanahoria <i>in vitro</i> ..... 23
2.5.1.3	Extracción de nematodos de raíces infectadas..... 25
2.5.1.4	Identificación de <i>Pratylenchus coffeae</i> ..... 28
2.5.1.5	Selección y esterilización de los nematodos..... 28
2.5.1.6	Inoculación de <i>P. coffeae</i> a los discos y cilindros de zanahoria..... 29
2.5.2	Diseño experimental..... 30
2.5.2.1	Modelo estadístico..... 31
2.5.3	Tratamientos repeticiones..... 31
2.5.3.1	Unidad experimental..... 32
2.5.3.2	Arreglo espacial..... 32
2.5.3.3	Descripción de la variable a medir..... 32
2.5.3.4	Análisis de la información..... 33
2.6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... 33
2.6.1	Extracción e identificación de <i>P. coffeae</i> ..... 34

	PÁGINA	
2.6.2	Primer conteo de <i>P. coffeae</i> después de la inoculación en zanahorias.....	34
2.6.3	Segundo conteo de <i>P. coffeae</i> después de la inoculación en zanahorias.....	35
2.6.4	Tercer conteo de <i>P. coffeae</i> después de la inoculación en zanahorias.....	37
2.7	CONCLUSIONES.....	40
2.8	RECOMENDACIONES.....	40
2.9	BIBLIOGRAFÍA.....	40
2.10	ANEXOS.....	44
<b>CAPÍTULO III SERVICIOS REALIZADOS EN LA EMPRESA PEGÓN PILONCITO, S.A.....</b>		<b>49</b>
3.1	Presentación.....	50
3.1.1	Servicio I.....	51
3.1.2	Introducción.....	51
3.2	Objetivos.....	52
3.2.1	General.....	52
3.2.2	Específico.....	52
3.3	Metodología.....	52
3.3.1	Protocolo de investigación.....	52
3.3.2	Establecimiento de la investigación.....	53
3.4	Materiales.....	53
3.4.1	Preparación del medio de cultivo agar y agua (1%).....	53
3.4.2	Preparación de los discos y cilindros de zanahoria <i>in vitro</i> .....	54
3.4.3	Extracción de nematodos de raíces infectados.....	55
3.4.4	Identificación de <i>Pratylenchus coffeae</i> .....	55
3.4.5	Selección y esterilización de los nematodos.....	56
3.4.6	Inoculación de <i>P. coffeae</i> en zanahoria.....	56
3.5	Evaluación de resistencia en macetas.....	57
3.5.1	Materiales.....	57

	PÁGINA
3.5.2	Obtención de las semillas..... 57
3.5.3	Clasificación de las semillas..... 58
3.5.4.1	Preparación del sustrato..... 58
3.5.4.2	Selección de plantas para trasplante a macetas..... 59
3.5.4.3	Trasplante de plántulas a macetas..... 59
3.5.4.4	Aplicación de fertirriego..... 59
3.5.4.5	Inoculación de nematodos..... 60
3.6	Evaluación de resistencia en campo..... 60
3.6.1	Materiales..... 60
3.6.1.1	Obtención de la semilla..... 60
3.6.1.2	Clasificación de la semilla..... 61
3.6.1.3	Siembra de la semilla..... 61
3.6.1.4	Injertado..... 62
3.6.1.4.1	Selección de plantas para injerto (Patrones).. 62
3.6.1.4.2	Selección de plantas para injerto (Sarchimor)..... 62
3.6.1.4.3	Realización del injerto..... 62
3.6.1.5	Trasplante a tubete..... 62
3.6.1.5.1	Preparación del sustrato..... 62
3.6.1.5.2	Trasplante de injertos a tubete..... 63
3.6.1.6	Aplicación de fertirriego..... 63
3.6.1.6.1	Trasplante a campo..... 63
3.7	Manejo Fitosanitario..... 64
3.8	Resultados..... 65
3.9	Conclusiones..... 66
3.10	Bibliografía..... 67
3.11	Servicio II..... 68
3.11.1	Introducción..... 68
3.12	Objetivo..... 69

	PÁGINA
3.12.1 General.....	69
3.13 Metodología.....	69
3.13.1 Obtención de registros históricos en monitoreos.....	69
3.13.2 Revisión bibliográfica.....	69
3.13.3 Elaboración del manual de identificación de enfermedades.....	70
3.14 Resultados.....	70
3.15 Conclusión.....	71
3.16 Bibliografía.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
Figura 1. Almácigo de café de Pegón Piloncito.....	3
Figura 2. Invernadero de producción de pilones de Pegón Piloncito.....	3
Figura 3. Morfología de <i>P. Coffeae</i> .....	14
Figura 4. Mapa de distribución geográfica de <i>Pratylenchus spp.</i> en Guatemala.....	15
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Pratylenchus Coffeae</i> .....	17
Figura 6. Ubicación finca El Platanar.....	21
Figura 7. Medio de cultivo agar y agua calentado en estufa.....	23
Figura 8. Autoclave utilizada para esterilización de materiales.....	23
Figura 9. Desinfección de zanahorias en hipoclorito de sodio.....	24
Figura 10. Remoción de la epidermis de zanahoria con pelador.....	24
Figura 11. Corte con perforador cilíndrico.....	25
Figura 12. Preparación unidades experimentales.....	25
Figura 13. Selección de planta de café infectadas por nematodos.....	26
Figura 14. Toma de muestras de raíces de plantas de café.....	26
Figura 15. Selección de raíces con síntomas típicos provocados por <i>Pratylenchus spp.</i> .....	26
Figura 16. Lavado de raíces.....	26
Figura 17. Corte de raíces.....	27
Figura 18. Extracción de nematodos con aireación.....	27
Figura 19. Colecta de nematodos.....	27
Figura 20. Identificación morfológica y selección de nematodos.....	28
Figura 21. Desinfección de <i>P. coffeae</i> con sulfato de estreptomycin.....	29
Figura 22. Inoculación de <i>P. coffeae</i> .....	30
Figura 23. Indicador de una buena reproducción.....	30
Figura 24. Masas de <i>P. coffeae</i> .....	30
Figura 25. Aleatorización de los tratamientos.....	32
Figura 26 a. Gráfica del comportamiento del tratamiento 1.....	47
Figura 27 a. Gráfica del comportamiento del tratamiento 2.....	47
Figura 28 a. Gráfica del comportamiento del tratamiento 3.....	48
Figura 29 a. Gráfica del comportamiento del tratamiento 4.....	48

	PÁGINA
Figura 30. Portadas de cada fase del protocolo.....	65
Figura 31. Investigación en maceta establecido.....	66
Figura 32. Rotulación de los bloques y tratamientos.....	66
Figura 33. Planta de café en maceta.....	66
Figura 34. Pilonos de café injertados para trasplantarlos a campo definitivo.....	66
Figura 35. Anverso de la enfermedad <i>Botrytis spp.</i> del manual de identificación de enfermedades.....	70
Figura 36. Reverso de la enfermedad <i>Botrytis spp.</i> del manual de identificación de enfermedades.....	70
Figura 37. Anverso de la enfermedad <i>Mycena citricolor</i> u “ojo de gallo”, del manual de identificación de enfermedades.....	71
Figura 38. Reverso de la enfermedad de <i>Mycena citricolor</i> u “ojo de gallo”, del manual de identificación de enfermedades.....	71
Figura 39. Anverso de la enfermedad <i>Colletotrichum gloesporoides</i> o “antrachosis”, del manual de identificación de enfermedades.....	71
Figura 40. Reverso de la enfermedad <i>Colletotrichum gloesporoides</i> o “antrachosis”, del manual de identificación de enfermedades.....	71

## ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
Cuadro 1. Descripción general de los tratamientos.....	31
Cuadro 2. Promedio de número de larvas de <i>Pratylenchus coffeae</i> (20 días después de inoculado en las unidades experimentales).....	34
Cuadro 3. Promedio de número de larvas de <i>Pratylenchus coffeae</i> (40 días después de inoculado en las unidades experimentales).....	35
Cuadro 4. Promedio de número de larvas de <i>Pratylenchus coffeae</i> (60 días después de inoculado en las unidades experimentales).....	37
Cuadro 5 a. Análisis de la varianza de <i>Pratylenchus coffeae</i> (20 días después).....	44
Cuadro 6 a. Resumen de la varianza de <i>Pratylenchus coffeae</i> (20 días después).....	44
Cuadro 7 a. Prueba de tukey para el factor zanahoria (20 días después).....	44
Cuadro 8 a. Prueba de tukey para el factor agar y agua (20 días después).....	44
Cuadro 9 a. Análisis de la varianza de <i>Pratylenchus coffeae</i> (40 días después).....	45
Cuadro 10 a. Resumen de la varianza de <i>Pratylenchus coffeae</i> (40 días después).....	45
Cuadro 11 a. Prueba de tukey para el factor zanahoria (40 días después).....	45
Cuadro 12 a. Prueba de tukey para la interacción zanahoria y el agar y agua (40 días después).....	45
Cuadro 13 a. Análisis de la varianza de <i>Pratylenchus coffeae</i> (60 días después).....	46
Cuadro 14 a. Resumen de la varianza de <i>Pratylenchus coffeae</i> (60 días después).....	46
Cuadro 15 a. Prueba de tukey para el factor zanahoria (60 días después).....	46
Cuadro 16 a. Prueba de tukey para la interacción zanahoria y el agar y agua (60 días después).....	46
Cuadro 17. Productos a usar en fertirriego.....	59
Cuadro 18. Productos a usar en fertirriego.....	63
Cuadro 19. Principales enfermedades del café y su control preventivo.....	64

# TRABAJO DE GRADUACIÓN: EVALUACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN *in vitro* DE *Pratylenchus coffeae* EN ZANAHORIA

## RESUMEN

Uno de los mayores problemas en la producción del cultivo de café son los nematodos fitoparásitos, siendo *Pratylenchus coffeae* el más importante debido a su amplia distribución en Guatemala y a los daños que ocasiona. A nivel mundial, la producción de café pierde un 15% debido a los nematodos (Villain *et al.*, 2001).

Los ataques de nematodos en café se han reportado en Guatemala desde hace más de medio siglo, pero debido a su comportamiento migratorio y a los daños que ocasiona había sido subestimado hasta hace poco tiempo (Villain, 2008). Esta conciencia surgió gracias a recientes estudios en varios aspectos de este nematodo, sin embargo, aún existe escasez de conocimiento, es por ello la necesidad de instruirse y seguir generando información acerca de *P. coffeae*.

Uno de los aspectos más importantes para obtener poblaciones abundantes de este nematodo para realizar ensayos, es definir un método eficiente y confiable de multiplicación. Pocos investigadores han reproducido *P. coffeae in vitro*, sin embargo, hay ciertas carencias como: falta de información detallada, falta de descripciones de la técnica en la literatura y la fácil contaminación de la zanahoria, que contribuyen a que sean frecuentes los fracasos por lograr el objetivo.

En referencia lo anterior, se realizó esta investigación con el objeto de definir una metodología de multiplicación para *Pratylenchus coffeae in vitro* que fuera efectiva para intensificar su estudio de forma rápida y económica. Tomando como base la técnica de multiplicación *in vitro* utilizando zanahoria, propuesta por O'Bannon y Taylor (1968), se evaluó haciendo modificaciones en la forma física de la zanahoria; así mismo, de las condiciones de humedad. Se evaluaron dos factores para conformar los tratamientos en

este ensayo. El primero fue la forma de la zanahoria: disco y cilindro, el segundo fue el medio agar y agua: con y sin aplicación en las cajas de Petri. De acuerdo a investigaciones similares se tomaron estos factores para su evaluación.

Todas las unidades experimentales se prepararon una semana antes de inocularlas con *P. coffeae*. Iniciando con la esterilización de todos los materiales, preparación y aplicación del medio de cultivo agar y agua a las cajas de Petri. Seguidamente se procedió a la limpieza y desinfección de las zanahorias para realizar los discos y cilindros, luego se colocaron en sus respectivas cajas de Petri. Consecuentemente, se muestrearon raíces de plantas de café con síntomas de nematodos, extrayendo *P. coffeae* para así desinfectarse con sulfato de estreptomicina e inocularse un aproximado de 50 nematodos a las unidades experimentales. Posteriormente, se incubaron y se tomaron lecturas de la población de *P. coffeae* a los 20, 40 y 60 días después de haberse inoculado.

Los resultados obtenidos muestran que utilizando el tratamiento de discos de zanahoria y aplicando medio de cultivo agar y agua a las cajas de Petri, la población se incrementa 46 veces en relación a su población inicial de 50 individuos a los sesenta días después de haberse inoculado.

Dentro del Ejercicio Profesional Supervisado, se desarrollaron una serie de servicios en la empresa Pegón Piloncito, S.A., de la Agropecuaria Popoyán, localizada en la aldea El Jocotillo, del municipio de Villa Canales, del departamento de Guatemala, ubicada a una distancia de 44.5 km de la ciudad capital, a través de diversas actividades de interés por parte de la empresa, como era establecer un protocolo para la evaluación de tolerancia-resistencia de cuatro patrones de café a *P. coffeae*, fijar esta misma investigación en campo, elaborar un manual de identificación de enfermedades a nivel pilón y producir fichas técnicas para cada uno de los pilones que tiene la empresa. Los objetivos comprendían solucionar las necesidades principales del departamento de mejora continua, enfocado en buscar un incremento de la innovación que conlleve un aumento en las ventas.

CAPÍTULO I: DIAGNÓSTICO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DEL PROGRAMA DE MEJORA CONTINUA DE LA EMPRESA PEGÓN PILONCITO S.A.





## 1.1 Presentación

Pegón Piloncito es la marca bajo la cual Agropecuaria Popoyán pone a disposición del mercado pilones de la más alta calidad. Estos pilones son producidos bajo los controles de calidad y fitosanidad más estricta de la industria para garantizar su calidad. Se producen pilones de todo tipo de hortalizas, especializándose en tomate y chile. Además se producen pilones de brócoli, lechuga, cebolla, melón, sandía, café, arboles forestales, entre otros.

El departamento de mejora continua tiene como objetivo llevar a cabo investigaciones y ensayos de los procesos de la empresa para buscar un incremento de la innovación que conlleve un aumento en las ventas.

Pegón Piloncito realiza investigación en busca de mejorar sus procesos de producción, ser más eficiente, más rentable y ofrecer la mejor calidad de sus productos. Entre los temas manejados se encuentran: sustratos, fertirriego, propagación de plantas, toxicidad a plantas de nuevos productos, riego, germinación y almacenamiento de semilla, entre otros.

En el año 2015 hubo un acercamiento entre ANACAFE y el grupo Popoyán en el cual se formó un vínculo de trabajo para evaluar diferentes patrones de café tolerantes-resistentes al nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*). Actualmente en el mercado se encuentra un porta-injerto llamado “Nemaya” desarrollado en los años 80’s tolerante a estos nematodos (Anzueto, *et al.*, 1996), sin embargo productores señalan que este patrón ya perdió su efecto y los nematodos se adaptaron a él; es por ello la importancia de esta investigación ya que el daño económico de estos nematodos en café es alrededor del 15% (Villain, *et al.*, 2001).

Para poder llegar a realizar la evaluación de resistencia de patrones de café a los nematodos, fue necesario realizar el protocolo, establecer el ensayo y redactar la información obtenida para publicarla. La principal limitante en esta actividad es que no

existe información detallada de alguna investigación similar, además de la falta de experiencia en esta área (nematodos fitoparásitos).

## 1.2 Marco Referencial

### 1.2.1 Localización geográfica

#### A. Pegón Piloncito

La empresa Pegón Piloncito, de la Agropecuaria Popoyán, cuenta con almácigos (figura 1) e invernaderos (figura 2) los cuales están localizados en la aldea El Jocotillo, del municipio de Villa Canales, del departamento de Guatemala, ubicada a una distancia de 44.5 km de la ciudad capital. Tiene una altitud promedio de 1,100 m s.n.m., y se encuentra en las coordenadas: 14° 19` 27" a 14° 21` 55" latitud norte, 90 ° 29` 20" a 90 ° 31` 23" longitud oeste (MAGA, 2017). La temperatura del lugar puede variar entre 22 ° C a 36 ° C, con máximas de 38 ° C y mínimas de 20 ° C fuera de los invernaderos y dentro de los invernaderos pueden variar entre 18 ° C y 40 ° C. La humedad relativa afuera de los invernaderos oscila entre 60 % y 95 % y dentro de los invernaderos oscila entre 37 % a 92%.



**Figura 1.** Almácigo de café de Pegón Piloncito.



**Figura 2.** Invernaderos de producción de pilones de Pegón Piloncito.

## **1.3 Objetivos**

### 1.3.1 General

Diagnosticar la situación actual de los proyectos de investigación del Departamento de Mejora Continua de la empresa Pegón Piloncito.

### 1.3.2 Específicos

1. Realizar un listado de los proyectos de investigación que interesan a la empresa Pegón Piloncito, priorizando los proyectos de mayor trascendencia.
2. Identificar debilidades o problemas que puedan afectar las actividades que la empresa Pegón Piloncito realiza.

## **1.4 Metodología**

### 1.4.1 Primera fase de gabinete

En esta fase realizó a través de la consulta de fuentes bibliográficas y entrevistas a las personas del departamento de mejora continua de la empresa con el objetivo de adquirir conocimiento acerca de las actividades que se realizan en la empresa y el lugar donde estas se llevan a cabo.

### 1.4.2 Fase de campo

Esta fase consistió en un recorrido por las instalaciones de la empresa iniciando por las oficinas centrales, realizando entrevistas a las personas encargadas del departamento de mejora continua, para recabar información sobre antecedentes de las actividades realizadas. Se realizó una visita guiada por la finca de la empresa, enfocándonos en almacigos e invernaderos.

### 1.4.3 Segunda fase de gabinete

Dentro de esta fase se indagó acerca de las áreas que están dentro del Departamento de Mejora Continua en la empresa en los últimos años y se identificaron los siguientes:

- Injertos
- Fertirriego
- Labores culturales
- Fitosanidad
- Viveros

### 1.4.4 Análisis de la información

Se compiló la información obtenida en el campo para su análisis, se elaboró un listado de principales actividades a ser realizadas dentro del programa de mejora continua de la empresa para priorizar los proyectos más importantes posibles y sugerir cambios útiles para mejorar su ejecución.

### 1.4.5 Tercera fase de gabinete

En esta fase se elaboró el presente documento, con toda la información recopilada en las fases anteriores.

## 1.5 Resultados

### 1.5.1 Proyectos de Pegón Piloncito

En el área de Investigación de Pegón Piloncito, se realizan diversos proyectos internos con el fin de mejorar sus procesos de producción, ser más eficiente, ser más

rentable y ofrecer la mejor calidad de sus productos. "Walter Girón señaló que entre los temas manejados se encuentran: sustratos, fertirriego, propagación de plantas, toxicidad a plantas de nuevos productos, riego, germinación y almacenamiento de semilla, entre otros. Sin embargo, debido al reciente vínculo de trabajo, entre grupo Popoyán y ANACAFE, el enfoque primario será el evaluar diferentes patrones de café tolerantes-resistentes a nematodos fitoparásitos (*Pratylenchus coffeae*) para su aprovechamiento como porta – injertos" (Girón, 2016).

- Evaluación de tolerancia-resistencia de patrones de café (*Coffea canephora*) seleccionados al ataque del nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*) y al nematodo agallador (*Meloidogyne spp.*)

Debido a su comportamiento migratorio y los síntomas que induce – necrosis radicular no específico, *Pratylenchus coffeae* ha sido subestimado en términos de su importancia en el cultivo de café hasta finales del siglo pasado. En el país se ha utilizado, desde hace varios años, el porta-injerto denominado "Nemaya", el cual presenta cierta tolerancia al ataque del nematodo. Debido a la producción intensificada a través de la utilización de variedades de mayor rendimiento a densidades más altas, el impacto de los nematodos se ha vuelto un problema fuerte (Anzueto, 1993). El nematodo lesionador es el de mayor importancia en Guatemala y está ampliamente distribuido en todo el territorio nacional (Villain, 2000). Por ello es de suma importancia encontrar un porta - injerto resistente al ataque de esta plaga, ya que contribuirá a tener una caficultura sostenible, competitiva y de calidad.

En esta investigación se evaluarán 4 patrones de café (Anacafé 14, Parainema, Icatú y propiamente Nemaya) y así poder determinar la mejor línea de *C. canephora* en cuanto a su resistencia y tolerancia a *P. coffeae*; para su aprovechamiento como porta-injerto (sistema Hypocotiledonar) en el proseguimiento de los programas de mejoramiento del cafeto. Así mismo determinar la dinámica de la penetración del nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*) en las raíces del cafeto (*C. canephora*).

La investigación se divide en: una fase de macetas, la cual tiene un tiempo de 1 año, y la fase de campo definitivo, la cual tiene un tiempo estimado de 3 años.

### 1.5.2 Priorización de actividades

De acuerdo al proyecto las prioridades es el establecimiento de un protocolo detallado de toda la investigación así como determinar una fuente de inóculo de los nematodos a evaluar para utilizarlo en la evaluación. Además se encuentra una solicitud de parte del departamento de fitosanidad para la elaboración de un manual de identificación de enfermedades y por parte de gerencia para la elaboración de fichas técnicas para cada uno de sus pilones que tienen a la venta.

### 1.6 Conclusiones

1. El departamento de mejora continua se enfoca en mejorar sus procesos de producción, ser más eficiente, más rentable y ofrecer la mejor calidad de sus productos. Las áreas que se trabaja están: injertos, fitosanidad, labores culturales, viveros y fertirriego. Entre los temas manejados se encuentran: sustratos, fertirriego, propagación de plantas, toxicidad a plantas de nuevos productos, riego, germinación y almacenamiento de semilla, entre otros.
2. Dentro de los principales temas de interés de la empresa Pegón Piloncito y su departamento de mejora continua se encuentran:
  - Evaluar 4 patrones de café para determinar su resistencia al nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*) para su aprovechamiento como porta – injerto.
  - Encontrar una fuente de inóculo, del nematodo lesionador (*P. coffeae*), rápida y eficiente.
  - Elaborar un manual de identificación de enfermedades para utilizarlos en los muestreos de fitosanidad.

— Elaborar fichas técnicas de cada uno de los pilones que se tienen a la venta.

3. El principal problema que se tiene para llevar a cabo el ensayo sobre los patrones café es la falta de información para realizar este tipo de evaluaciones, además de no contar con nadie de experiencia sobre el tema en el departamento de mejora continua.

## 1.7 Recomendaciones

De acuerdo al diagnóstico se tomó como prioridad la investigación de patrones de café para su aprovechamiento como porta – injerto, empezando por realizar el respectivo protocolo y encontrar una fuente rápida y eficiente de inóculo del nematodo lesionador (*P. coffeae*) para utilizar dentro de la investigación.

## 1.8 Bibliografía

1. Anzueto, F. 1993. Etude de la resistance du cafeier (*Coffea* sp.) à *Meloidogyne* sp. et *Pratylenchus* sp. Tesis PhD. Rennes, France, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. p. 55 – 78.
2. Anzueto, F; Bertrand, B; Peña, M *et al.* 1996. Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales nematodos de América Central. *In* Simp. Caficultura Latino-Americana (1996, Guatemala). Proceedings. Guatemala. 7 p.
3. Girón, W. 2016. Empresa Pegón Piloncito y su proyección (entrevista). El Jocotillo, Villa Canales, Guatemala, Empresa Pegón Piloncito.
4. MAGA (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala). 2000. Mapas temáticos digitales de la república de Guatemala. Guatemala. Esc. 1:250,000. Color. 1 CD.

5. Villain, L. 2000. Caractérisation et bioécologie du complexe parasitaire du genre *Pratylenchus* (Nemata: Pratylenchidae) présent sur caféiers (*Coffea* sp.) au Guatemala. Tese Doutorado. Montpellier, França, CIRAD. p. 471-475.
6. Villain, L; Pignolet, L; Michau-Ferrière, N *et al.* 2001. Evidence of resistance factors to *Pratylenchus* spp. on *Coffea canephora*. *Nematropica* 11(31):163.



CAPÍTULO II: Evaluación de la reproducción *in vitro* de *Pratylenchus coffeae* en zanahoria.

Evaluation of the *in vitro* reproduction of *Pratylenchus coffeae* on carrot.





## 2.1 Presentación

Los nematodos parasíticos son uno de los mayores limitantes en la producción de café (*Coffea sp.*). A nivel mundial, la producción de café pierde un 15% debido a los nematodos (Campos *et al.*, 1990). Los ataques de nematodos en café se han reportado en Guatemala (Schieber y Sosa, 1960; Fernández, 1968), pero hasta hace un tiempo es que el problema es considerado serio (Villain *et al.*, 1999).

El nematodo lesionador (*Pratylenchus spp.*) es el de mayor importancia en este cultivo y se encuentra distribuido ampliamente en Guatemala (Villain *et al.*, 1999). Sus daños son básicamente mecánicos, con la formación de lesiones que pueden ser invadidas por patógenos secundarios como bacterias u hongos, acelerando el proceso de degradación de las raíces, sobre todo la corteza.

Con la multiplicación de *Pratylenchus coffeae in vitro* se puede intensificar el estudio de la taxonomía, biología, epidemiología y control del patógeno. Para ello es de suma importancia establecer una metodología eficiente y con mejores resultados en la multiplicación, ya que hay falta de información detallada en la literatura y falta de descripciones en la técnica que hacen que los fracasos sean frecuentes en los investigadores que la utilizan.

En la presente investigación, se buscó evaluar la metodología de multiplicación *in vitro* de *Pratylenchus coffeae* en zanahoria haciendo modificaciones en dos factores. El primero fue la forma de la zanahoria: disco y cilindro, el segundo fue la condición de humedad: con y sin aplicación del medio agar y agua en las cajas de Petri; y así determinar el mejor tratamiento para la reproducción de inóculo para el estudio y ensayos con esta especie.

El uso de agar y agua crea condiciones ideales para la multiplicación de las poblaciones del nematodo, manteniendo en buen estado la consistencia y el aspecto de la zanahoria, obteniendo tasas de multiplicación altas; a los 60 días después de haberse inoculado se obtuvieron los mejores resultados en el disco de zanahoria con un promedio de 2300 nematodos.

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 Marco Conceptual

#### 2.2.1.1 Biología general de los nematodos fitoparásitos

Los nematodos fitoparásitos son vermiformes (forma de gusano) semejantes a hilos con un tamaño que oscila entre 0.25 mm a  $> 1.0$  mm de longitud. Los nematodos tienen una gran variedad de formas y tamaños, cuentan con sistema circulatorio, respiratorio y digestivo (Villain *et al.*, 1999).

Los nematodos fitoparásitos se diferencian de otros nematodos que se alimentan de bacterias y hongos en que tienen una estructura especializada para su alimentación llamada estilete con forma de lanza. El nematodo utiliza el estilete para inyectar enzimas dentro de las células y tejidos vegetales y extraer su contenido (Villain *et al.*, 1999).

#### 2.2.1.2 Tipos de nematodos fitoparásitos

Los nematodos fitoparásitos se pueden agrupar por su hábito y movilidad en tres grupos principales:

- Endoparásitos migratorios: nematodos móviles que se alimentan dentro del tejido radical (Agrios, 2005).
- Endoparásitos sedentarios: nematodos que, una vez alcanzado el sitio de alimentación dentro de la planta, cesan de ser móviles y se alimentan desde un sitio fijo (Agrios, 2005).
- Ectoparásitos: nematodos que se alimentan de la planta desde el exterior sin invadir la misma (Agrios, 2005).
- Endoparásitos migratorios

Todos los estadios del ciclo de vida de los nematodos endoparásitos son móviles excepto el huevo. Los nematodos perforan el tejido vegetal desplazándose de célula en célula,

o pueden abandonarlo en busca de nuevos sitios de alimentación. Mientras se alimentan normalmente depositan los huevos dentro del tejido cortical de la planta y también en el suelo que rodea la raíz. Con frecuencia, los hongos que producen podredumbre de las raíces y las bacterias se encuentran asociados con las infestaciones de los nematodos migratorios y entran en los tejidos de la planta a través de las zonas dañadas por los nematodos (Agrios, 2005).

### 2.2.1.3 *Pratylenchus coffeae*

Reino:	Animalia
Phylum:	Nematoda
Clase:	Adenophorea
Orden:	Tylenchida
Familia:	Pratylenchidae
Género:	<i>Pratylenchus</i>
Especie:	<i>Pratylenchus coffeae</i>
Taxonomía (Agrios, 2005)	

#### A. Morfología

La región de la cabeza es baja y aplanada, con 2-4 anillos. Tienen un esqueleto de la cabeza distinto, continuo con el contorno del cuerpo. El estilete es de 20  $\mu\text{m}$  o menos, y moderadamente desarrollado con nódulos basales distintos. El esófago tiene un bulbo central bien desarrollado, y los lóbulos posteriores de la glándula se superponen ventralmente del intestino (Villain *et al.*, 1998). La hembra tiene una vulva posterior con una sola gónada anterior y un saco cortó post vulva, es alto, cilíndrico a conoide. La cola masculina es cónica con una bursa distinta que le llega a la punta de la cola (Villain, 2000).

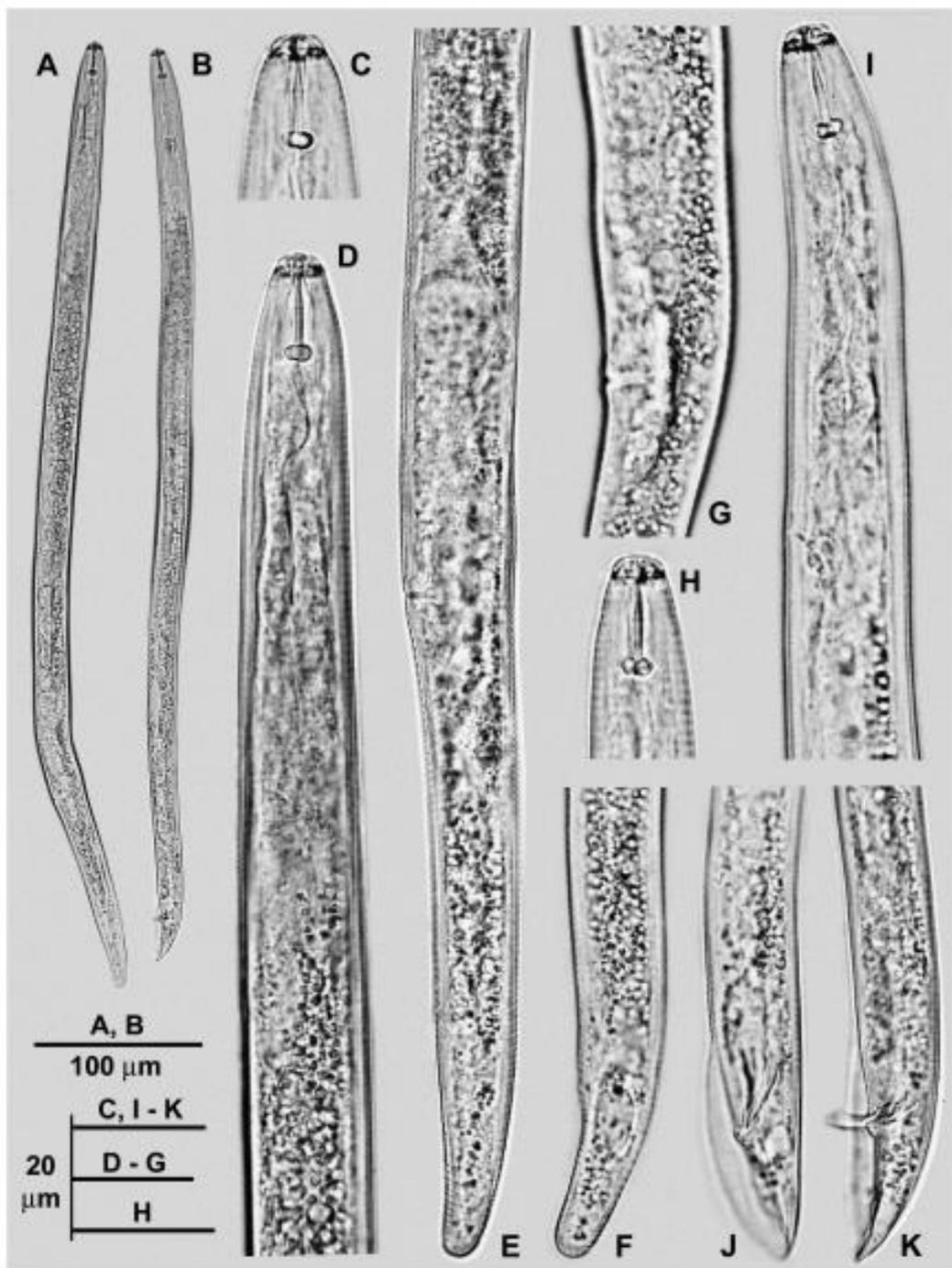
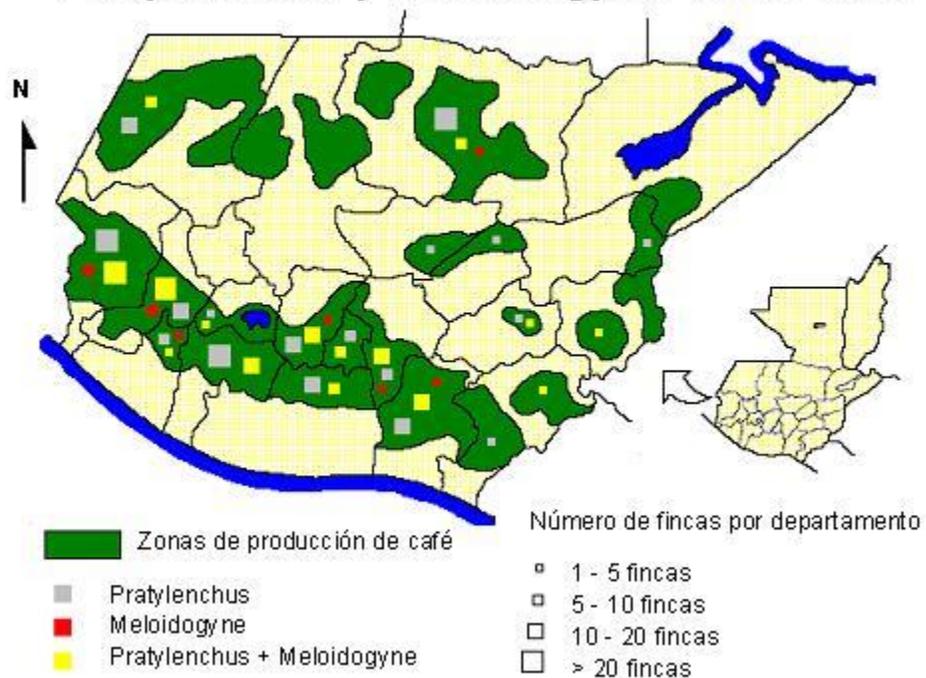


Figura 3. Morfología de *P. coffeae*; en donde A, B) Hembra y macho. C) Extremo anterior de la hembra. D) Región de la faringe de la hembra. E) Región posterior del cuerpo de la hembra. F) Cola de la hembra. G) Región de la vulva. H) Extremo anterior del macho. I) Región de la faringe del macho. J, K) Cola del macho.

## B. Distribución

Los dos principales géneros o grupos de nematodos parásitos del cafeto en Guatemala, son los nematodos "lesionadores" (*Pratylenchus*) y los nematodos "agalladores" (*Meloidogyne*). Datos recientes indican que, en la zona Sur y Suroccidental, aproximadamente el 20 % de los cafetales presenta fuertes niveles de daño ocasionados por nematodos, con pérdidas de producción de hasta 60% en los lotes afectados (Villain *et al.*, 1999). En la figura 2 se puede observar cómo es la distribución de estos nematodos en el cultivo del café, en el que predomina la presencia de *Pratylenchus*.

### Distribución geográfica de los dos géneros *Pratylenchus* y *Meloidogyne* sobre café



**Figura 4** .Mapa de distribución geográfica de *Pratylenchus* spp. en Guatemala.

Fuente: Hervé G. *et al.*, 2005.

### C. Hábitat

Este nematodo es un endoparásito migratorio de raíces, encontrado en el suelo y raíces de las plantas que crecen en las tierras altas tropicales y subtropicales (Villain *et al.*, 1999).

### D. Hospederos/Especies afectadas

*P. coffeae* es una especie polífaga con una amplia gama de huéspedes de más de 250 especies de plantas que cubren casi todas las familias de plantas. Hasta el momento, no se ha hecho la lista de todas las especies de hospederos; la lista se ha limitado a los cultivos más importantes que afectan. Entre los hospederos de *P. coffeae* se encuentra el café, cítricos, hortalizas, plantas ornamentales y malezas (Schieber, 1971).

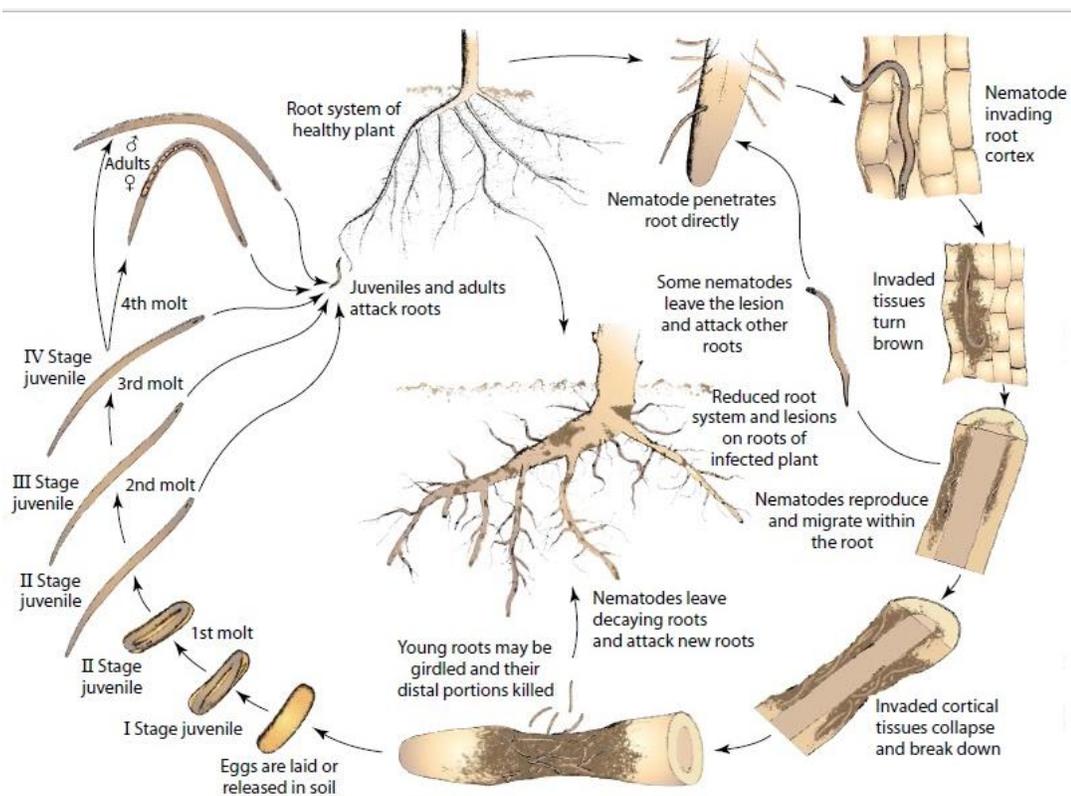
### E. Síntomas que provoca

Los síntomas ocasionados por este nematodo a nivel del sistema radicular se caracterizan por un necrosamiento progresivo a partir de los puntos de infestación del nematodo que destruye el parénquima cortical. Por esta razón, al examinar las raíces, se puede observar que el córtex que toma un color café se suelta muy fácil del cilindro central. A partir de estos daños mecánicos, es que las raíces se vuelven vulnerables y pueden ser invadidas por patógenos secundarios como bacterias u hongos, acelerando el proceso de degradación de las raíces, sobre todo en la corteza, y dejando la apariencia de “pelillos en las raíces más finas (Villain *et al.*, 2002).

Estos daños también van ocasionando manifestaciones de problemas nutricionales que se van haciendo notorias en las partes aéreas de las plantas de café, principalmente cuando estas entran en su etapa productiva. Los cafetos padecen entonces de un agotamiento precoz, lo que puede ocasionar la muerte de hasta un 40% de plantas (Villain *et al.*, 1994).

## F. Ciclo de vida

*P. coffeae* tiene un ciclo de vida entre 30 - 40 días a una temperatura entre 25 °C - 30 °C, y de 50 - 60 días a 20 °C. La longevidad del ciclo de vida depende de la temperatura (Corbett, 1973). El ciclo de vida de *Pratylenchus* sigue este orden: huevo, juvenil y adulto. Los huevos son depositados, individualmente o en pequeños grupos, dentro de los tejidos de las raíces y eclosionan cuando el nematodo está en el segundo estado juvenil. La fase juvenil cuenta con cuatro etapas hasta madurar, se diferencian en la raíz para convertirse en adultos hembra o macho; todos estos son infectivos a las raíces. (Agrios, 2005).



**Figura 5.** Ciclo de vida de *Pratylenchus coffeae*.

Fuente: Agrios, 2005.

## G. Importancia económica

*Pratylenchus coffeae* pertenece al grupo considerado segundo lugar en términos de pérdidas en la agricultura y especies de plantas parasitadas, sobrepasado por el nematodo agallador de la raíz, *Meloidogyne* (Sasser y Freckman, 1987). Se estima que actualmente, a nivel mundial, la pérdida por nematodo, principalmente *P. coffeae*, en café es del 15 % (Campos *et al.*, 1990).

### 2.2.1.4 Reproducción *in vitro* de nematodos

Los nematodos pueden alimentarse como ectoparásitos y endoparásitos, por lo tanto, su hábito alimenticio determina el tipo de tejido de la planta que se necesita para su reproducción o cultivo (Coyne *et al.*, 2014).

Los nematodos que se alimentan en el tejido vascular, induciendo una respuesta del huésped específico, requieren una diferenciación del tejido de reproducción en doble callo. Este es el caso de los nematodos endoparásitos sedentarios como: *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Globodera*.

En contraste, los nematodos migratorios no requieren elementos vasculares, y se reproducen fácilmente en tejido de callo indiferenciado o un material como discos de zanahoria. La zanahoria ha demostrado ser un medio adecuado para la multiplicación de nematodos de las especies migratorias como *Pratylenchus* y *Radopholus* (Gonzaga y Santos, 2010).

## A. Antecedentes

Técnicas de cultivo monoxénicas aceptables no fueron posibles hasta los años sesenta en un trabajo realizado por Mountain con *Pratylenchus penetrans* en el cultivo de tabaco y melocotón. Sin embargo, varios métodos para producción de inóculo se han desarrollado, el cultivo monoxénico en discos de zanahoria ha sido una de las técnicas ampliamente utilizadas por nematólogos. En este método, la

zanahoria es desinfectada superficialmente con alcohol al 95 % e inoculada con nematodos esterilizados superficialmente (Castillo et al., 1995).

Además, cultivos monoxénicos en discos de zanahoria provee condiciones estándares para la producción de inóculo, permitiendo comparaciones de tasas de multiplicación entre las poblaciones de nematodos. Adicionalmente, discos de zanahoria monoxénicos se han utilizado con gran éxito para el cultivo de *Pratylenchus* spp. como: *P. brachyurus* (Moody et al., 1973) y *P. vulnus* (Townson & Lear, 1982).

Peng y Moens (1999) demostraron que la esterilización superficial del nematodo con malaquita verde al 0.1 % (por 15 minutos) o con sulfato de estreptomina al 0.5 % no reduce significativamente el movimiento de *P. penetrans*, o la atracción y penetración a plántulas de *Rosa dumetorum* cv. Laxa; pero almacenar los nematodos en un lugar frío (30 días a 4 °C) reduce la supervivencia de *P. penetrans* y su atracción y penetración a plántulas de rosas (Coyne et al., 2014)

O'Bannon y Taylor (1968) fueron los pioneros en el uso de discos de zanahoria para la multiplicación in vitro de *R. similis* y diferentes especies de *Pratylenchus*. La técnica fue mejorada por Moody et al. (1973), permitiendo una mayor longevidad del cultivo y un incremento de la tasa de multiplicación (Coyne et al., 2014).

Gonzaga y Santos (2010) exitosamente multiplicaron *Pratylenchus* spp. in vitro introduciendo modificaciones a la técnica de Moody et al. (1973), mejorando el proceso de axenación y reemplazando los discos de zanahoria por cilindros de zanahoria de aproximadamente 30 mm de ancho por 15 mm de diámetro, tomados de la parte central de la zanahoria, sin añadir ningún medio a las cajas de Petri.

De la técnica desarrollada por Marc Boisseau, citado por Villain (2000), Costa (2004) se han hecho ajustes mínimos, utilizando cilindros de zanahoria de 20 mm de ancho y 5 mm de diámetro, logrando con éxito la multiplicación de *R. similis*. Usando esta técnica el riesgo de contaminación se minimiza y poblaciones altas de nematodos se

obtienen y mantienen por un largo tiempo (Gonzaga y Santos, 2010). Sin embargo, debido a la falta de información detallada, falta de descripciones de la técnica en la literatura, falta de un método de extracción de los nematodos de las raíces y tejido donde se dañe lo menos posible a *Pratylenchus coffeae* y la fácil contaminación de la zanahoria, han sido frecuentes los fracasos entre los investigadores que tratan de multiplicar el nematodo a través de esta técnica.

#### B. Cultivo axénico de *Pratylenchus coffeae*

Se denomina cultivo puro (axénico) al que contiene sólo un tipo de microorganismos. Los cultivos puros se inician a partir de colonias aisladas, de manera que todos los individuos del mismo tengan la misma composición genética. Los cultivos puros son esenciales para poder estudiar las características de los microorganismos y para poder identificarlos con seguridad. Para la multiplicación de nematodos in vitro, la axenización de los especímenes es la clave para establecer un cultivo monoxénico, para evitar la contaminación con microorganismos (Coyne et al., 2014).

### 2.2.2 Marco referencial

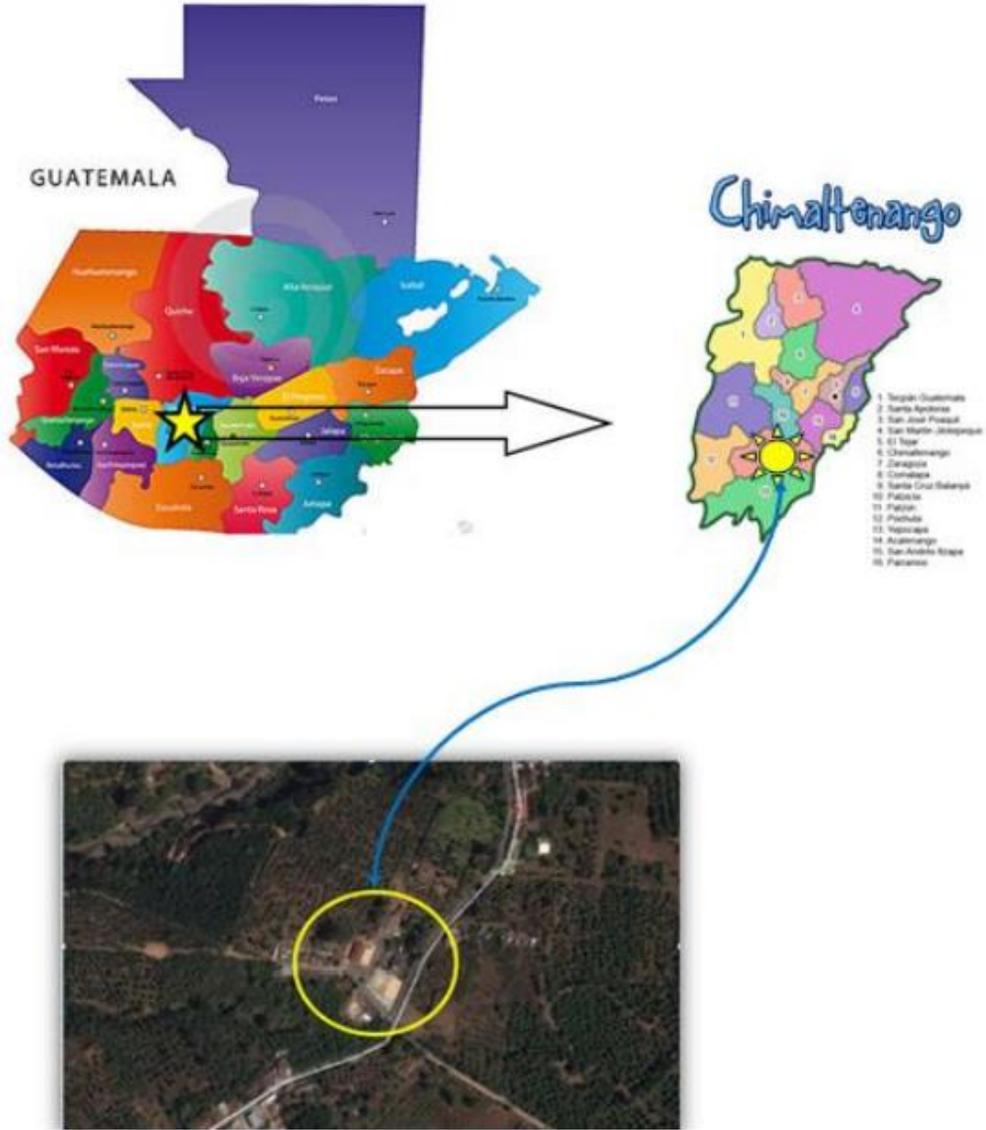
#### 2.2.2.1 ANALAB

La investigación se realizó en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Plantas y Aguas de la Asociación Nacional del Café (Analab) ubicado en Calle del Café, 5ta calle 0-50 zona 14, de la Ciudad de Guatemala. Este cuenta con el equipo necesario para realizar la investigación (ANACAFE, s.f.).

#### 2.2.2.2 Ubicación geográfica finca El Platanar

En este lugar se tomaron muestras de raíces con síntomas de infestación de *P. coffeae* para extraer los nematodos usados en la investigación. Esta finca está localizada a 84 km de la capital, ubicada en el municipio de Acatenango del departamento de Chimaltenango; a una altitud de 1578 m s.n.m con coordenadas geográficas: 14.55° Latitud Norte y 90.93° Longitud

Oeste (ANACAFE, s.f.). Se seleccionó el lote El Chim debido a que tiene un historial de altas poblaciones del genero *Pratylenchus*.



**Figura 6.** Ubicación finca El Platanar.

Fuente: ANACAFE, s.f.

## 2.3 Objetivos

### 2.3.1 Objetivo general

Determinar el mejor tratamiento para la multiplicación *in vitro* de *Pratylenchus coffeae* en zanahoria.

### 2.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar en cuál de los tres tiempos de incubación (20, 40 y 60 días) se obtiene una mayor tasa de multiplicación del nematodo lesionador *P. coffeae*.
2. Determinar el efecto del uso de medios con agua y agua en la tasa de multiplicación del nematodo lesionador *P. coffeae*.

## 2.4 Hipótesis

El uso de discos de zanahoria con medio de cultivo agar y agua disminuye la contaminación de la zanahoria al no tener contacto con la superficie, mantiene condiciones de humedad y por consiguiente incrementa la reproducción de *Pratylenchus coffeae*.

## 2.5 Metodología

### 2.5.1 Procedimiento

Para el desarrollo de la presente investigación fue necesario contar con raíces provenientes de cultivo de café con infestaciones altas de *P. coffeae*. Estas fueron obtenidas de finca El Platanar ubicada en el municipio de Acatenango del departamento de Chimaltenango.

### 2.5.1.1 Preparación del medio de cultivo agar y agua (1 %)

- En un Erlenmeyer, se vertieron 200 ml de agua destilada y se agregaron 2 g de Agar para tener una solución al 1 %. Luego se colocó en una estufa por 20 min a una temperatura de 80 °C para que empezara a calentar el medio (figura 5), además se agitó para que disolviera el Agar en el agua.
- Se introdujo el Erlenmeyer y se esterilizó en la autoclave a 121 °C por 15 min (figura 6), luego se dispensaron alícuotas de 2 ml de la solución en cada una de las cajas Petri.



**Figura 7.** Medio de cultivo agar y agua calentado en estufa



**Figura 8.** Autoclave utilizada para esterilización de materiales

### 2.5.1.2 Preparación de los discos y cilindros de zanahoria *in vitro*

- Se seleccionaron zanahorias limpias, con una forma cilíndrica (un diámetro aproximado de 3 cm) en lugar de una forma cónica. Las zanahorias no estaban agrietadas, ni muy gruesas y que no muy suculentas ya que tienden a ser más susceptibles a la pudrición durante la incubación en comparación con una no suculenta.
- Con una manguera de lavamanos se lavaron las zanahorias seleccionadas, dejando correr el agua a modo de quitarle cualquier partícula de suelo. Se introdujeron en hipoclorito de sodio al 3 % por 15 min (figura 7). Después se limpiaron con agua esterilizada antes de usarlas.

- Se introdujeron 2 L de agua destilada, cajas Petri, papel mayordomo, pipetas, perforadores cilíndricos, pinzas, tijeras, pelador de verduras y cuchillo en la autoclave para esterilizarse a una temperatura de 121 °C por 15 min.
- Se desinfectó la cámara de flujo laminar con etanol al 70 % pasando papel mayordomo esterilizado y etanol sobre la superficie en la cual se trabajó.
- Las pinzas, cuchillo y el pelador de verduras se desinfectaron, antes de utilizarlas, flameándolas con el mechero y posteriormente introduciéndolas en etanol al 70 %.
- En la cámara de flujo laminar se esterilizaron las zanahorias. Sosteniendo, cada zanahoria, con pinzas se flamearon con el mechero, luego se rociaron con un atomizador conteniendo etanol al 70 % y se volvió a pasar sobre el mechero; se repitió dos veces este proceso.
- Trabajando sobre el papel mayordomo, se removió la corona de la zanahoria con el cuchillo y se removió la epidermis de la zanahoria con el pelador de verduras (figura 8).



**Figura 9.** Desinfección de zanahorias en hipoclorito de sodio en recipiente plástico

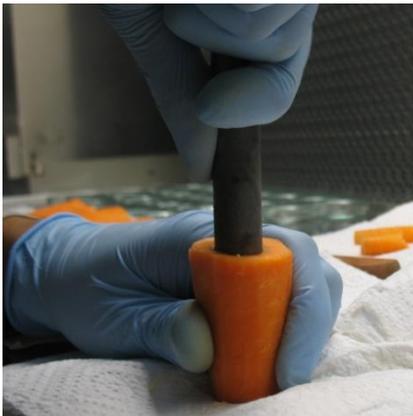


**Figura 10.** Remoción de la epidermis de zanahoria con pelador

— Con un perforador cilíndrico y un cuchillo se cortaron las zanahorias peladas en:

- Discos de 5 mm de largo y 20 mm de diámetro.
- Cilindros de 20 mm de largo y 5 mm de diámetro.

Luego se transfirieron los discos y cilindros de zanahoria a un beaker esterilizado, el cual se cubrió después de introducir cada uno de los mismos (figura 9 y 10).



**Figura 11.** Corte de zanahoria con perforador cilíndrico



**Figura 12.** Preparación unidades experimentales

### 2.5.1.3 Extracción de nematodos de raíces infectadas

- Se eligieron raíces con síntomas de infestación de *P. coffeae.*, como raíces con necrosamiento progresivo a partir de los puntos de penetración del nematodo, desaparición de raíces secundarias (ver figura 13, 14 y 15).
- Las raíces se lavaron con agua a presión para eliminar el exceso de suelo (ver figura 14). Dejando escurrir para eliminar el exceso de agua.
- Con una tijera se cortaron las raíces en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, acumulando muestras de 30 g de raíces (ver figura 17).

- Cada 30 g de raíces se colocaron en un Erlenmeyer de 500 ml, aforando el recipiente con agua desmineralizada hasta su capacidad máxima.
- Se introdujo, a cada Erlenmeyer, una pipeta Pasteur conectada a una bomba de pecera, esto con el objetivo de oxigenar y permitir que los nematodos salieran de las raíces. Se mantuvo este sistema por 48 horas (ver figura 18).



**Figura 13.** Selección de planta de café infectadas por nematodos



**Figura 14.** Toma de muestras de raíces de plantas de café.



**Figura 15.** Selección de raíces con síntomas típicos provocados por *Pratylenchus* spp.



**Figura 16.** Lavado de raíces



**Figura 17.** Corte de raíces



**Figura 18.** Extracción de nematodos con aireación.

Fuente: Elaboración propia, 2017

- Pasadas las 48 horas se colectaron los nematodos que se encontraban suspendidos en el agua, para ello se filtraron en dos tamices, arriba se utiliza un tamiz número 20 mesh para que retuviera las raíces y dejara pasar únicamente el agua con nematodos y por abajo se coloca un tamiz número 400 mesh el cual retuvo los nematodos y dejara pasar el agua. Se recolectaron a modo de obtener un volumen mínimo de agua con una concentración mayor de nematodos, el producto del filtrado se colocó en un beaker (figura 19).

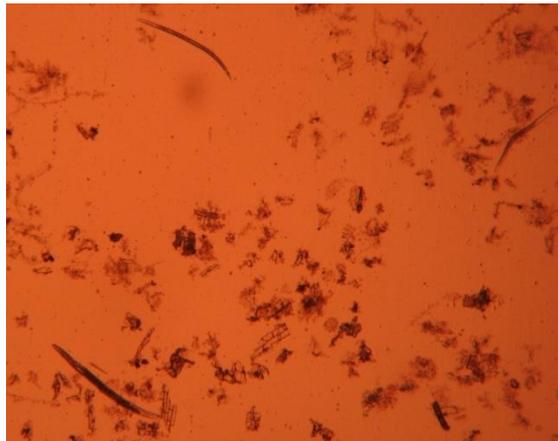


**Figura 19.** Colecta de nematodos

Fuente: Elaboración propia, 2017

#### 2.5.1.4 Identificación de *Pratylenchus coffeae*

- Se transfirió la extracción de nematodos a una caja de Petri.
- Con la ayuda del estereoscopio, la guía de identificación de nematodos fitoparásitos de la revista *Nematology* y una micropipeta se identificaron y pescaron los nematodos (figura 20).



**Figura 20.** Identificación morfológica de nematodos

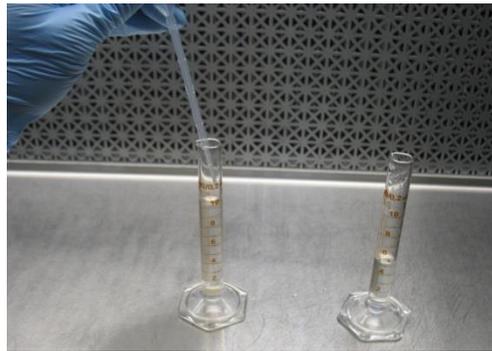
Fuente: Elaboración propia, 2017

- Se trasladaron los nematodos a una probeta de 10 ml.

#### 2.5.1.5 Selección y esterilización de los nematodos

- Utilizando una balanza analítica, se pesaron 6 mg de sulfato de estreptomicina en un pedazo de papel aluminio.
- Se transfirió estos 6 mg de estreptomicina a una probeta con 10ml de agua esterilizada, dando como resultado una concentración de 6000 ppm. Se agito esta solución a modo de disolver la estreptomicina.

- Se dejaron asentar los nematodos al fondo de la probeta por 1 hora. Con una micropipeta se redujo el volumen a 5 ml, solamente succionando de la superficie. De la solución de estreptomicina, se transfirió 5 ml a la probeta con nematodos. Se dejaron por 1 hora los nematodos, nuevamente se redujo el volumen a la mitad de la probeta. Se vertió con agua esterilizada el volumen faltante y se dejó asentar otra hora más. El proceso se repitió una tercera vez, dejando reposar 30 min para finalmente lograr un volumen deseado (figura 21).

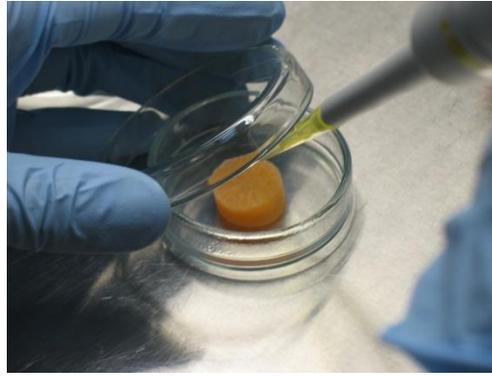


**Figura 21.** Desinfección de *P. coffeae* con sulfato de estreptomicina

Fuente: Elaboración propia, 2017

#### 2.5.1.6 Inoculación de *P. coffeae* a los discos y cilindros de zanahoria

- Las cajas Petri se colocaron con los discos y cilindros de zanahoria en la cámara de flujo laminar. Se transfirieron los nematodos de la probeta, con una micropipeta, a la superficie de la zanahoria.
- Se colocaron pequeñas gotas de la suspensión de nematodos en los márgenes de los discos de la zanahoria, aplicando aproximadamente 50 individuos de *P. coffeae* por caja de Petri (figura 22).
- Las cajas Petri conteniendo los nematodos y la zanahoria se sellaron con parafilm, y cada una de estas fue etiquetado con fecha de inoculación y el nombre de la especie.



**Figura 22.** Inoculación de zanahoria con inóculo de *P.coffeae*

Fuente: Elaboración propia, 2017

- Se colocaron las cajas Petri dentro de una incubadora a una temperatura de 27 °C. Se incubaron en la oscuridad para replicar las condiciones del suelo. Se revisaron las cajas de Petri periódicamente. Materia color blanco en la superficie de las zanahorias fue un buen indicador del cultivo en la incubación (figura 23 y 24).



**Figura 23.** Zanahoria con masas de *P. coffeae*, indicador de una buena reproducción



**Figura 24.** Masas de *P. coffeae* sobre zanahoria

Fuente: Elaboración propia, 2017

### 2.5.2 Diseño experimental

Se utilizó un diseño bifactorial dispuesto en un diseño Completamente al Azar. Los factores a utilizados fueron:

- Factor 1: Zanahoria
  - Nivel 1: Discos
  - Nivel 2: Cilindros
- Factor 2: Medio agar y agua
  - Nivel 1: Con agar y agua
  - Nivel 2: Sin agar y agua

### 2.5.2.1 Modelo estadístico

Modelo estadístico:  $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (AB)_{ij} + e_{ijk}$

Donde:

$Y_{ijk}$  = es el k-ésimo elemento perteneciente al j-ésimo nivel del medio agar y agua y al i-ésimo tratamiento del nivel de la zanahoria.

$\mu$  = es la media general.

$A_i$  = es el efecto debido al i-ésimo nivel de la zanahoria.

$B_j$  = es el efecto debido al j-ésimo nivel de agar y agua.

$(AB)_{ij}$  = efecto de la interacción entre el j-ésimo nivel del medio agar y agua y el i-ésimo de la zanahoria.

### 2.5.3 Tratamientos y repeticiones

Se evaluó en total 4 tratamientos con 3 repeticiones. Los tratamientos evaluados se describen en el cuadro 1:

**Cuadro 1.** Descripción general de los tratamientos

No.	Tratamiento	Medidas de zanahoria
1.	Discos de zanahoria sin agar y agua	20 mm diámetro, 5 mm largo
2.	Discos de zanahoria con agar y agua	20 mm diámetro, 5 mm largo
3.	Cilindros de zanahoria sin agar y agua	5 mm diámetro, 20 mm largo
4.	Cilindros de zanahoria con agar y agua	5 mm diámetro, 20 mm largo

Fuente: Elaboración propia, 2017

### 2.5.3.1 Unidad experimental

Las unidades experimentales estuvieron compuestas por cuatro cajas de Petri 5.5 cm de diámetro por 2 cm de largo, con un disco o cilindro de zanahoria.

### 2.5.3.2 Arreglo espacial

Las unidades experimentales estuvieron dispuestas como se muestra en la figura 25:

T2	T4	T1
T3	T2	T4
T4	T3	T2
T1	T1	T3
R1	R2	R3

**Figura 25.** Aleatorización de los tratamientos.

Fuente: Elaboración propia, 2017

### 2.5.3.3 Descripción de la variable a medir

Población de nematodos: es la cantidad de *P. coffeae* obtenidos a los 20, 40 y 60 días después de haberse inoculado en la zanahoria.

#### A. Conteo de población de *P. coffeae*

Entendiendo como población de nematodos como la cantidad de *P. coffeae* obtenidos a cierto tiempo luego de su inoculación. Se extrajeron los nematodos de la zanahoria y se estimó la población con 1 ml de la extracción con la ayuda de: una cámara de conteo de nematodos, un microscopio y un contador.

## B. Tasa de reproducción

Para estimar la tasa de reproducción de *P. coffeae* se calculó teniendo la población final y comparando el número de veces que se incrementó de la población inicial.

### 2.5.3.4 Análisis de la información

Se utilizó el software estadístico INFOSTAT para el análisis de los datos retomados. Los datos retomados se transformaron a logaritmo de base 10 para estabilizar la variación dentro de las unidades experimentales. Luego se realizó un análisis de varianza y posteriormente una prueba de medias de Tukey con los factores y tratamientos que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

## 2.6 Resultados y Discusión

Los hábitos alimenticios de los nematodos determinan el tipo de tejido vegetal necesario para su cultivo (Coyne *et al.*, 2014). El nematodo lesionador *Pratylenchus spp.*, al ser un nematodo endoparásito migratorio, no requiere elementos vasculares y puede reproducirse fácilmente tejido de callo indiferenciado o en materiales como la zanahoria (Coyne *et al.*, 2014). En 2010, Gonzaga V. y Santos J.M., demostraron que los discos de zanahoria son un medio adecuado para la multiplicación de la mayoría de especies del género *Pratylenchus*. La técnica de disco de zanahoria estéril ha sido empleada con éxito para el cultivo monoxénico de varias especies del nematodo lesionador, como *P. vulnus* (Moody *et al.*, 1973), *P. brachyurus* (O'Bannon y Taylor, 1968), *P. sudanensis* (Mudiope *et al.*, 2004), *P. scribneri* (Lawn y Nobel, 1986) y *P. zae* (Kagoda *et al.*, 2010).

Esta técnica no está reportada para la multiplicación de *Pratylenchus coffeae*. Tejido de callo indiferenciado de alfalfa se ha utilizado para el cultivo in vitro de *P. coffeae*, pero da resultados de bajas poblaciones según Matalaote *et al.*, (1987). Los discos de zanahoria estériles ofrecen una alternativa rentable y relativamente menos laboriosa para criar nematodos, lo que resulta en una mayor cantidad obtenida de nematodos en comparación con otros métodos (Boisseau, 2008).

### 2.6.1 Extracción e identificación de *P. coffeae*

En el proceso de extracción e identificación del nematodo, se siguió la metodología descrita Villain (2000), determinando sus características morfológicas. Los nematodos extraídos de las raíces colectadas corresponden a la especie *Pratylenchus coffeae*. La cual se caracteriza por tener la región de la cabeza baja y aplanada, nódulos basales distintos, el esófago tiene un bulbo central bien desarrollado y los lóbulos posteriores de la glándula se superponen ventralmente del intestino (Villain, 2000).

### 2.6.2 Primer conteo de *P. coffeae* después de la inoculación en zanahoria

Veinte días después de la inoculación de las unidades experimentales, los resultados muestran que se obtuvo mayor cantidad de nematodos con el tratamiento 1 (discos de zanahoria sin agar y agua) (ver cuadro 2). Al realizar el análisis de varianza, con un nivel 0.05 de significancia, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para el factor zanahoria al igual entre los tratamientos, solamente para el factor agar y agua. La comparación de medias a través de la prueba de Tukey muestran que para el factor agar y agua, el no agregarlo a la caja de Petri, da mejores resultados en la reproducción de *P. coffeae*.

**Cuadro 2.** Promedio de número de larvas de *Pratylenchus coffeae* (20 días después de inoculado en las unidades experimentales)

No.	Tratamiento	Promedio de larvas <i>P.coffeae</i> y desviación estándar
1.	Discos de zanahoria sin agar y agua	45 nematodos +/- 8.66
2.	Discos de zanahoria con agar y agua	25 nematodos +/- 5.00
3.	Cilindros de zanahoria sin agar y agua	17.5 nematodos +/- 4.33
4.	Cilindros de zanahoria con agar y agua	10 nematodos +/- 7.07

Fuente: Elaboración propia, 2017

Sin embargo, las cantidades de nematodos obtenidos en este tiempo son muy bajas. Las poblaciones obtenidas son bajas en comparación a los resultados que obtuvo Gonzaga *et al.*,

(2012) en la investigación de dos métodos in vitro para la reproducción de *Pratylenchus brachyurus* y *Radopholus similis* en zanahoria. Esto se debe principalmente al tiempo de incubación. Según Corbett (1973) *P. coffeae* tiene un ciclo de vida entre 30 - 40 días a una temperatura entre 25 °C – 30 °C. Los resultados muestran poblaciones adultas y cantidades menores a las que se inocularon, lo cual indica que el ciclo del nematodo no se completó.

La función del agar y agua es el de mantener las condiciones de humedad para la zanahoria dentro de la caja de Petri. En los tratamientos donde no se agregó agar y agua se observaron mejores resultados que en donde se agregó.

En el tratamiento 4, (cilindros de zanahoria con agar y agua), se observó que el 25 % de la unidad experimental resulto contaminada con bacteria. Esto posiblemente se debió a que el cilindro de la unidad experimental provino de una zanahoria gruesa y algo succulenta, que según Coyne *et al.*, (2014) tienden a ser más susceptibles a la pudrición en periodos de incubación.

### 2.6.3 Segundo conteo de *P. coffeae* después de la inoculación en zanahoria

Los resultados a los cuarenta días después de la inoculación (cuadro 7) muestran que el tratamiento 2 (Discos con agar y agua) tuvo la mayor cantidad de nematodos. El análisis de varianza mostró que, con un 0.05 de significancia, hay diferencias estadísticamente significadas en el factor zanahoria y en la interacción de la zanahoria y el agar y agua.

**Cuadro 3.** Promedio de número de larvas de *Pratylenchus coffeae* (40 días después de inoculado en las unidades experimentales)

No.	Tratamiento	Promedio de larvas <i>P.coffeae</i> y desviación estándar	Grupo Tukey de la interacción
1.	Discos de zanahoria sin agar y agua	102.5 nematodos +/- 22.77.	B
2.	Discos de zanahoria con agar y agua	365 nematodos +/- 65.76	A
3.	Cilindros de zanahoria sin agar y agua	22.5 nematodos +/- 12.99	C
4.	Cilindros de zanahoria con agar y agua	10 nematodos +/- 7.07	C

Fuente: Elaboración propia, 2017

En cuanto al factor zanahoria, de acuerdo a la prueba de Tukey, se obtienen mejores resultados utilizando discos de zanahoria para la reproducción de *P. coffeae*. Probablemente esto se debe a los diámetros usados. Gonzaga *et al.*, (2012) compararon dos métodos de reproducción in vitro para *Radopholus similis* y *Pratylenchus brachyurus* en cilindros de zanahoria donde obtuvieron altas poblaciones de nematodos en periodos largos de incubación (60 días). Las medidas de los cilindros utilizados fueron de 15 mm de diámetro y 20 mm de largo, teniendo un mayor diámetro en comparación a los utilizados en esta investigación. En los discos de zanahoria se tiene un diámetro de 20 mm, mientras que para los cilindros se utilizaron diámetros de 5 mm.

Al tener una superficie de contacto más amplia y plana posiblemente favoreció a que los nematodos pudieran penetrar los discos de zanahoria. Por el lado de los cilindros al no tener una superficie plana y de menor diámetro probablemente hizo que en ocasiones el inculo resbalara del cilindro complicando la penetración de los nematodos en la zanahoria y por ello poblaciones más bajas que los discos.

Para la interacción zanahoria y el agar y agua, los resultados del cuadro 11, muestran que el tratamiento 1 (discos sin agar y agua) y el tratamiento 2 (discos con agar y agua) son similares estadísticamente y tienen resultados superiores a los tratamientos 3 y 4, en cuanto a las cantidades obtenidas de nematodos a los cuarenta días después de inoculado de *P. coffeae*.

Las poblaciones obtenidas cuarenta días después de la inoculación son mayores que el primer conteo debido a que el primer y parte del segundo ciclo de vida fue completado. Dado que se encontraron algunos huevos y adultos, pero, sobre todo estadios juveniles en los conteos realizados. El tratamiento 2 fue el que tuvo la mayor cantidad de nematodos lo cual se le atribuye al uso de agar y agua que le brinda condiciones de humedad necesarias para que los nematodos se reprodujeran fácilmente. Boisseau M, Sarah JL (2008) determinaron que el uso de agar y agua al 1% mantuvo las zanahorias sanas y de buen aspecto en periodos largos de incubación, lo que se traduce en alimento para *P. coffeae*.

#### 2.6.4 Tercer conteo de *P. coffeae* después de la inoculación en zanahoria

Sesenta días después de la inoculación de las unidades experimentales el tratamiento 2 (discos de zanahoria con agar y agua) obtuvo la mayor población de *P. coffeae* con un promedio de 2300 larvas de nematodos (cuadro 12). El cuadro 14, muestra que con un nivel de significancia del 5 %, existen diferencias significativas en el factor zanahoria, así como en la interacción entre la zanahoria y el agar y agua.

**Cuadro 4.** Promedio de número de larvas de *Pratylenchus coffeae* (60 Días después de inoculado en las unidades experimentales)

No.	Tratamiento	Promedio de larvas <i>P.coffeae</i> y desviación estándar	Grupo Tukey de la interacción
1.	Discos de zanahoria sin agar y agua	117.5 nematodos +/- 17.85	B
2.	Discos de zanahoria con agar y agua	2300 nematodos +/- 316.22	A
3.	Cilindros de zanahoria sin agar y agua	47.5 nematodos +/- 10.89	B
4.	Cilindros de zanahoria con agar y agua	10 nematodos +/- 10.00	C

Fuente: Elaboración propia, 2017

Sesenta días después de la inoculación, los tratamientos tuvieron un aspecto sano, sin ningún signo de descomposición o de contaminación, a excepción de los cilindros de zanahoria con agar y agua (tratamiento 4) que tuvieron un crecimiento de bacteria afectando el 5 0% de la unidad experimental. Kagoda *et al.*, (2010) Gonzaga *et al.*, (2012) también hacen referencia a este tipo de contaminación del 22.5 % y 5 % respectivamente. Esto se puede evitar seleccionando zanahorias limpias, con una forma cilíndrica en lugar de una forma cónica, no estar agrietadas, ni muy gruesas y que no estuvieran muy suculentas ya que tienden a ser más susceptibles a la pudrición durante la incubación en comparación con una no suculenta según indica Coyne *et al.*, (2014).

El uso de discos de zanahoria fue más efectivo, que el cilindro, para la multiplicación de la población de *P. coffeae* (ver cuadro 15). Las poblaciones de *P. coffeae* fueron superiores en los discos debido al diámetro utilizado (20 mm) que en los cilindros (5 mm), probablemente esto se debe a que el área del cilindro no fue suficiente tejido para la reproducción y alimentación del nematodo.

El tratamiento 2 (discos con agar y agua) tuvo los mejores resultados, sesenta días después de la inoculación, para la reproducción de *P. coffeae* con una media de 2300 nematodos (ver cuadro 16). Esto se debe a que la interacción entre los discos de zanahoria y el uso de agar y agua fue efectiva y crearon condiciones ideales para la multiplicación de las poblaciones del nematodo, manteniendo en buen estado la consistencia y el aspecto de la zanahoria. La parte central de la zanahoria contiene altas cantidades de hidratos de carbono, que son utilizados por los nematodos para su alimentación (Kagoda et al., 2010). Al tener los discos de zanahoria con una pequeña capa de agar y agua se mantiene condiciones de humedad en la caja de Petri, lo que propicia que el tejido de zanahoria mantenga sus características y por ende el nematodo tenga alimento y se pueda seguir multiplicando.

Thames (1982) señala que las larvas del género *Pratylenchus* durante periodos prolongados de sequía, entran en un estado de anhidrobiosis y solamente un 20 % de la población sobrevive a condiciones de desecamiento, lo que probablemente afecto para obtener mayores cantidades de *P. coffeae* en los tratamientos donde no se aplicó agar y agua, ya que se encontraron larvas desecadas de *P. coffeae* en algunas cajas de Petri. Castro y Ferraz (1989) evaluaron dos métodos para la multiplicación in vitro de *P. brachyurus*, *P. zaeae*, *R. similis* y *Tylenchorhynchus spp.* en discos de zanahoria en cajas de Petri con una pequeña capa de agar y agua dando mejores condiciones de humedad para la multiplicación de los nematodos, y cuestionablemente “una mejor aireación” que mantener los discos de zanahoria sin la capa de agar y agua.

La población de *P. coffeae* aumento notablemente en el tratamiento 2. El utilizar discos de zanahoria con agar y agua fue más eficaz para la reproducción del nematodo teniendo una tasa de crecimiento de 46 veces en comparación a su población inicial (50 larvas), mientras que para el tratamiento 1 (discos de zanahoria sin agar y agua) la cantidad de nematodos se duplico respecto a su población inicial. Para los tratamientos 3 y 4, donde su utilizo cilindros, las cantidades de nematodos obtenidas fueron menores respecto a su población inicial, lo que indica que no eficientes ni eficaces en la multiplicación del nematodo. Gonzaga et al., (2012) reporto que obtuvo una tasa de crecimiento de 226 en comparación a su población inicial en cilindros de zanahoria en *P. brachyurus*, esto se debe a la agresividad del nematodo utilizado.

La variabilidad entre especies y poblaciones de *Pratylenchus* debe tenerse en cuenta para la selección de un procedimiento de multiplicación y longitud de período de incubación (Gonzaga et al., 2012). Costa (2014) trabajando con 12 poblaciones de *R. similis*, encontró que las poblaciones más agresivas se reproducen más rápido que poblaciones menos agresivas. Este es un factor a tomar en cuenta ya que probablemente del lugar de la muestra inicial la población de nematodos no sea tan agresiva además de ser menos prolífica y por ello las cantidades obtenidas son menores a las reportadas por otros investigadores en otros países.

Existe una correlación positiva alta entre el número de nematodos y el tiempo de evaluación, lo que nos indica que la calidad del modelo para replicar los resultados es precisa y una proporción de variación baja de los resultados, ya que este tiempo (60 días después de inoculación) obtuvo los mejores resultados en cuanto a poblaciones de *P. coffeae*. Castillo et al., (1995) y Boisseau M, Sarah JL (2008) también obtuvieron los mejores resultados en la reproducción in vitro de los géneros *Pratylenchus* y *Radopholus* en zanahoria en este tiempo de incubación. Costa, en 2004, en una investigación para evaluar la dinámica poblacional de tres poblaciones de *R. similis* provenientes de Cuba, Brasil y Costa Rica. Este autor determino, por ejemplo, que la población de Cuba alcanzó su pico más alto de capacidad de reproducción 60 días después de haberse inoculado, mientras que la población de Brasil y de Costa Rica alcanzo su máximo 90 y 120 días después de la inoculación, respectivamente.

El mayor número de nematodos sugiere que periodos iguales o mayores de sesenta días son ideales para obtener poblaciones altas de *P. coffeae*. Castro y Ferraz (1989) también obtuvieron los mejores resultados 60 días después de la inoculación. Como los cilindros de la zanahoria se encontraron en buenas condiciones después de 60 días de la inoculación, es probable que la multiplicación todavía sería sostenida por un período de tiempo más largo. Fallas y Sarah (1994) manejaron la población de *R. similis* para mantenerla creciendo en discos de zanahoria por 75 días a 25 °C. Gonzaga y Santos (2010) también obtuvieron poblaciones altas de *Pratylenchus spp.* 100 días después de la inoculación.

## 2.7 Conclusiones

1. El tratamiento que obtuvo mejores resultados en la reproducción in vitro de *P. coffeae* fue el tratamiento 2 (discos de zanahoria con agar y agua) con un promedio de 2300 nematodos a los 60 días después de haberse inoculado.
2. El tiempo de incubación que obtuvo mejores resultados para la multiplicación de *P. coffeae* se consiguió a los 60 días después de inoculado.
3. El uso de agar y agua crea condiciones ideales para la multiplicación de las poblaciones del nematodo, manteniendo en buen estado la consistencia y el aspecto de la zanahoria, obteniendo tasas de multiplicación altas (en discos de zanahoria).

## 2.8 Recomendaciones

1. Para obtener una mayor cantidad de *P. coffeae* inocular un promedio de 100 nematodos por disco de zanahoria con agar y agua, utilizando cajas de Petri con tres discos de zanahoria.
2. Realizar un estudio del efecto del tiempo y densidad de inóculo en la reproducción in vitro de *Pratylenchus coffeae* en discos de zanahoria con agar y agua; ya que, al observar, a los 60 días después de inoculado, la consistencia, el buen aspecto de la zanahoria y que la tasa de crecimiento sigue en aumento se podría prolongar el tiempo de incubación, así como la población inicial inoculada en la zanahoria.

## 2.9 Bibliografía

1. Agrios, G. 2005. Plant pathology. 5 ed. USA, Academic Press. 952 p.
2. ANACAFÉ (Asociación Nacional del Café, Guatemala). s.f. Misión (en línea). Guatemala. Recuperado 14 set. 2016, de <http://www.anacafe.org/glifos/inde.php?title=10CON:Anacafe> misión

3. Anzueto, F. 1993. Etude de la resistance du cafeier (*Coffea* sp.) à *Meloidogyne* sp. et *Pratylenchus* sp. Tesis PhD. Rennes, France, Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes. p. 55 – 78.
4. Anzueto, F; Bertrand, B; Peña, M *et al.* 1996. Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales nematodos de América Central. *In* Simp. Caficultura Latino-Americana (1996, Guatemala). Proceedings. Guatemala. 7 p.
5. Boisseau, M; Sarah, JL. 2008. *In vitro* rearing of Pratylenchidae nematodes on carrot discs. *Fruits* 63:307-310.
6. Campos, VP; Villain, L. 2005. Nematode parasites of coffee and cocoa. *In* Luc, M; Sikora, RA; Bridge, J (eds.). Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. 2 ed. Wallingford, United Kingdom, CABI. p. 29 – 45.
7. Castillo, P; Trapero-Casas, L; Jiménez-Díaz, D. 1995. Effect of time, temperature, and inoculum density on reproduction of *Pratylenchus thornei* in carrot disk cultures. *Journal of Nematology* 27(1):120-124.
8. Castro, MEA; Ferraz, S. 1989a. Multiplicação 'in vitro' de *Pratylenchus brachyurus*, *P. zaeae*, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp. em discos de cenoura. *Nematologia Brasileira* 13:31-38.
9. Castro, MEA; Ferraz, S. 1989b. Avaliação de cinco métodos de axenização para *Pratylenchus brachyurus*, *P. zaeae*, *Radopholus similis* e *Tylenchorhynchus* sp. *Nematologia Brasileira* 13:21-30.
10. Costa, DC. 2004. Variabilidade patogênica e genética de *Radopholus similis* em bananeira no Brasil. Tese Doutorado. Brasília, Brasil, Universidade de Brasília. p. 303-315.
11. Coyne, DL; Adewuyi, O; Mbiru, E. 2014. Protocol for *in vitro* culturing of lesion nematodes: *Radopholus similis* and *Pratylenchus* spp. on carrot discs. Ibadan, Nigeria, International Institute of Tropical Agriculture (IITA). 15 p.
12. Deimi, A; De Luca, F; Vovlas, N. 2009. Characterization and parasitic habits of a root-lesion nematode from chrysanthemum in Iran and its relationship to *Pratylenchus coffeae*. *Nematology* 11(5):757-768.
13. Elsen, A; Lens, K; Nguyet, DTM; Broos, S; Stoffelen, R; De Waele, D. 2001. Aseptic culture systems of *Radopholus similis* for *in vitro* assays on *Musa* spp. and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Nematology* 33(2-3):147-151.

14. Fallas, GA; Sarah, JL. 1994. Efecto de la temperatura de almacenamiento sobre la reproducción *in vitro* de *Radopholus similis*. *Nematropica* 24:175-177.
15. Gonzaga, V; Santos, JM. 2010. Estudio comparativo *in vitro* de seis especies de *Pratylenchus* em cilindros de cenoura. *Nematologia Brasileira* 34:228-230.
16. Gonzaga, V; Santos, RP; Andrade, E; Costa, C; Cares, E. 2012. Comparison of two methods for *in vitro* multiplication of *Radopholus similis* and *Pratylenchus brachyurus* in carrot cylinders. *Tropical Plant Pathology* 37(4):266-270.
17. Hervé, G; Bertrand, B; Villain, L *et al.* 2005. Distribution analyses of *Meloidogyne* spp. and *Pratylenchus coffeae* sensu lato in coffee plots in Costa Rica and Guatemala. *Plant Pathology* 54:471–475.
18. IICA, El Salvador; CATIE, El Salvador. 1995. XVII simposio de caficultura latinoamericana. San Salvador, El Salvador, Promecafé. p. 471-508.
19. Kagoda, F; Coyne, DL; Mbiru, E; Derea, J; Tongoona, P. 2010. Monoxenic cultura of *Pratylenchus zae* on carrot discs. *Nematol. Medit.* 38:107-108.
20. Kaplan, D; Davis, E. 1990. Improved nematode extraction from carrot disk culture. *Journal of Nematology* 22(3):399-406.
21. Lawn, DA; Noel, GR. 1986. Gnotobiotic cultura of *Pratylenchus scribneri* on carrot discs. *Nematropica* 16:45-51.
22. Moody, EH; Lownsbery, BF; Ahmed, JM. 1973. Culture of root lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. *Journal of Nematology* 5:225-226.
23. Motalaote, B; Starr, JL; Frederiksen, RA; Miller, FR. 1987. Host status and susceptibility of sorghum to *Pratylenchus* species. *Revue de Nématologie* 10:81-86.
24. Mudiope, J; Coyne, DL; Adipala, E; Sikora, RA. 2004. Monoxenic cultura of *Pratylenchus sudanensis* on carrot discs, with evidence of differences in reproductive rates between geographical isolates. *Nematology* 6:617-619
25. O'Bannon, JH; Taylor, AL. 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot disks. *Phytopathology* 58:385.
26. Pinochet, J. 1988. A method for screening bananas and plantains to lesion-forming nematodes; nematodes and the borer weevil in banana: present status of research and outlook. Workshop held in Bujumbura (1987, Bujumbura). Proceedings. Montpellier, France, INIBAP. p. 62–65.

27. Schieber, E. 1966. Nematodos que atacan al café en Guatemala, su distribución, sintomatología y control. *Turrialba* 16:130–135.
28. Schieber, E. 1971. The nematode problems of coffee in Guatemala. *Nematologica* 1:17.
29. Schieber, E; Sosa, ON. 1960. Nematodes on coffee in Guatemala. *Plant. Dis. Rep.* 44:722–723.
30. Thames, WH. 1982. The genus *Pratylenchus*. In *Nematology in the southern region of the United States*. Arkansas, Fayetteville, USA, Southern Cooperative Series Bulletin 276, p. 108-126.
31. Verdejo-Lucas, S; Pinochet, J. 1992. Population densities of five migratory endoparasitic nematodes in carrot disk cultures. *Journal of Nematology* 24(1):96-98.
32. Villain, L. 2000. Caractérisation et bioécologie du complexe parasitaire du genre *Pratylenchus* (Nemata: Pratylenchidae) présent sur caféiers (*Coffea* sp.) au Guatemala. Tese Doutorado. Montpellier, França, CIRAD. p. 471-475.
33. Villain, L; Anzueto, F; Hernández, A *et al.* 1999. Los nematodos parásitos del cafeto. In Bertrand B, Rapidel B (eds.). *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. San José, Costa Rica, IICA-PROMECAFE. p. 118–33.
34. Villain, L; Baujard, P; Molina, A *et al.* 1998. Morphological and biological characterization of three *Pratylenchus* spp. populations parasiting coffee trees in Guatemala. *Int. Symp. Eur. Soc. Nematol.* (14., 1998, Unión Europea). *Proceedings. UE.* p. 600–601.
35. Villain, L; Figueroa, P; Molina, A *et al.* 2001. Reproductive fitness and pathogenicity of three *Pratylenchus* spp. isolates on *Coffea arabica*. *ONTA Reunion* (13., 2001, Guatemala). *Proceedings. Guatemala.* 163 p.
36. Villain, L; Molina, A; Sierra, S *et al.* 2000. Effect of grafting and nematicide treatments on damage by root lesion nematodes (*Pratylenchus* spp.) to *Coffea arabica* L. in Guatemala. *Nematropica* 6(12):87–100.
37. Villain, L; Pignolet, L; Michau-Ferrière, N *et al.* 2001. Evidence of resistance factors to *Pratylenchus* spp. on *Coffea canephora*. *Nematropica* 11(31):163.


  
 Polando Barrera

## 10 ANEXOS

**Cuadro 5 A.** Análisis de la varianza de *Pratylenchus coffeae* (20 Días después)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Nematodos	16	0.57	0.46	23.71

Fuente: Elaboración propia, 2017

**Cuadro 6 A.** Resumen de la varianza de *Pratylenchus coffeae* (20 días después)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.42	3	0.47	5.21	0.0156
Zanahoria	0.97	1	0.97	10.66	0.0068
Solución	0.43	1	0.43	4.76	0.0498
Zanahoria*Agar y Agua	0.02	1	0.02	0.23	0.6426
Error	1.09	12	0.09		
Total	2.51	15			

Fuente: Elaboración propia, 2017

**Cuadro 7 A.** Prueba de Tukey para el factor Zanahoria (20 días después)

Zanahoria	Medias	N	E.E.	
Disco	1.52	8	0.11	A
Cilindro	1.03	8	0.11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 8 A.** Prueba de Tukey para el factor Agar y Agua (20 días después)

Agar y Agua	Medias	N	E.E.	
Sin Agar y Agua	1.44	8	0.11	A
Con Agar y Agua	1.11	8	0.11	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 9 A.** Análisis de la varianza de *Pratylenchus coffeae* (40 Días después)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Nematodos	16	0.94	0.93	10.16

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 10 A.** Resumen de la varianza de *Pratylenchus coffeae* (40 días después)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	5.98	3	1.99	66.30	<0.0001
Zanahoria	5.22	1	5.22	173.67	<0.0001
Solución	0.08	1	0.08	2.68	0.1278
Zanahoria*Agar y Agua	0.68	1	0.68	22.54	0.0005
Error	0.36	12	0.03		
Total	6.34	15			

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 11 A.** Prueba de Tukey para el factor Zanahoria (40 días después)

Zanahoria	Medias	n	E.E.	
Disco	2.28	8	0.06	A
Cilindro	1.13	8	0.06	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 12 A.** Prueba de Tukey para la interacción Zanahoria y el Agar y Agua (40 días después)

Zanahoria	Agar y Agua	Medias	n	E.E.	
Disco	Con Agar y Agua	2.55	4	0.09	A
Disco	Sin Agar y Agua	2.00	4	0.09	B
Cilindro	Sin Agar y Agua	1.27	4	0.09	C
Cilindro	Con Agar y Agua	1.00	4	0.09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p>0.05$ )

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 13 A.** Análisis de la varianza de *Pratylenchus coffeae* (60 Días después)

Variable	N	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> Aj	CV
Nematodos	16	0.89	0.87	19.89

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 14 A.** Resumen de la varianza de *Pratylenchus coffeae* (60 días después)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	15.06	3	5.02	33.93	<0.0001
Zanahoria	9.66	1	9.66	65.34	<0.0001
Solución	0.08	1	0.08	0.53	0.4809
Zanahoria*Agar y Agua	5.31	1	5.31	35.93	0.0001
Error	1.78	12	0.15		
Total	16.83	15			

Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 15 A.** Prueba de Tukey para el factor Zanahoria (60 días después)

Zanahoria	Medias	n	E.E.	
Disco	2.71	8	0.14	A
Cilindro	1.16	8	0.14	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

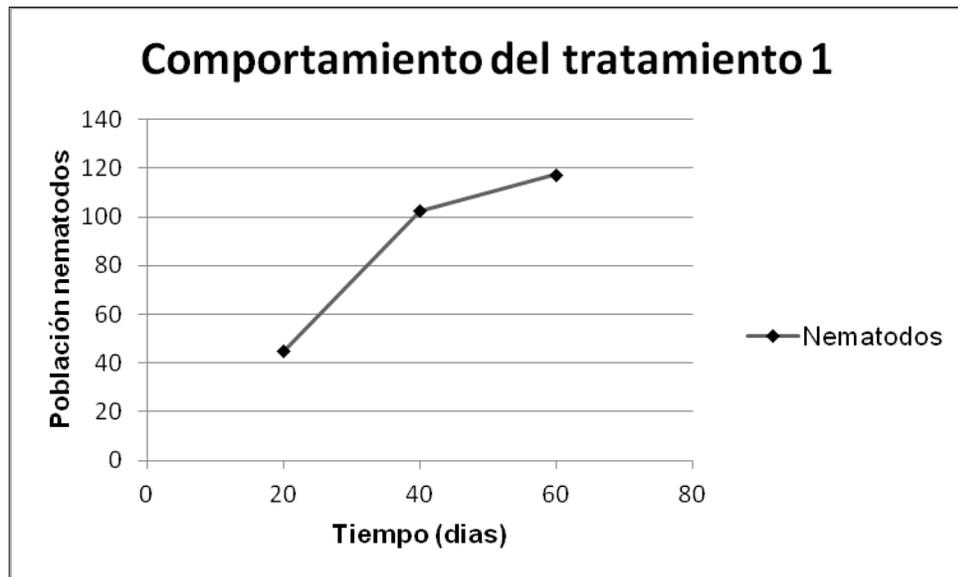
Fuente: Elaboración propia, 2017.

**Cuadro 16 A.** Prueba de Tukey para la interacción Zanahoria y el Agar y Agua (60 días después)

Zanahoria	Agar y Agua	Medias	n	E.E.	
Disco	Con Agar y Agua	3.36	4	0.19	A
Disco	Sin Agar y Agua	2.07	4	0.19	B
Cilindro	Sin Agar y Agua	1.66	4	0.19	B
Cilindro	Con Agar y Agua	0.65	4	0.19	C

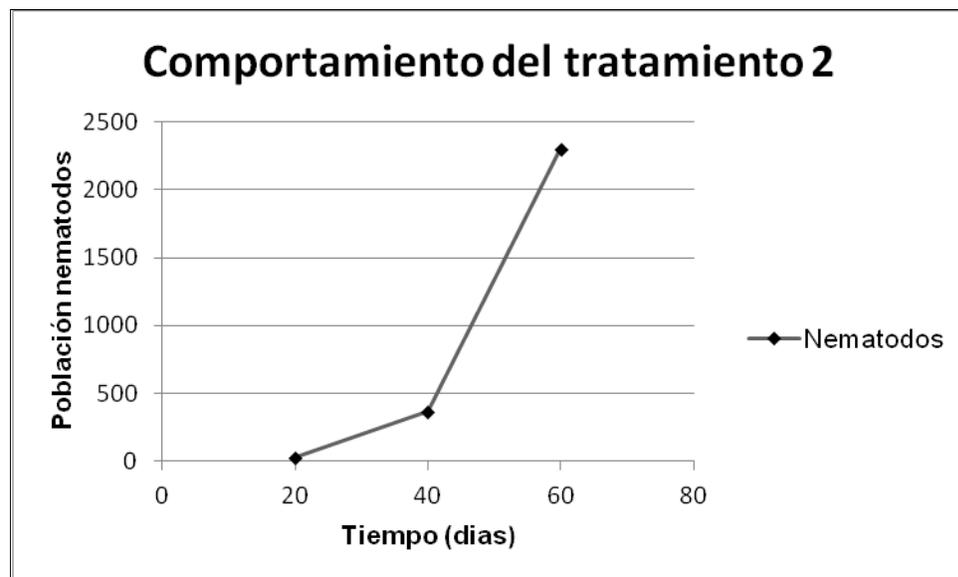
Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0.05$ )

Fuente: Elaboración propia, 2017.



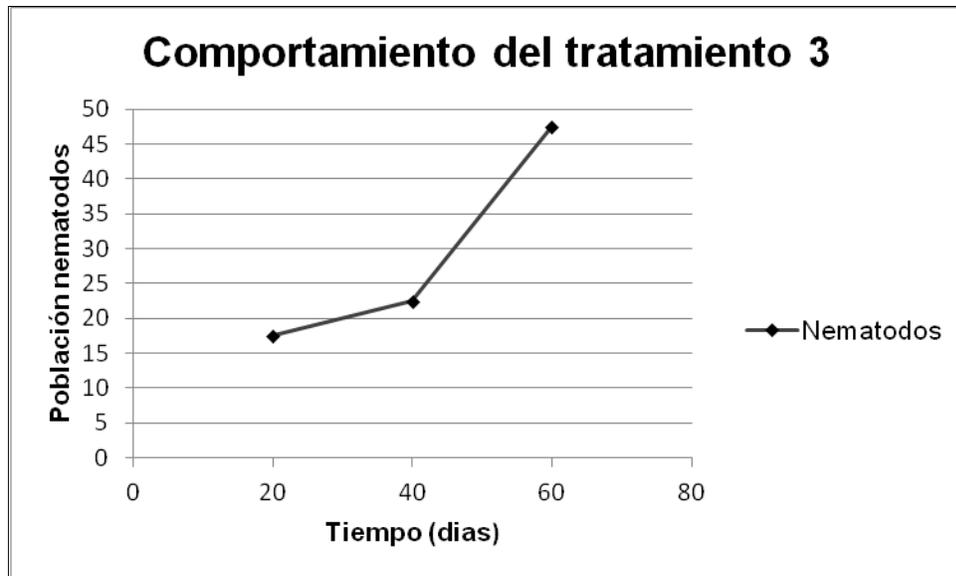
**Figura 26 A.** Gráfica del comportamiento del tratamiento 1

Fuente: Elaboración propia, 2017.



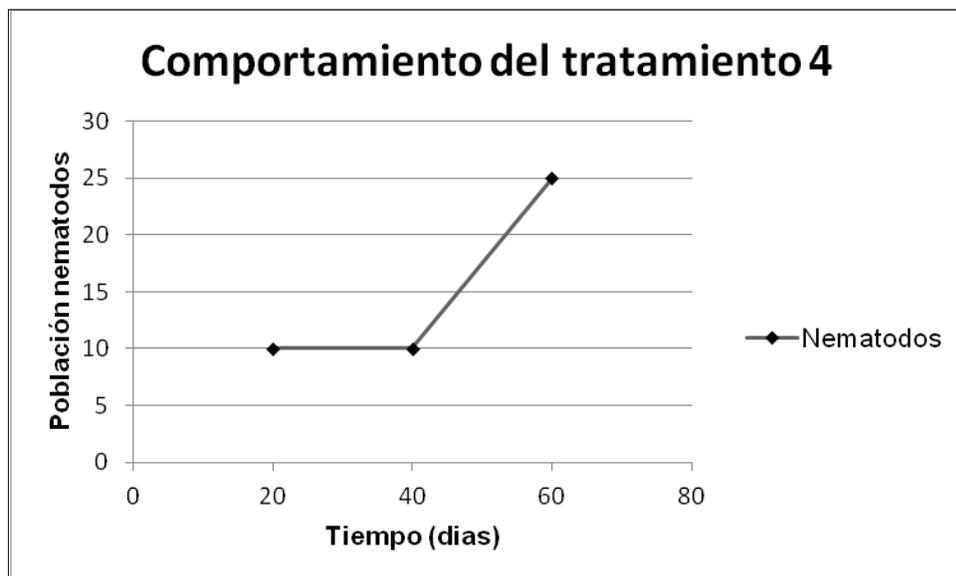
**Figura 27 A.** Gráfica del comportamiento del tratamiento 2

Fuente: Elaboración propia, 2017.



**Figura 28 A.** Gráfica del comportamiento del tratamiento 3

Fuente: Elaboración propia, 2017.



**Figura 29 A.** Gráfica del comportamiento del tratamiento 4

Fuente: Elaboración propia, 2017.

CAPITULO III: SERVICIOS REALIZADOS EN LA EMPRESA PEGÓN PILONCITO, S.A.





### 3.1 Presentación

La Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala se proyecta en diferentes comunidades e instituciones del país a través del Ejercicio Profesional Supervisado –EPS - el cual a lo largo de diez meses los estudiantes se desempeñan en tres áreas de trabajo que son: el diagnóstico, los servicios y la investigación.

Dentro del EPS, se desarrollaron una serie de servicios en la empresa Pegón Piloncito, S.A., de la Agropecuaria Popoyán, localizada en la aldea El Jocotillo, del municipio de Villa Canales, del departamento de Guatemala, ubicada a una distancia de 44.5 km de la ciudad capital, a través de diversas actividades de interés por parte de la empresa, como era establecer un protocolo para la evaluación de tolerancia-resistencia de cuatro patrones de café a *P. coffeae*, fijar esta misma investigación en campo, elaborar un manual de identificación de enfermedades a nivel pilón y producir fichas técnicas para cada uno de los pilones que tiene la empresa. Los objetivos comprendían solucionar las necesidades principales del departamento de mejora continua, enfocado en buscar un incremento de la innovación que conlleve un aumento en las ventas.

Al realizar el diagnóstico, se conocieron algunas limitaciones que presentaba la empresa, por lo que se hizo necesaria la implementación de ciertos servicios que contribuyeron al desarrollo de las necesidades. Dentro de los logros obtenidos con el desarrollo de los servicios se puede mencionar, la realización del protocolo desde la producción de inóculo de *Pratylenchus coffeae* hasta su establecimiento en macetas (ambiente controlado) y campo abierto, el realizar un manual completo de todas las enfermedades que pudieran afectar la producción de pilones para su uso en monitoreos preventivos y solucionar la necesidad de tener fichas técnicas para cada uno de los cultivos que tienen a la venta.

A continuación se realiza una descripción de los servicios prestados en el Pegón Piloncito durante el EPS.

### 3.1.1 Servicio I

Elaborar un protocolo para la evaluación de tolerancia-resistencia de 4 patrones de café a *P. coffeae* y establecerlo en macetas y en campo definitivo.

### 3.1.2 Introducción

Los nematodos parasíticos son uno de los mayores limitantes en la producción de café (*Coffea arabica*). A nivel mundial la producción pierde un 15% a causa de los nematodos, y Guatemala no es la excepción. En los últimos 30 años el impacto de los nematodos sobre el café ha aumentado debido al cultivo intensificado a través de la utilización de variedades de mayor rendimiento a densidades más altas. Esto, combinado con una menor o nula sombra, hace que los arboles de café sean más susceptibles a condiciones limitantes.

*Pratylenchus* es el género más difundido en Guatemala, con una amplia distribución en la Costa Sur-occidental (Villain *et al.*, 2002). Como parásito del café, el nematodo lesionador de la raíz, *Pratylenchus coffeae*, ha sido subestimado en términos de su importancia en la producción de café. En efecto, su comportamiento migratorio y los síntomas que induce – necrosis radicular no específico- no había llamado la atención de nematólogos, extensionistas y productores hasta hace poco tiempo. Sus daños son básicamente mecánicos, con la formación de lesiones que pueden ser invadidas por patógenos secundarios como bacterias u hongos, acelerando el proceso de degradación de las raíces, sobre todo la corteza.

La resistencia genética es considerada como el componente básico del control de los nematodos, esta alternativa es la más económica, reduciendo al mismo tiempo los riesgos de contaminación ambiental por la reducción del uso de productos químicos, hay una mejor armonía con el medio ambiente, es accesible al pequeño y mediano agricultor y se aplica la filosofía MIP.

En Guatemala se utiliza el porta-injerto “Nemaya” desde hace varios años, la cual presenta la característica de ser altamente resistente a *Meloidogyne spp.* y tener cierto nivel de tolerancia y resistencia en el control de *Pratylenchus coffeae*; sin embargo con el transcurrir del tiempo productores que antes no presentaban pérdidas por daño de nematodos ahora se

presentan en sus fincas. Es por ello la importancia de esta investigación, ya que es necesario contar con otra alternativa para utilizar como porta-injerto que minimicen los efectos del nematodo lesionador (*P. coffeae*) lo que se traduce en mayor productividad y por ende contribuirá en la seguridad alimentaria del país efectiva para lograr una caficultura sostenible, competitiva y de calidad.

## 3.2 Objetivos

### 3.2.1 General

1. Elaborar un protocolo para evaluar la resistencia de patrones de café (*Coffea spp.*) seleccionados al ataque del nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*) a nivel de macetas y campo.

### 3.2.2 Especifico

1. Establecer el ensayo en fase de macetas y fase de campo para evaluar la resistencia de posibles patrones de café (*Coffea spp.*) seleccionados al ataque del nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*).

## 3.3 Metodología

A continuación se describe el procedimiento para realizar el protocolo de investigación así como para establecer la misma y evaluar la resistencia a nematodos fitopatógenos en varias líneas de café utilizando macetas y en campo definitivo.

### 3.3.1 Protocolo de investigación

Para lograr realizar el protocolo de investigación fue necesaria una exhaustiva revisión bibliográfica, ya que no existe mucha información acerca de evaluaciones que se hayan hecho anteriormente. Posteriormente se elaboró todos los lineamientos correspondientes, para ser presentado el proyecto e iniciarlo.

### 3.3.2 Establecimiento de la investigación

Producción en condiciones controladas del nematodo lesionador (*P. coffeae*)

Para el desarrollo de esta fase fue necesario contar con raíces provenientes de cultivo de café con infestación altas de *P. coffeae*. El inóculo inicial fue obtenido de finca El Platanar ubicada en el municipio de Acatenango del departamento de Chimaltenango.

### 3.4 Materiales

- Raíces de café con daños de *P. coffeae*
- Cajas Petri de vidrio de 9 cm de diámetro y 2 cm de alto
- Microscopio
- Estereoscopio
- Papel mayordomo
- Incubadora
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Tijeras
- Balanza analítica
- Erlenmeyer's
- Pipetas, micropipetas y puntas de micropipeta
- Parafilm
- Guantes quirúrgicos
- Pinzas
- Pelador de vegetales
- Cuchillo
- Lámpara de alcohol
- Microfiltro 0.2µm
- Zanahorias crudas
- Bombas de pecera
- Lavamanos
- Agua esterilizada
- Beakers
- Sulfato de estreptomicina
- Etanol al 70% y 95%.
- Papel aluminio
- Pipetas Pasteur
- Contador
- Cámara de conteo para nematodos
- Medio de cultivo Agar
- Hipoclorito de sodio 3%

#### 3.4.1 Preparación del medio de cultivo agar y agua (1 %)

- En un Erlenmeyer, se vertieron 200 ml de agua destilada y se agregaron 2 g de Agar para tener una solución al 1 %. Luego se colocó en una estufa por 20 min a una temperatura de 80 °C para que empezara a calentar el medio, además se agitó para que disolviera el Agar en el agua.
- Se introdujo el Erlenmeyer y se esterilizo en la autoclave a 121 °C por 15 min, luego se dispensaron alícuotas de 2 ml de la solución en cada una de las cajas Petri.

### 3.4.2 Preparación de los discos y cilindros de zanahoria *in vitro*

- Se seleccionaron zanahorias limpias, con una forma cilíndrica (un diámetro aproximado de 3 cm) en lugar de una forma cónica. Las zanahorias no estaban agrietadas, ni muy gruesas y que no muy suculentas ya que tienden a ser más susceptibles a la pudrición durante la incubación en comparación con una no suculenta.
- Con una manguera de lavamanos se lavaron las zanahorias seleccionadas, dejando correr el agua a modo de quitarle cualquier partícula de suelo. Se introdujeron en hipoclorito de sodio al 3 % por 15 min. Después se limpiaron con agua esterilizada antes de usarlas.
- Se introdujeron 2 L de agua destilada, cajas Petri, papel mayordomo, pipetas, perforadores cilíndricos, pinzas, tijeras, pelador de verduras y cuchillo en la autoclave para esterilizarse a una temperatura de 121 °C por 15 min.
- Se desinfectó la cámara de flujo laminar con etanol al 70 % pasando papel mayordomo esterilizado y etanol sobre la superficie en la cual se trabajó.
- Las pinzas, cuchillo y el pelador de verduras se desinfectaron, antes de utilizarlas, flameándolas con el mechero y posteriormente introduciéndolas en etanol al 70 %.
- En la cámara de flujo laminar se esterilizaron las zanahorias. Sosteniendo, cada zanahoria, con pinzas se flamearon con el mechero, luego se rociaron con un atomizador conteniendo etanol al 70 % y se volvió a pasar sobre el mechero; se repitió dos veces este proceso.
- Trabajando sobre el papel mayordomo, se removió la corona de la zanahoria con el cuchillo y se removió la epidermis de la zanahoria con el pelador de verduras.
- Con un perforador cilíndrico y un cuchillo se cortaron las zanahorias peladas en cilindros de 20 mm de largo y 5 mm de diámetro.
- Luego se transfirieron a un beaker esterilizado, el cual se cubrió después de introducir cada uno de los mismos.

### 3.4.3 Extracción de nematodos de raíces infectadas

- Se eligieron raíces con síntomas de infestación de *P. coffeae*, como raíces con necrosamiento progresivo a partir de los puntos de penetración del nematodo, desaparición de raíces secundarias (Agrios, 2005).
- Las raíces se lavaron con agua a presión para eliminar el exceso de suelo (ver figura 14). Dejando escurrir para eliminar el exceso de agua.
- Con una tijera se cortaron las raíces en fragmentos de aproximadamente 1 cm de longitud, acumulando muestras de 30 g de raíces.
- Cada 30 g de raíces se colocaron en un Erlenmeyer de 500 ml, aforando el recipiente con agua desmineralizada hasta su capacidad máxima.
- Se introdujo, a cada Erlenmeyer, una pipeta Pasteur conectada a una bomba de pecera, esto con el objetivo de oxigenar y permitir que los nematodos salieran de las raíces. Se mantuvo este sistema por 48 horas.
- Pasadas las 48 horas se colectaron los nematodos que se encontraban suspendidos en el agua, para ello se filtraron en dos tamices, arriba se utiliza un tamiz número 20 mesh para que retuviera las raíces y dejara pasar únicamente el agua con nematodos y por abajo se coloca un tamiz número 400 mesh el cual retuvo los nematodos y dejara pasar el agua. Se recolectaron a modo de obtener un volumen mínimo de agua con una concentración mayor de nematodos, el producto del filtrado se colocó en un beaker.

### 3.4.4 Identificación de *Pratylenchus coffeae*

- Se transfirió la extracción de nematodos a una caja de Petri.
- Con la ayuda del estereoscopio, la guía de identificación de nematodos fitoparásitos de la revista *Nematology* y una micropipeta se identificaron y pescaron los nematodos.

- Se trasladaron los nematodos a una probeta de 10 ml.

#### 3.4.5 Selección y esterilización de los nematodos

- Utilizando una balanza analítica, se pesaron 6 mg de sulfato de estreptomicina en un pedazo de papel aluminio.
- Se transfirió estos 6 mg de estreptomicina a una probeta con 10ml de agua esterilizada, dando como resultado una concentración de 6000 ppm. Se agito esta solución a modo de disolver la estreptomicina.
- Se dejaron asentar los nematodos al fondo de la probeta por 1 hora. Con una micro-pipeta se redujo el volumen a 5 ml, solamente succionando de la superficie. De la solución de estreptomicina, se transfirió 5 ml a la probeta con nematodos. Se dejaron por 1 hora los nematodos, nuevamente se redujo el volumen a la mitad de la probeta. Se vertió con agua esterilizada el volumen faltante y se dejó asentar otra hora más. El proceso se repitió una tercera vez, dejando reposar 30 min para finalmente lograr un volumen deseado.

#### 3.4.6 Inoculación de *P. coffeae* en zanahoria

- Las cajas Petri se colocaron con los discos de zanahoria en la cámara de flujo laminar. Se transfirieron los nematodos de la probeta, con una micropipeta, a la superficie de la zanahoria.
- Se colocaron pequeñas gotas de la suspensión de nematodos en los márgenes de los discos de la zanahoria, aplicando aproximadamente 50 individuos de *P. coffeae* por caja de Petri.
- Las cajas Petri conteniendo los nematodos y la zanahoria se sellaron con parafilm, y cada una de estas fue etiquetado con fecha de inoculación y el nombre de la especie.
- Se colocaron las cajas Petri dentro de una incubadora a una temperatura de 27 °C. Se incubaron en la oscuridad para replicar las condiciones del suelo. Se revisaron las cajas de

- Petri periódicamente. Materia color blanco en la superficie de las zanahorias fue un buen indicador del cultivo en la incubación.

### 3.5 Evaluación de resistencia en macetas

Para el desarrollo de esta fase es necesario contar con las 4 líneas de café a evaluar además de un testigo susceptible para medir la agresividad y el daño de *P. coffeae* en el cultivo del café. Además de contar con el inoculo que se produjo en la fase previa, para hacer las aplicaciones en las macetas.

#### 3.5.1 Materiales

- Inoculo de *Pratylenchus coffeae*
- Sustrato (Peat Moss y fibra de coco)
- Pipetas Pasteur
- Tubetes de plástico de 250 ml
- Macetas de 45 litros
- Balanza analítica
- Agua y fertilizantes
- Semillas de café a evaluar
- Bandejas de duroport de 242 celdas
- Caldera
- Pistola de madera
- Cubetas
- Sobres de papel (tamaño carta)

#### 3.5.2 Obtención de la semilla

La semilla fue proporcionada por ANACAFE, en la época de cosecha del cultivo, de las siguientes variedades:

- Anacafé 14
- Icatú
- Parainema
- Nemaya (Testigo resistente)
- Borbón (Testigo susceptible)

### 3.5.3 Clasificación de la semilla

- Las semillas de café deben clasificarse para lograr semillas homogéneas al momento de sembrar, las semillas se deben sumergir en agua durante 2 días. Al finalizar extraer las semillas del agua y colocar en recipientes para su clasificación.
- Colocar las semillas sobre mesas y clasificar las semillas que no se pueden sembrar, tomando los siguientes criterios:
  - Extracción de semillas con defectos: semillas caracoles, semillas triangulares, semillas elefantes.
  - Extracción de semillas con daños: perforaciones de la semilla por broca del café, semilla fermentada en el proceso de secado, semilla con daños mecánicos en el proceso.
- Homogenizar las semillas que no estén dentro de los criterios anteriores, según el tamaño (grande, mediana y pequeña).

### 3.5.4 Siembra de la semilla

- Llenar las bandejas con sustrato.
- Colocar la semilla de café, a una profundidad de 1.5 cm, con la parte plana hacia abajo y al centro de la celda en la bandeja, luego tapar con sustrato.
- Llevar las bandejas al invernadero para su pre-germinación, entre 55 a 60 días aproximadamente.

#### 3.5.4.1 Preparación del sustrato

- Tamizar los sustratos (Peat Moss y fibra de coco) para eliminar partículas grandes y lograr una mayor uniformidad.
- Realizar desinfección al sustrato (Peat Moss y fibra de coco) a 80°C por 2 horas.
- Trasladar el sustrato al lugar de trasplante definitivo.
- Llenar las macetas con el sustrato (30% Peat Moss, 70% Fibra de coco) y colocar donde se realice el trasplante definitivo.

### 3.5.4.2 Selección de plantas para trasplante a macetas

- Revisar las plantas para verificar que tengan un buen desarrollo de raíz pivotante y recta, abundantes raíces secundarias.
- Eliminar las plantas que no presenten estas características.

### 3.5.4.3 Trasplante de plantulas a maceta

- Hacer un agujero al centro de la maceta, el ancho y largo del agujero será acorde al tamaño de la raíz de la planta.
- Colocar la planta dentro del agujero, compactar con los dedos el sustrato para que no se encuentren espacios porosos.
- Al terminar el proceso de trasplante, aplicar un riego profundo a las plántulas de café.
- Colocar las macetas de acuerdo al arreglo espacial del diseño experimental.
- Se debe identificar las macetas con etiquetas con los siguientes datos: fecha de trasplante, tratamiento y repetición.

### 3.5.4.4 Aplicación de fertirriego

A diario el regador debe seguir el programa de fertirriego proporcionado por el técnico a cargo, el criterio para la aplicación del fertirriego es en función de clima, pH, C.E. y evapotranspiración, se tomará en consideración una nutrición balanceada aportando en cada litro de solución los siguientes nutrientes (ppm):

**Cuadro 17** Productos a usar en fertirriego

<b>Producto</b>	<b>Ppm</b>
9-45-15	300
Acido fosfórico	40
15-0-15	750
20-18-20	1000
Aminoácidos, y microelementos	1000

Fuente: Elaboración propia.

### 3.5.4.5 Inoculación de nematodos

- Cuatro meses después del trasplante a las macetas, se realizó la inoculación de *P.coffeae*.
- Se llevó el inoculo donde este establecido el ensayo.
- Se realizó un agujero a 5 cm de distancia de la base del tallo y con una profundidad de 8 a 10 cm en el sustrato.
- Con una pipeta Pasteur se tomó el inoculo y aplicar en el agujero (1000 nematodos/maceta).
- Se tapó con el mismo sustrato el agujero.

### 3.6 Evaluación de resistencia en campo

Para el desarrollo de esta fase fue necesario contar con las 4 líneas de café además de un testigo susceptible para evaluar la resistencia genética a los nematodos fitoparásitos en fincas con altas poblaciones de esta plaga en el cafeto.

#### 3.6.1 Materiales

- Fincas productoras de café con altas poblaciones de *Pratylenchus coffeae* y *Meloidogyne spp.*
- Sustrato (Peat Moss y fibra de coco)
- Tubetes de plástico de 250 ml
- Balanza analítica
- Navaja injertadora
- Parafilm
- Semillas de café a evaluar y para injerto
- Bandejas de duroport
- Cubetas
- Agua y fertilizantes
- Alcohol al 70%
- Algodón

#### 3.6.1.1 Obtención de la semilla

La semilla fue proporcionada en la época de cosecha del cultivo, de las siguientes variedades:

- Anacafé 14

- Icatú
- Parainema
- Nemaya (Testigo resistente)
- Borbón (Testigo susceptible)
- Sarchimor (Material injerto)

### 3.6.1.2 Clasificación de la semilla

- Las semillas de café deberán clasificarse para lograr semillas homogéneas al momento de sembrar, sumergirlas en agua durante 2 días. Al finalizar extraer las semillas del agua y colocar en recipientes para su clasificación (Anacafe, 2016).
- Se colocaron las semillas sobre mesas y se clasificaron las semillas que no se pueden sembrar, tomando los siguientes criterios:
  - Extracción de semillas con defectos: semillas caracoles, semillas triangulares, semillas elefantes.
  - Extracción de semillas con daños: perforaciones de la semilla por broca del café, semilla fermentada en el proceso de secado, semilla con daños mecánicos en el proceso.
- Se homogenizaron las semillas que no estén dentro de los criterios anteriores, según el tamaño (grande, mediana y pequeña).

### 3.6.1.3 Siembra de la semilla

- Se llenaron las bandejas con sustrato.
- Se colocó la semilla de café, a una profundidad de 1.5 cm, con la parte plana hacia abajo y al centro de la celda en la bandeja, luego tapar con sustrato.
- Se llevaron las bandejas al invernadero para su pre-germinación, entre 45 a 60 días aproximadamente.

### 3.6.1.4 Injertado

#### 3.6.1.4.1 Selección de plantas para injerto (Patrones)

- Revisar las plántulas para verificar que tengan un buen desarrollo de raíz pivotante y recta, abundantes raíces secundarias.
- Las plántulas que no presente estas características se eliminan.

#### 3.6.1.4.2 Selección de plantas para injerto (Sarchimor)

- Utilizar plantas en estado de “soldado”.
- Revisar las plántulas para verificar que tengan un buen desarrollo de raíz pivotante y recta.

#### 3.6.1.4.3 Realización del injerto de tipo “Reyna”

- Tomar el patrón, con la navaja cortar el tallo y hacer una hendidura.
- Cortar el material (Sarchimor) arriba de la raíz y hacer una “cuña”.
- Introducir el material (Sarchimor) en la hendidura del patrón procurando que quede ajustado (Anzueto, *et al.*, 1996).
- Colocar una tira de parafilm, empezando medio centímetro abajo del corte del patrón, enrollándolo de tal forma que cubra medio centímetro arriba de la cuña.
- Cada 10 injertos desinfectar la navaja con alcohol en un algodón.

### 3.6.1.5 Trasplante a tubete

#### 3.6.1.5.1 Preparación del sustrato

- Tamizar los sustratos (Peat Moss y fibra de coco) para eliminar partículas grandes, lograr una mayor uniformidad y realizar las mezclas con sus proporciones correspondientes (1:1).
- Introducir el sustrato en una caldera, desinfectar a una temperatura de 80°C por 2 horas.
- Trasladar el sustrato a las camas de cultivo.
- Llenar los tubetes con el sustrato y colocar sobre las camas del trasplante.

### 3.6.1.5.2 Trasplante de injertos a tubete

- Hacer un agujero al centro del tubete con la pistola de madera, el ancho y largo del agujero será acorde a la raíz de la plántula.
- Colocar la plántula dentro del agujero, compactar con los dedos el sustrato para no encontrar espacios porosos.
- Al terminar el proceso de trasplante, aplicar un riego profundo a las plántulas de café.
- Se debe identificar los materiales sembrados con etiquetas en sus respectivas camas con los siguientes datos: fecha de trasplante y variedad.

### 3.6.1.6 Aplicación de fertirriego

A diario el regador debe seguir el programa de fertirriego proporcionado por el técnico a cargo, el criterio para la aplicación del fertirriego es en función de clima, pH, C.E. y evapotranspiración, se tomará en consideración una nutrición balanceada aportando en cada litro de solución los siguientes nutrientes (ppm):

**Cuadro 18** Productos a usar en fertirriego

Producto	Ppm
9-45-15	300
Acido fosfórico	40
15-0-15	750
20-18-20	1000
Aminoácidos, y microelementos	1000

Fuente: elaboración propia.

### 3.6.1.6.1 Trasplante a campo

Realizar un ahoyado, con una coba, en el terreno con un distanciamiento de 1.25 m entre planta y 2.0 m entre calle.

- Trasladar los tubetes al campo del ensayo.
- Se debe sacar cada pilón del tubete y sembrar en el campo, de acuerdo a la distribución espacial, tomando las siguientes consideraciones:
  - Sembrar únicamente plantas sanas y vigorosas, con 2 ó 3 cruces (Anzueto, 1993).
  - Al sembrar las plantas, cuidar que éstas no queden demasiado enterradas.
  - Evitar que la raíz principal quede doblada, apisonando bien la tierra alrededor del pilón, para evitar cámaras de aire.

### 3.7 Manejo Fitosanitario

Se deben realizar aplicaciones preventivas en contra de las principales plagas y enfermedades según la fenología del cultivo.

- Se deben instalar trampas para el control de las plagas. Solamente cuando los muestreos de las trampas reporten niveles iguales o mayores al daño económico, realizar aplicaciones de control biológico o químico (Anacafe, 2016).

**Cuadro 19.** Principales enfermedades del café y su control preventivo

<b>Enfermedad</b>	<b>Ingrediente activo del producto para control</b>	<b>Dosis (gramo por litro)</b>
Mal del talluelo ( <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> , <i>Phytophthora spp.</i> )	Propamocarb	1.00
Mancha de hierro ( <i>Cercospora coffeicola</i> ) Antracnosis ( <i>Colletotrichum coffeanum</i> )	Carbendazim	0.80
Roya ( <i>Hemileia vastatrix</i> ) Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> )	Azoxystrobin y Cyproconazole	0.50

Fuente: Elaboración propia.

### 3.8 Resultados

A continuación presentan las portadas de cada una de las fases del protocolo de la evaluación de resistencia de patrones de café (*Coffea canephora*) seleccionados al ataque del nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*) (Figura 30).



**Figura 30.** Portadas de cada fase del protocolo.

El establecimiento de la investigación, tanto en macetas como en tubetes para trasplantar a campo definitivo, se muestra a continuación.



**Figura 31.** Investigación en maceta establecido.



**Figura 32.** Rotulación de los bloques y tratamientos.



**Figura 33.** Planta de café en maceta.



**Figura 34.** Pilones de café injertados, para trasplantarlos a campo definitivo.  
Fuente: Elaboración propia

### 3.9 Conclusiones

1. Se elaboró un protocolo de investigación para llevar a cabo la evaluación de resistencia de patrones de café (*Coffea spp.*) seleccionados al ataque del nematodo lesionador (*Pratylenchus coffeae*) a nivel de macetas y campo.

2. De acuerdo a la metodología del protocolo, se estableció la investigación a nivel de maceta y campo definitivo.

### 3.10 Bibliografía

1. Agrios, G. (2005). Plant pathology. Academic press, 5<sup>th</sup> Ed. 952 p.
2. Anacafé. (s.f.). Recuperado el 16 diciembre de 2016, de [https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=10CON:Anacafe\\_mision](https://www.anacafe.org/glifos/index.php?title=10CON:Anacafe_mision).
3. Anzueto F. (1993). Etude de la resistance du cafeier (*Coffea* sp.) à *Meloidogyne* sp. et *Pratylenchus* sp. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes, DS thesis, Rennes.
4. Anzueto F, Bertrand B, Peña M et al. (1996). Desarrollo de una variedad porta-injerto resistente a los principales nematodos de America Central. Proceedings Simp Caficultura Latino-americana: 7



### 3.11 Servicio II

Elaborar un manual de identificación de enfermedades para soporte de monitoreos del departamento de fitosanidad.

#### 3.11.1 Introducción

Tradicionalmente el horticultor realizaba su propio semillero o almacigo. Anteriormente, el tomate y pimiento se trasplantaba a raíz desnuda en el campo. El pepino, sandía y melón se sembraban directamente, pero con la llegada de la horticultura protegida esto cambio. Aparte de ganar precocidad, este sistema permite un mayor control de la sanidad en la plantación. Empresas como Pegón Piloncito se especializan en producir pilones de la más alta calidad que van libres de enfermedades o plagas que puedan afectar su desarrollo en campo definitivo.

Algunos problemas relacionados con las enfermedades de suelo desaparecieron al usar sustratos, sin embargo otros persisten cuando se tienen descuidos en el manejo del sustrato, recurso hídrico, propagación y condiciones favorables de enfermedades que afectan las plántulas. Existen enfermedades que afectan a la semilla antes de germinar, durante la germinación y post emergencia hasta que aparece la primera o segunda hoja verdadera. Las semillas de las hortalizas, cucurbitáceas, crucíferas, entre otras, pueden ser portadoras de diferentes patógenos, algunos de difícil control y cuyos síntomas pueden no manifestarse durante el tiempo que permanecen los pilones dentro del invernadero.

Los hongos que afectan a los pilones son muy diversos, estos pueden estar presentes en maleza alrededor de los invernaderos, esporas en el aire o propagarse mecánicamente; entre los que más destacan: *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Rhizoctonia spp.*, *Fusarium* y *Alternaria spp* (Agrios, 1995). Las enfermedades bacterianas son menos comunes pero muchas veces, más devastadoras cuando se presentan, estas provienen principalmente de semillas contaminadas o propagadas mecánicamente (Jones, *et al.*, 2001). Entre las bacterias que más afectan a los pilones se puede mencionar: *Erwinia spp.*, *Pseudomonas spp.*, y *Xanthomonas spp.*

El departamento de fitosanidad de Pegón Piloncito, de acuerdo a su compromiso con sus clientes de entregarles pilones de la más alta calidad, realiza monitoreos periódicos en sus invernaderos para enfermedades. Al no contar con un manual técnico, con fotografías y descripciones de las enfermedades, los monitoreos se complican; es por ello que se realizó un manual de identificación de enfermedades para los pilones que produce la empresa.

### **3.12 Objetivo**

#### 3.12.1 General

1. Elaborar un manual de identificación de enfermedades para utilizarlo en monitoreos sobre pilones que produce la empresa Pegón Piloncito.

### **3.13 Metodología**

#### 3.13.1 Obtención de registros históricos en monitoreos

Para comenzar, se recopilaron los registros de monitoreos de los últimos años por el departamento de fitosanidad. Esta información contenía datos como: cultivo, edad de la planta y enfermedad. Con esta información se logró elaborar un listado de las enfermedades que tenían mayor incidencia en los pilones y así partir a la elaboración del manual.

#### 3.13.2 Revisión bibliográfica

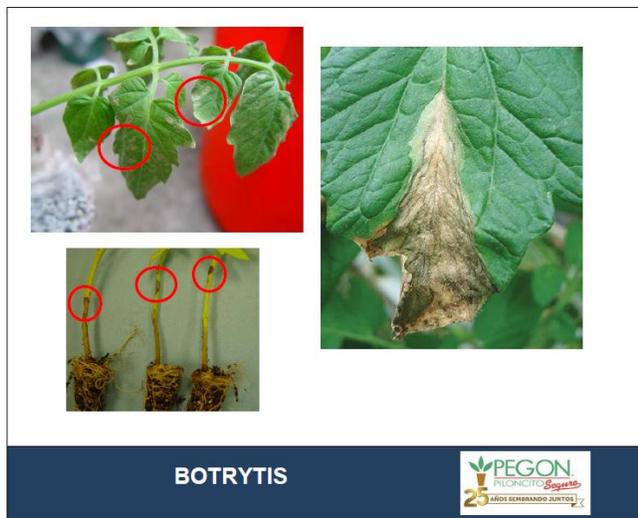
Con el listado de las enfermedades, se investigo acerca de cada una a nivel de plántula o pilón. La búsqueda se basó en tres ejes importante: síntomas y signos, causas y factores favorecedores y prácticas de manejo de las enfermedades. Además de encontrar esta información se buscaron imágenes claras y representativas de estas enfermedades.

### 3.13.3 Elaboración del manual de identificación de enfermedades

Con la información obtenida de la revisión bibliográfica, se redactó de una manera simple y concreta, el manual de identificación, para que la persona que esté a cargo de los monitoreos le sea fácil el uso del mismo. Se colocaron las respectivas fotografías de cada enfermedad de manera congruente con la información descrita.

### 3.14 Resultados

A continuación se presenta una muestra del manual de identificación de enfermedades, que actualmente usa el departamento de fitosanidad de Pegón Piloncito en sus monitoreos periódicos a los pilones.



**Figura 35.** Anverso de la enfermedad *Botrytis spp.* del manual de identificación de enfermedades.

<b>BOTRYTIS</b>	
SÍNTOMAS Y SIGNOS	PRINCIPALES PRÁCTICAS DE MANEJO
<ul style="list-style-type: none"> <li>En hojas, el hongo produce lesiones de color café oscuro localizadas en el ápice, sin halo clorótico, pero algunos anillos concéntricos en el haz.</li> <li>En el tallo se manifiestan lesiones deprimidas, circulares o elipsoides de color café oscuro, que luego progresan y pueden comprometer uno o varios tallos, producir su doblamiento y causar la muerte de la planta.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>FAVORECER LA ADECUADA CIRCULACIÓN DEL AIRE dentro del invernadero.</li> <li>Mantener una NUTRICIÓN ADECUADA DE LA PLANTA. Plantas que están estresadas nutricionalmente son más susceptibles.</li> </ul>
CAUSA Y FACTORES FAVORECEDORES	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ascomyceto.</li> <li>Causada por el HONGO FITOPATOGENO <i>Botrytis cinérea</i>.</li> <li>El hongo se DISEMINA FÁCILMENTE por el viento, las herramientas y el salpique del agua.</li> <li>Los RIEGOS CONTINUOS, HUMEDAD RELATIVA ALTA Y TEMPERATURAS ENTRE 15°C - 22°C favorecen el desarrollo del hongo.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ROTACIÓN DEL CULTIVO dentro de los invernaderos para reducir la presencia del patógeno.</li> <li>ELIMINAR INMEDIATAMENTE las plantas que presenten síntomas del hongo.</li> </ul>

**Figura 36.** Reverso de la enfermedad *Botrytis spp.* del manual de identificación enfermedades.



**Figura 37.** Anverso de la enfermedad *Mycena citricolor* u “ojo de gallo”, del manual de identificación de enfermedades.

OJO DE GALLO	
<b>SINTOMAS Y SIGNOS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Se caracteriza por numerosas manchas en las hojas, más o menos circulares de 5 a 15 mm de diámetro de color gris; en brotes tiernos tienden a ser ovalados de color negro, luego aumentan de tamaño y cambian de color.</li> <li>En condiciones óptimas, el hongo desarrolla sobre las manchas unos HILITOS AMARILLOS (gemas) en forma de pequeños afleres erguidos y doblados.</li> </ul>	<b>PRINCIPALES PRÁCTICAS DE MANEJO</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>PODAR periódicamente la sombra para tener una buena aireación y abatir la humedad en el ambiente.</li> <li>Mantener una NUTRICIÓN ADECUADA DE LA PLANTA. Plantas que están estresadas nutricionalmente son más susceptibles.</li> <li>ELIMINAR INMEDIATAMENTE las plantas que presenten síntomas del hongo.</li> </ul>
<b>CAUSA Y FACTORES FAVORECEDORES</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Se desarrolla en condiciones de mucha sombra, arriba de los 700 MSNM, con alto grado de humedad en el ambiente y temperaturas frescas comprendidas entre los 19°C y 23°C.</li> <li>El hongo se dispersa fácilmente con la lluvia, viento, insectos y personas.</li> </ul>	

**Figura 38.** Reverso de la enfermedad *Mycena citricolor* u “ojo de gallo”, del manual de identificación de enfermedades



**Figura 39.** Anverso de la enfermedad *Colletotrichum gloeosporoides* o “antracnosis”, del manual de identificación de enfermedades.

ANTRACNOSIS	
<b>SINTOMAS Y SIGNOS</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Se observan en hojas pequeñas lesiones de color café oscuro a negro, pueden empezar desde el ápice siguiendo las venas. Estas pueden aumentar en tamaño convirtiéndose en pequeños chancros deprimidos.</li> <li>En el hipocotilo los síntomas iniciales se presentan como manchas longitudinales y después como lesiones ovaladas y deprimidas.</li> </ul>	<b>PRINCIPALES PRÁCTICAS DE MANEJO</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>FAVORECER LA ADECUADA CIRCULACIÓN DEL AIRE dentro del invernadero.</li> <li>Mantener una NUTRICIÓN ADECUADA DE LA PLANTA. Plantas que están estresadas nutricionalmente son más susceptibles.</li> <li>ROTACIÓN DEL CULTIVO dentro de los invernaderos para reducir la presencia del patógeno.</li> <li>ELIMINAR INMEDIATAMENTE las plantas que presenten síntomas del hongo.</li> </ul>
<b>CAUSA Y FACTORES FAVORECEDORES</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Ascomyceto.</li> <li>Causada por el HONGO FITOPATÓGENO <i>Colletotrichum gloeosporoides</i>.</li> <li>Se presenta cuando hay días frescos a fríos con humedad relativa alta (90%).</li> <li>Favorecida por temperaturas entre 14°C - 26°C y RIEGOS MODERADOS FRECUENTES con poca ventilación.</li> </ul>	

**Figura 40.** Reverso de la enfermedad *Colletotrichum gloeosporoides* o “antracnosis”, del manual de identificación de enfermedades

### 3.15 Conclusión

La empresa Pegón Piloncito cuenta con un manual de identificación de enfermedades, el cual utiliza el departamento de fitosanidad para realizar los muestreos periódicos de sus pilones.

### 3.16 Bibliografía

1. Agrios, G. 1995. Fitopatología. 2 ed. México, Limusa. 821 p.
2. Jones, J; Stall, R; Zitter, T. 2001. Enfermedades de las plántulas. Madrid, España, MundiPrensa / The American Phytopathological Society. p. 2-3.



Polando Ramos