



Esta obra está bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-
NoComercial-Compartirigual 2.5 Perú](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/).

Vea una copia de esta licencia en
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**Diagnóstico y control *in vitro* de enfermedades fungosas de orquídeas
(*Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp) del vivero de la Universidad Nacional
de San Martín – Tarapoto**

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Jhanet Yovana Díaz Velásquez

ASESOR:

Ing. Eybis José Flores García

Tarapoto - Perú

2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN - TARAPOTO

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



Diagnóstico y control *in vitro* de enfermedades fúngicas de orquídeas
(*Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp) del vivero de la Universidad Nacional
de San Martín – Tarapoto

Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Jhanet Yovana Díaz Velásquez

Sustentada y aprobada el día 18 de octubre del 2018, ante el honorable jurado

.....
Blgo. Dr. Winston Franz Ríos Ruiz
Presidente

.....
Ing. M.Sc. Patricia Elena García González
Secretario

.....
Ing. Marvin Barrera Lozano
Miembro

.....
Ing. Eybis José Flores García
Asesor

Declaración de Autenticidad

Yo, JHANET YOVANA DÍAZ VELÁSQUEZ, egresado(a) de la Facultad de CIENCIAS AGRARIAS de la Escuela Profesional de AGRONOMÍA, de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, identificado con DNI N° 42784033, Domiciliado en: Jr. 18 de Marzo N° 151 - Tarapoto, San Martín, con la tesis titulada: “DIAGNÓSTICO Y CONTROL *IN VITRO* DE ENFERMEDADES FUNGOSAS DE ORQUÍDEAS (*Dendrobium sp* Y *Phalaenopsis sp*) DEL VIVERO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN – TARAPOTO”.

Declaro bajo juramento que:

1. La tesis presentada es de mi autoría.
2. He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas. Por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
3. La tesis no ha sido auto plagiada; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados que se presenten en la tesis se constituirán en aportes a la realidad investigada.

De considerar que el trabajo cuenta con una falta grave, como el hecho de contar con datos fraudulentos, demostrar indicios y plagio (al no citar la información con sus autores), plagio (al presentar información de otros trabajos como propios), falsificación (al presentar la información e ideas de otras personas de forma falsa), entre otros, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto.

Tarapoto, 18 de Octubre del 2018



JHANET YOVANA DÍAZ VELÁSQUEZ

DNI N° 42784033



Formato de autorización NO EXCLUSIVA para la publicación de trabajos de investigación, conducentes a optar grados académicos y títulos profesionales en el Repositorio Digital de Tesis

1. Datos del autor:

Apellidos y nombres: <i>DÍAZ VELÁSQUEZ JHANET YOVANA</i>	
Código de alumno : <i>011078</i>	Teléfono: <i>997742130</i>
Correo electrónico : <i>jhanetdiazv@gmail.com</i>	DNI: <i>72784033</i>

(En caso haya más autores, llenar un formulario por autor)

2. Datos Académicos

Facultad de: <i>CIENCIAS AGRARIAS</i>
Escuela Profesional de: <i>AGRONOMIA</i>

3. Tipo de trabajo de investigación

Tesis	(<input checked="" type="checkbox"/>)	Trabajo de investigación	(<input type="checkbox"/>)
Trabajo de suficiencia profesional	(<input type="checkbox"/>)		

4. Datos de trabajo de investigación

Título: <i>Diagnóstico y Control In vitro de enfermedades fungosas de Orquídeas (<i>Dendrobium</i> sp y <i>Phalaenopsis</i> sp) del vivero de la Universidad Nacional de San Martín - Tarapoto</i>
Año de publicación: <i>2018</i>

5. Tipo de Acceso al documento

Acceso público *	(<input checked="" type="checkbox"/>)	Embargo	(<input type="checkbox"/>)
Acceso restringido **	(<input type="checkbox"/>)		

Si el autor elige el tipo de acceso abierto o público, otorga a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, una licencia **No Exclusiva**, para publicar, conservar y sin modificar su contenido, pueda convertirla a cualquier formato de fichero, medio o soporte, siempre con fines de seguridad, preservación y difusión en el Repositorio de Tesis Digital. Respetando siempre los Derechos de Autor y Propiedad Intelectual de acuerdo y en el Marco de la Ley 822.

En caso que el autor elija la segunda opción, es necesario y obligatorio que indiquen el sustento correspondiente:

6. Originalidad del archivo digital

Por el presente dejo constancia que el archivo digital que entrego a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, como parte del proceso conducente a obtener el Título Profesional o Grado Académico, es la versión final del trabajo de investigación sustentado y aprobado por el jurado.

7. Otorgamiento de una licencia *CREATIVE COMMONS*

Para investigaciones que son de acceso abierto se les otorgó una licencia *Creative Commons*, con la finalidad de que cualquier usuario pueda acceder a la obra, bajo los términos que dicha licencia implica.

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/pe/>

El autor por medio de este documento, autoriza a la Universidad Nacional de San Martín – Tarapoto, publicar su trabajo de investigación en formato digital en el Repositorio Digital de Tesis, al cual se podrá acceder, preservar y difundir de forma libre y gratuita, de manera íntegra a todo el documento.

Según el Inciso 12.2, del Artículo 12° del Reglamento Nacional de Trabajos de Investigaciones para optar Grados Académicos y Títulos Profesionales –RENATI “**Las universidades, instituciones y escuelas de educación superior tienen como obligación registrar todos los trabajos de investigación y proyectos, incluyendo los metadatos en sus repositorios institucionales precisando si son de acceso abierto o restringido, los cuales serán posteriormente recolectados por el Repositorio Digital RENATI, a través del Repositorio ALICIA**”.



.....
Firma del Autor

8. Para ser llenado en la Oficina de Repositorio Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso Abierto de la UNSM-T.

Fecha de recepción del documento:

02 / 04 / 2019



.....
Firma del Responsable de Repositorio
Digital de Ciencia y Tecnología de Acceso
Abierto de la UNSM-T.

***Acceso abierto:** uso lícito que confiere un titular de derechos de propiedad intelectual a cualquier persona, para que pueda acceder de manera inmediata y gratuita a una obra, datos procesados o estadísticas de monitoreo, sin necesidad de registro, suscripción, ni pago, estando autorizada a leerla, descargarla, reproducirla, distribuirla, imprimirla, buscarla y enlazar textos completos (Reglamento de la Ley No 30035).

****Acceso restringido:** el documento no se visualizará en el Repositorio.

Dedicatoria

A Dios por darme la vida, a mi madre María Velásquez por su amor, esfuerzo, dedicación y ayuda incondicional en todo momento, a mi padre Javier Díaz por el apoyo brindado, gracias por inculcarme valores que influenciaron de manera positiva en mi vida y que son la base para cumplir mis metas.

A César Díaz por el amor, respeto, confianza brindada y por ser el complemento en mi proyecto de vida.

A mis hijos Stephanie y Christopher con todo mi amor por ser el motor y motivo de mi lucha constante en la vida.

Agradecimiento

Mi más sincero y profundo agradecimiento a Dios por darme la vida, a la Universidad Nacional de San Martín –T, a la Facultad de Ciencias Agrarias, a los Docentes por sus aportes durante mi formación profesional.

Al Ing. Eybis Flores García las gracias infinitas por su apoyo incondicional y desinteresado en mi época de estudiante y por el asesoramiento del presente trabajo de tesis que fue crucial para su culminación.

Al Dr. Raúl Urbina Ribbeck por las oportunidades, facilidades y el apoyo brindado en todo momento.

Al Ing. César Enrique Chappa Santa María por sus aportes brindados.

A la Ing. Silvia Mikaela León Martínez por su amistad y confianza que sin dudarlo me brindó su apoyo cuando más lo necesité.

Al Sr. Delman Panduro Reátegui por su importante ayuda durante la ejecución del presente trabajo.

Al Sr. Elí Navarro Torres, por su gran ayuda en la ejecución del presente trabajo.

A Marina Chuquizuta Picón y Porfirio Díaz Ruíz por su apoyo y consejos brindados.

Al jurado de tesis por sus valiosos aportes en el trabajo de investigación.

Expreso mi agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma me brindaron su apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

Índice general

	Página
Dedicatoria	vi
Agradecimiento	vii
Resumen	xiii
Abstract	xiv
Introducción	1
CAPÍTULO I: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
1.1. Aspectos históricos de las orquídeas	3
1.2. Distribución	3
1.3. Principales países productores de orquídeas	4
1.4. Clasificación taxonómica	4
1.5. Descripción botánica	4
1.6. Estado de conservación actual de las orquídeas	5
1.7. Importancia de las enfermedades	6
1.8. Enfermedades fungosas presentes en las orquídeas	6
1.9. Factores que interactúan para dar origen a las enfermedades	6
1.10. Prevención y control de hongos	7
1.11. Síntomas que producen los hongos en las plantas	7
1.12. Antracnosis	8
1.13. Síntomas	8
1.14. Características morfológicas más importantes para separar cinco especies de <i>Colletotrichum</i>	9
1.15. <i>Colletotrichum crassipes</i>	10
1.16. Diagnóstico de enfermedades	11
1.17. Tipos de fungicidas	11
1.18. Mecanismos de acción	11
1.19. Resultados de investigación	12
 CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	 18
2.1. Tipo y nivel de investigación	18
2.2. Diseño de investigación	18
2.3. Población y muestra	18

2.4.	Técnicas de procesamiento de datos	18
2.5.	Ubicación y condiciones del lugar experimental	20
2.6.	Conducción del experimento	21
2.7.	Indicadores evaluados	29
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN		31
3.1.	Síntomas	31
3.2.	Características morfológicas y biométrica del hongo aislado	32
3.3.	Incidencia y severidad de <i>Colletotrichum crassipes</i> en hojas y flores de <i>Phalaenopsis sp</i> y <i>Dendrobium sp</i> en el vivero	35
3.4.	Patogenicidad de <i>Colletotrichum crassipes</i> sobre hojas y flores de <i>Dendrobium sp</i> y <i>Phalaenopsis sp</i>	36
CONCLUSIONES		45
RECOMENDACIONES		46
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		47
ANEXOS		52

Índice de tablas

		Página
Tabla 1:	Enfermedades fungosas en orquídeas	6
Tabla 2:	Características morfológicas más importante de especies de <i>Colletotrichum</i> .	9
Tabla 3:	Análisis de Varianza para el experimento en la prueba de patogenicidad	19
Tabla 4:	Tratamientos en estudio en la prueba de patogenicidad	19
Tabla 5:	Análisis de Varianza para el experimento de eficiencia de fungicidas en el control <i>In vitro</i> .	19
Tabla 6:	Tratamientos estudiados en el experimento de eficiencia de fungicidas en el control <i>In vitro</i> .	20
Tabla 7:	Escala de valoración porcentual para la evaluación porcentual de severidad (AFA) de enfermedades en orquídeas.	22
Tabla 8:	Valoración en micras para un objetivo a seco.	26
Tabla 9:	Fungicidas en estudio.	28
Tabla 10:	Escala de valoración porcentual para la evaluación de severidad de enfermedades en orquídeas.	30
Tabla 11:	Características morfológicas y biométricas del hongo observado en estructuras desarrolladas en Papa Dextrosa Agar - PDA al 2% y en muestras directas de las plantas.	32
Tabla 12:	Severidad de la enfermedad en hojas y flores.	35
Tabla 13:	ANVA para el porcentaje de incidencia de la enfermedad en hojas después de la inoculación en la prueba de patogenicidad (Con herida y sin herida) (transformado por \sqrt{x}).	38
Tabla 14:	ANVA para determinar el crecimiento de la colonia de <i>Colletotrichum crassipes</i> en el control químico in vitro expresado en longitud (mm).	43

Índice de figuras

	Página
Figura 1: Diagrama de la flor en la familia Orchidaceae.	5
Figura 2: Laboratorio de Fitopatología – FCA-U.N.S.M-T.	21
Figura 3: Vivero – FCA-U.N.S.M –T.	21
Figura 4: Descripción de síntomas.	22
Figura 5: Esterilización del medio de cultivo PDA	23
Figura 6: Dispensado del medio de cultivo PDA	23
Figura 7: Cámara húmeda con muestras de flores y hojas	24
Figura 8: Obtención del patógeno	25
Figura 9: Identificación del patógeno.	25
Figura 10: (A): Inoculación de <i>Colletotrichum crassipes</i> en hojas y flores B): Incubación de plantas inoculadas (C): Protección de botones florales (D): Inoculación del hongo en flores (E): Flor de <i>Phalaenopsis</i> sp protegida con bolsa plástica.	27
Figura 11: Incubación el patógeno en placas petri con tratamiento fungicida	28
Figura 12: (A) Hoja de <i>Dendrobium</i> sp, (B) Hoja de <i>Phalaenopsis</i> sp, (C) Flor de <i>Phalaenopsis</i> sp (D), Flor de <i>Dendrobium</i> sp.	31
Figura 13: (A): Colonia (B): Acérvulo (C): Setas (D): Apresorio (E): Germinación de esporas (F): Hifas septadas (G) Peritecio: (H) hifas (I): Conidias unicelulares hialinas.	33
Figura 14: Incidencia de <i>Colletotrichum crassipes</i> en hojas y flores	35
Figura 15: (A): Inoculación con herida en hojas de <i>Phalaenopsis</i> sp (B): Inoculación con herida en hojas de <i>Dendrobium</i> sp (C): Inoculación sin herida en hojas de <i>Phalaenopsis</i> sp (D): Inoculación sin herida en hojas de <i>Dendrobium</i> sp (E): Evaluación de la incidencia de la enfermedad después de la inoculación (F) Inoculación en flores de <i>Phalaenopsis</i> sp (G) Inoculación en flores de <i>Phalaenopsis</i> sp.	37
Figura 16: Prueba de Duncan ($P < 0,05$) para los promedios de los tratamientos en la incidencia de <i>Colletotrichum crassipes</i> después de la inoculación en la prueba de patogenicidad en hojas en los niveles del FA: Géneros.	38

Figura 17:	Prueba de Duncan ($\alpha=0,05$) para promedios de tratamientos respecto al porcentaje de incidencia de <i>Colletotrichum crassipes</i> en hojas en los niveles del FB: Tipo de inoculación.	39
Figura 18:	Efectos principales de interacción de los niveles del FA: Género dentro de los niveles del factor FB: Tipos de inoculación	40
Figura 19:	Efectos principales de interacción de los niveles del FB: Tipo de inoculación dentro de los niveles FA: Géneros	40
Figura 20:	Incidencia de <i>Colletotrichum crassipes</i> en flores de <i>Dendrobium</i> sp y <i>Phalaenopsis</i> sp después de la inoculación en la prueba de patogenicidad.	42
Figura 21:	Prueba de Duncan ($P<0,05$) para promedios de tratamientos respecto a la longitud en mm del crecimiento de la colonia de <i>Colletotrichum crassipes</i>	43

Resumen

La familia orquidácea es la más diversa en especies en el mundo, actualmente se cultivan en viveros el cual implica cambio de condiciones naturales permitiendo una entrada favorable para las enfermedades. Los objetivos fueron identificar el hongo que ocasiona la enfermedad, determinar la efectividad de dos tipos de inoculación sin herida y con herida a través de la prueba de patogenicidad y evaluar el control *In vitro* de los fungicidas en orquídeas (*Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp) del vivero de la Universidad Nacional de San Martín -Tarapoto. Se realizaron muestreos de hojas y flores enfermas identificándose a *Colletotrichum crassipes* como patógeno causante de la antracnosis. En la prueba de patogenicidad se utilizó un Diseño Estadístico Completamente al Azar (DCA) con arreglo factorial 2X2, la prueba de Duncan para promedios de tratamientos en los niveles del Factor B: Tipo de inoculación nos muestra la existencia de diferencias altamente significativas, donde las hojas inoculadas con herida el porcentaje de incidencia fue mayor con 10,0% superando estadísticamente al de la inoculación sin herida con un promedio de 5,42%. Para la prueba del control *In vitro* de fungicidas se utilizó un Diseño Estadístico Completamente al Azar (DCA); la prueba de Duncan para promedios de tratamientos muestra que Azoxystrobin (T1), Azoxystrobin 25 % + tebuconazole 50% (T2), Mancozeb 50% + benomyl 50% (T5), Mancozeb 50% + metalaxil 50% (T6), Propineb (T7) obtuvieron mayor efecto inhibitorio controlando el crecimiento de colonia quienes obtuvieron 0,0mm de longitud.

Palabras clave: Enfermedad, fungicidas, hongo, inoculación.

Abstract

The orchid's family is the most diverse in species around the world, nowadays is cultivated in nurseries in which is implicit the change of natural conditions that allows the easily entrance of sickness. The objectives were to identify the fungi that produces the sickness, determine the effectivity of two types of inoculation with and without lesions through the pathogenicity test and evaluate the *In vitro* control of fungicide in (*Dendrobium sp* y *Phalaenopsis sp*) orchids from the San Martín -Tarapoto National University nursery. Sick flowers and leave's sampling were done, a *Colletotrichum crassipes* were identified as a pathogen that causes the anthracnosis in flowers and leaves. It was used a statistic block design in the pathogenic test, completely random (DCA), with factorial 2X2 arrangement, Duncan test to the treatments averages in the factor B levels: this type of inoculation shows the existence of important differences, where the hurt inoculated leaves had a bigger incidence average with 10%, overtaking statistically the one with the inoculation without lesion where it was gotten an average of 5.42%. For the fungicide *In vitro* control test, It was used a completely random statistic design (DCA); Duncan test, for treatments average, shows that Azoxystrobin (T1), Azoxystrobin 25 % + tebuconazol 50% (T2), Mancozeb 50% + benomyl 50% (T5), Mancozeb 50% + metalaxil 50%(T6), Propineb (T7) had a biggest inhibitory effect when controlling the growing of *Colletotrichum sp* colony which got 0,0mm length.

Key words: Sickness, fungicides, fungi, inoculation.



Introducción

La familia Orchidaceae es una de la más diversa en especies, se encuentran distribuidas por todo el mundo, sobre todo en las regiones tropicales donde han desarrollado su máxima diferenciación de forma y adaptaciones.

Cabe destacar que el Perú está considerado como un país con alta diversidad de orquídeas, aproximadamente unas 3 000 especies de un total de 30 000 existentes a nivel mundial, gracias a su condición de país de montaña con una rica diversidad en flora y fauna silvestre.

La posesión de una rica diversidad de orquídeas representa para el Perú un enorme potencial económico por desarrollar, con una explotación sostenible como la producción en viveros, dando lugar a una producción y exportación a los mercados nacionales e internacionales donde son muy apreciadas como flor cortada y como planta ornamental (Bennett, 1992).

El manejo de las plantas bajo invernadero y viveros implica un cambio o reemplazo de las condiciones naturales; tales como el sustrato, horas e intensidad de luz, temperatura, humedad, períodos de reposo, espaciamiento entre plantas, presencia de diferentes microorganismos endógenos y exógenos, y el traslado de orquídeas del estado natural o de otro ambiente asociado a un plan de manejo inadecuado puede aumentar el riesgo de problemas fitosanitarios; facilitándose la diseminación de los mismos en viveros, colecciones privadas o jardines botánicos (Rivera, 1998).

Las enfermedades de las plantas son ocasionadas por microorganismos infecciosos o bióticos como hongos, bacterias, nematodos, protozoarios, virus así mismo por factores no infecciosos o abióticos como deficiencias nutricionales, efecto de climas adversos y toxicidad por plaguicidas entre otros (Agrios, 2005).

Las Orquídeas del vivero de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín presentan manchas necróticas tanto en hojas y flores haciendo que

las plantas pierdan su estética y valor comercial; hasta el momento no se identificó al agente causal de la enfermedad y su respectivo control.

Los resultados obtenidos durante el trabajo de investigación permiten establecer las medidas de manejo agronómico apropiado del cultivo de orquídeas en el Vivero de la Universidad Nacional de San Martín –T.

El informe tuvo como objetivo general, realizar el diagnóstico y control *In vitro* de la enfermedad fungosa de orquídeas (*Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp) del vivero de la Universidad Nacional de San Martín-Tarapoto.

Y como objetivos específicos, determinar los síntomas de la enfermedad, caracterizar morfológica y biométricamente al patógeno, determinar la incidencia y severidad de la enfermedad en las plantas del vivero, determinar la incidencia de la enfermedad en hojas y flores durante la prueba de patogenicidad y evaluar el crecimiento de la colonia (mm) en el control químico *In vitro*.

CAPÍTULO I

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Aspectos históricos de las orquídeas

El interés por las vistosas orquídeas del nuevo mundo data desde 1768, cuando arribaron varias expediciones europeas para coleccionar y posteriormente remitir su valioso cargamento, tanto a jardines botánicos como a horticultores privados (Cavero, Collantes y Patroni, 2007).

Con aproximadamente 3 000 especies y 242 géneros identificados existentes en el Perú se convierte en el país de mayor diversidad de orquídeas, muchas de las cuales tienen importancia en el mercado internacional como plantas ornamentales. Esta riqueza podría aprovecharse de manera sostenible, tornándose en una necesaria y significativa fuente de ingresos económicos para el país.

Actualmente en el Perú la familia Orchidaceae se encuentra muy amenazada y con muchas especies en peligro de extinción debido fundamentalmente a dos factores:

La depredación selectiva de especies, realizada por colectores comerciales y la destrucción masiva de hábitats debido a la extracción maderera y a la agricultura migratoria que deforestan unas 300 000 hectáreas por año exterminando no solamente orquídeas si no también flora y fauna silvestre originarias del lugar (León, 1995).

1.2 Distribución

La familia Orchidaceae se considera cosmopolita, ya que tiene representantes por todo el mundo, a excepción de regiones polares y desiertos extremos (Isacáz 2000); sin embargo, son más abundantes y diversificadas en los bosques tropicales y subtropicales también existen especies en ambientes templados, desde el nivel del

mar hasta grandes altitudes a aproximadamente 20 grados de latitud norte y sur del ecuador, (Tobar 2005).

1.3 Principales países productores de orquídeas

Dentro de los principales países productores de Orquídeas se encuentran: Alemania, Colombia, Costa Rica, Ecuador, China, Estados Unidos, Filipinas, Indonesia, Brasil.

1.4 Clasificación taxonómica

Las orquídeas se clasifican: www.species2000.org, (2016).

Reino	: Plantae
Phylum	: Tracheophyta
Clase	: Liliopsida
Orden	: Asparagales
Familia	: Orchidaceae

1.5 Descripción botánica

Las orquídeas pertenecen a la familia Orchidaceae, contiene entre 17 000 y 30 000 especies distribuidas por todo el mundo. Además, se considera que es la familia de plantas con flores con más especies sobre el planeta tierra, seguida por las asteráceas la familia del girasol y las margaritas (Giraldo y Betancur J, 2011).

Las orquídeas vegetativamente son muy diferentes en forma, tamaño y estructura de la planta; sin embargo las podemos distinguir principalmente por sus características florales, entre las que destacan: Estambres ubicados en un solo lado de la flor y se agrupan en posición opuesta al pétalo medial, estructuras reproductivas (estambre y estigma) se encuentran parcial o completamente fusionadas en la mayoría de las especies, formando en este caso una estructura llamada ginostemo, posee tres sépalos y tres pétalos uno de los cuales se ha modificado y se encuentra opuesto al estambre fértil el cual es diferente a los otros

dos se denomina labelo, sirve como punto de atracción y plataforma de aterrizaje para algunos polinizadores, los granos de polen se agrupan en masas compactas llamadas polinios (as), situadas en la parte terminal de la columna, las flores de muchas especies giran 180° antes de abrirse, para exponer el labelo a los polinizadores; este evento se conoce como resupinación, el fruto es una cápsula que contiene grandes cantidades de semillas muy pequeñas llegando en algunos casos hasta tres millones de semillas por fruto. Algunas flores permanecen abiertas solo un día, mientras otras se mantienen frescas durante unos tres meses (Tobar, 2005).

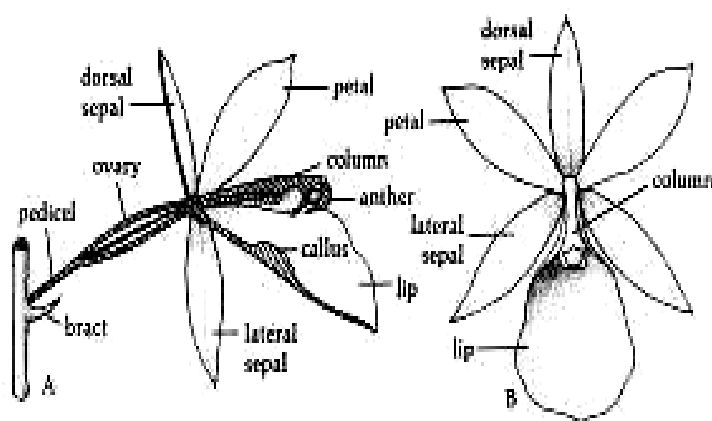


Figura 1. Diagrama de la flor en la familia ORCHIDACEAE
Vista lateral; B: Vista frontal. Fuente: Dressler, 1973.

1.6 Estado de conservación actual de las Orquídeas

El estado de conservación actual de las orquídeas no está definido, las plantas están sujetas a la extracción indiscriminada. Se ven afectadas por la pérdida de hábitat, explotación forestal, incendios y la venta ilícita en mercados negros. La mayoría de las orquídeas en su hábitat natural, están consideradas por el CITES como amenazadas y en peligro, por ello tienen en diferentes países del mundo rangos de protección, debido a esto debe de conocerse que existen medidas internacionales que protegen la comercialización de orquídeas silvestres y del bosque impidiendo su venta. La reglamentación solo permite la venta de aquellas plantas reproducidas bajo manejo ex vitro y normas en laboratorios por técnicas de cultivo de tejidos (Tobar 2005).

1.7 Importancias de las enfermedades

Las enfermedades de importancia económica producen pérdidas en los cultivos en una o varias formas; reducción en el rendimiento de las plantas, calidad del producto cosechado, contaminación del suelo, incrementos en el costo de producción, costos de manejo y predisposición a otras enfermedades (Agrios, 2005).

1.8 Enfermedades fungosas presentes en las orquídeas

Tabla 1

Enfermedades fungosas en orquídeas

Enfermedad	Parte afectada	Agente causal	Autor
Fusariosis	Raíz y tallo	<i>Fusarium oxysporum</i>	
Podredumbre gris	Raíz y rizoma	<i>Rhizoctonia solani</i>	
Podredumbre del tallo y raíz	Raíz y rizoma	<i>Phytophthora</i> sp.	
Antracnosis	Hojas y flores	<i>Colletotrichum</i> sp	(Rivera 2005)
Cercosporiosis	Hojas	<i>Cercospora</i> sp.	
Pudrición negra	Rizomas	<i>Pythium</i> sp.	
-----	---	<i>Puccinia</i> sp.	
Antracnosis	Hojas y raíces	<i>Colletotrichum crassipes</i>	(Bayman et al., 1997)

1.9. Factores que interactúan para dar origen a las enfermedades

Las enfermedades son el resultado de la interacción del patógeno (agente causante de la enfermedad), hospedante (planta) y el ambiente, el clásico “triángulo de la enfermedad”. El triángulo de la enfermedad incluye los cambios y síntomas que sufre una planta, así como los que se produzca en el patógeno y los periodos comprendidos en una estación de crecimiento, asimismo estos tres factores deben incurrir simultáneamente si uno o más no está presente o no es favorable la enfermedad no ocurrirá (Agrios, 2005).

1.10 Prevención y control de hongos

El control de las enfermedades es evitar que se propague principalmente por salpicaduras, la superficie de las mesas estén lo suficientemente altos de la superficie del suelo para evitar salpicaduras del suelo por el agua, aislar las plantas infectadas, quemar el material enfermo, lavarse las manos después de manipular material sospechoso, desinfectar herramientas (Light, 2004).

Guardar las macetas nuevas en áreas desinfectadas, lo mejor es utilizar macetas nuevas, si esto no es posible, sumergir las macetas en una proporción de 1:3 de hipoclorito de sodio manteniendo el agua con agitación durante un mínimo de 10 minutos (Cating et al., 2009).

Desinfecte todas las superficies de las mesas y las herramientas antes de cada uso para detener la diseminación del patógeno, con una tijera o cuchillo estéril cortar la parte enferma de la planta. Retire todo el material vegetal infectado, sacando una pequeña cantidad de tejido sano que bordea la zona afectada como medida de seguridad (Jones, 2002).

1.11 Síntomas que producen los hongos en las plantas

Los síntomas que producen los hongos en sus hospedantes son de tipo local o general, producen necrosis local o general a los tejidos vegetales; los síntomas más comunes son los siguientes:

- ***Manchas foliares:*** Lesiones en las hojas de los hospedantes que constan de células muertas y colapsadas.
- ***Muerte descendente:*** Necrosis generalizada de las ramitas de las plantas que se inicia en sus puntas y avanza hacia su base.
- ***Pudrición de la raíz:*** Pudrición o desintegración de todo el sistema radical de una planta o parte de él.
- ***Pudrición basal del tallo:*** Desintegración de la parte inferior del tallo.
- ***Pudriciones blandas y pudriciones secas:*** Maceración y desintegración de frutos, raíces, bulbos, tubérculos y hojas carnosas de la planta.

- **Antracnosis:** Lesión necrótica que se produce en el tallo, hojas, frutos y flores de las plantas hospedantes (Agrios, 2005).

1.12 Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad generada por *Colletotrichum* sp el cual es un género importante de hongos que está formado por 39 especies que causan antracnosis o tizones en una amplia gama de cultivos (Sutton, 1992), está distribuido en todo el mundo, pero es más frecuente en climas tropicales y subtropicales y su desarrollo se ve favorecido por la alta humedad, días nublados periódicos y temperaturas entre 10 y 30 °C. Su difusión se produce básicamente con la ayuda de agua, las lesiones ocasionadas por daños mecánicos o por el frío, temperatura, humedad, etc., son lugares donde se producen las infecciones, el exceso de nitrógeno también favorece el ataque del patógeno (Studt, 2008).

Las especies de *Colletotrichum* se han identificado y delimitado por sus características morfológicas, las más utilizadas por los taxónomos son el tamaño, forma de conidios, apresorios, la presencia o ausencia de setas, esclerocios, acérvulos y los métodos tradicionales para identificar especies de *Colletotrichum* se han basado principalmente en diferencias morfológicas tales como el color de la colonia, tamaño, forma de los conidios, presencia o ausencia de setas. (Agostini, 1992).

1.13 Síntomas

El patógeno ataca frecuentemente más de una parte de la planta, ocasionando enfermedades separadas que pueden interactuar durante el ciclo de vida del cultivo; estas se pueden agrupar de acuerdo al tejido que es infectado: brotes, hojas, flores, frutos, sin embargo, por lo general los síntomas son más frecuentes en los tejidos aéreos de las plantas, (Waller, 1992).

En flores de orquídeas de los géneros: *Dendrobium* sp, *Cattleya* sp, *Cymbidium* sp, *Oncidium* sp *Vanda* sp, y *Phalaenopsis* sp se presenta como

manchas circulares pequeñas de color marrón en los pétalos y necrosis en los botones (Salazar, 2009). En pétalos y sépalos de *Cattleya*, *Dendrobium* y *Phalaenopsis* sp se identificaron un complejo de hongos de los géneros: *Alternaria* spp, *Fusarium* spp, *Botrytis* sp y *Colletotrichum* spp y en las hojas aislaron *Curvularia* spp, *Colletotrichum* spp, en pétalos de *Vanda*, aislaron *Gloeosporium* y *Cercospora* spp (Estévez & Mercado 2005).

La necrosis en hojas generalmente comienza como áreas de color gris oscuro, sin margen marcado bordeados de una zona clorótica. Este síntoma se observa tanto en el haz como en el envés de las hojas. Cuando las lesiones envejecen, el centro de las lesiones se torna grisáceo y seco sobre las hojas carnosas, y fructificaciones negruzcos, subepidérmicas, de apariencia globosa y se forman en la zona necrosada (Cabrera, Galmarini, & Flachslan, 2003).

1.14 Características morfológicas más importante para separar cinco especies de *Colletotrichum*.

Tabla 2

Características morfológicas más importantes de especies de Colletotrichum.

Especies	Esclerocio	Apresorio	Conidia	Longitud
<i>Colletotrichum coccodes</i>	Presente (Globosa)	Margen entero	Fusiforme, disminuye abruptamente a cada extremo	16-22 a 3-4 um
<i>Colletotrichum crassipes</i>	Ausente	Margen cremado o profundamente lobulada	Cilíndrica, ápice obtuso; base truncada	11-20 a 6-8 um
<i>Colletotrichum dematium</i>	Presente (cónico)	Margen entero o ligeramente irregular lobulada	Falcada, fusiforme, disminuye a cada extremo	19-25 a 2.5-3.5 um
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Ausente	Margen entero algunas veces lobulado	Cilíndrica, ápice obtuso; base truncada	6-25 a 4-6 um
<i>Colletotrichum graminicola</i>	Presente (irregular)	Margen muy irregular	Falcada, fusiforme, disminuye en el vértice y la base	24-28 a 4-6 um

Fuente: J. Clin. 2004. American Society for Microbiology.

1.15 *Colletotrichum crassipes*

Afecta a un gran número de especies de orquidáceas y plantas ornamentales, así como a cultivos de vid, tomate, melocotonero, caña de azúcar, mango, entre otros (ARX, 1 970).

Sintomatología

Las hojas empiezan o tornarse amarillas y secarse preferentemente por las puntas de las hojas exteriores y más viejas presentando pequeños puntos negros sobre la superficie foliar formando manchas circulares las cuales terminan por extenderse a la mayor parte de la hoja (ARX, 1 970).

Análisis de muestra

Un análisis más minucioso de las hojas muestra unos pequeños puntos negros, casi siempre rodeados de una especie de pelos cortos, de los que sale una masa con aspecto meloso. Estas formaciones se observan perfectamente con una lupa de 20-60 aumentos. Los pequeños puntos negros son las formaciones típicas en acérvulos en las que fructifican hongos del género *Colletotrichum* en su fase asexual; la masa melosa que sale de estas fructificaciones está constituida por una masa de pequeños conidios microscópicos alargados y con setas duras que sobresalen de los acérvulos (ARX, 1 970).

Identificación

Las conidias son unicelulares, elipsoidales a cilíndricas con los extremos redondeados con una zona más oscura en el centro y más brillante en ambos extremos. Observadas directamente de las plantas tienen una medida aproximada de 20-25x 5 μm .

Las conidias obtenidas en medio de cultivo PDA son más cortas, con unas medidas aproximadas de 15 x 5 μm descritas por (Sutton, 1992).

1.16 Diagnóstico de enfermedades

El diagnóstico de las plantas enfermas se realiza por observaciones, estudio o experimentación, buscando la naturaleza de la causa de un problema y los factores que inciden en su desarrollo (Fernández, 2004); para diagnosticar la enfermedad es conveniente determinar primero si la enfermedad es ocasionada por un patógeno o por algún factor ambiental (Agrios, 2005), un diagnóstico oportuno detecta el agente causal de un evento patológico y es fundamental para el manejo adecuado (Cabezas, 2004).

1.17 Tipos de fungicidas

a) Fungicida de contacto o protectores

Los fungicidas de protección no penetran el tejido foliar. Es esencial que los fungicidas protectantes estén sobre las hojas, antes de realizar el riego, este fungicida no es fácilmente lavado después de terminado de secar (Adrianzen, 1996).

El modo de acción de estos productos es generalmente de multisitio, es decir que actúa en diferentes procesos metabólicos vitales para la vida del hongo, por lo que la probabilidad de obtener resistencia del hongo a estos fungicidas es bastante baja. Por lo general este tipo de fungicidas afectan el metabolismo de las proteínas, bloquean la oxidación de ácidos grasos, afectan la producción de energía (ATP) y bloquean la enzima deshidrogenasa (Yaringaño, 1995).

b) Fungicidas sistémicos

Los ingredientes activos penetran en la planta translocándose desde el sistema radicular hasta las hojas, proporcionando una protección a la planta (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO, 2000).

Estos productos son específicos, tienen propiedades terapéuticas y efecto prolongado ya que penetran en las hojas y pueden movilizarse a otros tejidos dentro de la misma hoja o hacia otras partes de la planta. (Apablaza, 2000).

1.18 Mecanismos de acción

Tabares, (2002), la acción fungicida es usualmente expresada en uno de los efectos físicamente visible: la inhibición de la germinación de esporas o la inhibición de crecimiento micelial. Muchos fungicidas previenen la germinación de esporas o matan la espora inmediatamente iniciado el proceso de germinación. Algunos de estos inhibidores químicos o fungicidas también retardan o detienen el crecimiento del hongo cuando se aplican después de que se ha desarrollado el estado de infección.

Todos los fungicidas son inhibidores metabólicos; es decir estos bloquean algunos procesos vitales de la célula. Por consideración se han clasificado los diferentes mecanismos de acción dentro de tres amplios grupos: Interferencia con la división celular, inhibición de enzimas involucradas en el metabolismo celular, interferencia con la función y síntesis de la pared celular de los hongos (antracnosis).

1.19 Resultados de Investigación.

Cabrera et al., (2003), evaluaron a los agentes causales de las enfermedades de *Dendrobium* sp, *Phalenopsis* sp, *Epidendrum* sp, *Laelia purpurata*, *Miltonia flavescens*, *Miltonia* sp, *Oncidium bifolium*, *Oncidium lanceanum*, *O. postodontoglossum*, *O. ornitorrynchum*, *Paphiopedilum spicerianum*, *Phaius thankevillae*, *Trigonidium* sp y *Vanilla* sp del Nor Este de Argentina.

Debido al daño observado en ejemplares valiosos se inició este trabajo con el objeto de identificar al agente causal de las manchas foliares de diversas especies de orquídeas. Las observaciones preliminares de los materiales enfermos revelaron la presencia de un hongo con características de *Colletotrichum* sp.

Para la ejecución de este trabajo se emplearon métodos y técnicas comunes en el estudio de enfermedades de plantas causadas por microorganismos parásitos patógenos, para precisar los síntomas y signos asociados con la enfermedad en estudio se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas de muestras frescas con infección natural; en todos los casos se prepararon cámaras húmedas y se realizaron cortes histológicos de los tejidos enfermos. Se llevaron a cabo siembras en placas Petri sobre un medio agarizado al 1,5 %. Los tejidos con síntomas de la enfermedad se examinaron microscópicamente suspendiendo los cortes histológicos y material de raspados con aguja histológica en agua destilada. Se llevaron a cabo pruebas de patogenicidad, la metodología empleada para las inoculaciones consistió en aplicar sobre hojas sanas de las orquídeas discos de agar con cultivos del hongo de 7 días de desarrollo, cubriéndolos con apósitos de algodón embebidos en agua. Se hicieron dos tipos de tratamientos: en un caso se practicaron ligeras heridas sobre las hojas y en otro caso no. Las plantas se embolsaron por 72 horas y se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente durante todo el experimento. Se realizaron los estudios microscópicos para determinar las características morfo métricas del microorganismo. En la determinación etiológica se empleó la bibliografía disponible, consultando especialmente los trabajos de von Arx (1970) y Sutton (1992).

Los exámenes morfométricos de los aislamientos se compararon con lo mencionado por Sutton 1992, coincidiendo de igual modo con el mismo hongo. Las pruebas positivas demostraron la patogenicidad de los aislamientos de *Colletotrichum* para el agente de "antracnosis" en orquídeas.

Debido a las exigencias de temperatura y luz de las especies de Orchidaecae, y al tipo delicado de manejo necesarios para su cultivo, es frecuente observar patologías que devienen por manejo inadecuado o de lesiones fortuitas causadas por insolación, picaduras de insectos, o rozamientos y laceraciones diversas. Muchas veces las infecciones por *Colletotrichum* spp son consecuencia de ello ya que el hongo utiliza estas heridas como puertas de entrada a los tejidos del hospedante. También las plantas debilitadas son el asentamiento predilecto de hongos parásitos facultativos como los del género *Colletotrichum*.

Sintomatología. Los síntomas de la enfermedad se manifestaron como manchas oscuras, variando solo en el tamaño y tonalidad de las lesiones, según el género y lugar donde se localiza la misma. Estas lesiones necróticas fueron observadas en distintos órganos de las plantas de orquídeas. Las hojas carnosas presentaron daños en la base, con lesiones que ascendían por los márgenes llegando a cubrir toda la superficie. La lesión necrótica fue siempre de color pardo a gris oscuro, uniforme, sin margen marcado y bordeada por zona clorótica. Este daño se observa tanto en haz de las hojas como en el envés, en cortes todo el tejido se encontraba necrosado y surcado de hifas del patógeno. Los conidios del primer tipo en sustrato natural, tenían dimensiones que oscilaban entre 16-24 μm x 4-6 μm . El tamaño de los apresorios fue de 8,25 μm (12,7), 13,50 μm x 8 (7,5)11 μm . Los conidios del segundo tipo fueron algo menores en tamaño, y las dimensiones de sus apresorios también (8-10 μm x 6-8,5 μm). Por tanto, atendiendo a las descripciones de von Arx para *Colletotrichum sp*, sobre forma y tamaño de conidios en medios artificiales, las cepas aisladas del hongo estudiado corresponderían al mismo patógeno.

El resultado del estudio realizado se concluye que el agente etiológico de la enfermedad observada con mayor frecuencia afectando a las orquídeas, en esta región es *Colletotrichum sp*.

Herrera et al., (2015), realizaron aislamiento y pruebas de patogenicidad de hongos asociados con hojas de orquídeas de los géneros *Cattleya* en Colombia. El objetivo de este trabajo fue determinar los agentes causales de tres diferentes enfermedades foliares observadas en orquídeas de los géneros *Cattleya sp*, *Odontoglossum* y *Miltonia* muestreadas en viveros en el municipio de Fusagasugá, Cundinamarca. Las muestras se llevaron al laboratorio y se realizaron aislamientos en medio PDA; se hizo la descripción macro y microscópica de las colonias encontradas y los postulados de Koch. Con cada colonia se hicieron inoculaciones por aspersión en 3 hojas sanas, cortadas de diferentes plantas al azar del mismo género de la cual fueron aislados los hongos en síntomas iniciales y se realizaron lecturas a los 10, 19 y 24 días después de la inoculación. En las plantas donde se reprodujo el síntoma inicial se realizaron reaislamientos.

Los resultados obtenidos indican que el síntoma encontrado en hojas de *Odontoglossum* sp y de *Miltonia* sp fueron inducidos por *Alternaria* sp, mientras que el síntoma encontrado en *Cattleya* es causado por *Colletotrichum* sp.

Salazar et al., (2007) recolectaron orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo que presentaron problemas fitosanitarios de las dos zonas de estudio. Las muestras recolectadas fueron empacadas, etiquetadas y llevadas al laboratorio para el análisis respectivo.

Se recolectaron plantas completas o secciones de las mismas, según el grado de la enfermedad. En el Laboratorio de Fitopatología de la Escuela de Ciencias Agrarias (ECA) de la UNA se realizó el proceso de diagnóstico e identificación, usando los procedimientos tradicionales según las técnicas correspondientes al tipo de patógeno., solo se describieron los síntomas correspondientes

El agente causal de la enfermedad fue *Colletotrichum crassipes*, esta es la enfermedad más común en las orquídeas cultivadas en los trópicos. Se encontró atacando hojas, flores, pseudobulbos y brotes jóvenes. En las hojas produjo manchas ovaladas, circulares o de forma irregular, color marrón oscuro, negras o grisáceas. En hojas carnosas se observaron hundidas y con un borde bien definido. Las hojas delgadas muestran lesiones de color y forma similar con un hundimiento leve o ausente. En estados avanzados se observaron acérvulos.

Merchán (2013), evaluó hongos y pseudohongos patógenos en el orquideario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca. El objetivo de este trabajo es diagnosticar el estado sanitario del orquideario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca.

Se evaluó la incidencia y severidad e identificó los hongos patógenos de 1650 plantas presentaron sintomatología el 10,73%, en los géneros: *Anguloa*, *Brassia*, *Cattleya*, *Cochlioda*, *Cyrtochilum*, *Dracula*, *Epidendrum*, *Gongora*, *Lepanthes*, *Masdevallia*, *Maxillaria*, *Dendrobium* *Mormodes*, *Odontoglossum*, *Oncidium*, *Phragmipedium*, *Pleurothallis*, *Prosthechea*, *Restrepia*, *Stanhopea*, *Stelis*, *Symphoglossum*, *Phalaenopsis* *Trigonidium* y *Xilovium*; la severidad fue inferior al

2% del área afectada. Las muestras fueron sometidas a cámara húmeda y cultivo en PDA, determinándose los patógenos *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp, *Cladosporium* sp, *Phoma* sp, *Cercospora* sp, *Rhizoctonia* sp, *Phyllosticta* sp, *Alternaria* sp, *Botrytis* sp y *Phytophthora* sp.

En 20 especies, se encontró con una severidad de 2 de acuerdo al valor escalar que corresponde a porcentajes comprendidos entre el 2 y el 7,9%, con afecciones en las hojas Con un valor escalar de 1 que corresponde a un porcentaje entre el 0,1 al 1,9% considerada como de baja severidad se encuentran 79 especies de orquídeas

En las flores de orquídeas de los géneros: *Dendrobium* sp, *Cattleya* sp, *Cymbidium* sp, *Oncidium* sp y *Vanda* sp, presentaron manchas circulares pequeñas, de color marrón en los pétalos y necrosis en los botones, con síntomas similares, Salazar (2009), el tamaño y tonalidad de las manchas varían según el género y el lugar donde se localizan en la flor. En pétalos y sépalos de *Cattleya* identificaron un complejo de hongos de los géneros: *Colletotrichum* spp, *Alternaria* spp, *Fusarium* spp. En pétalos de *Cattleya* identificaron a *Bipolaris* spp, y en las hojas aislaron *Curvularia* spp, en pétalos de *Vanda*, aislaron *Gloeosporium* y en hojas de *Dendrobium*, *Cercospora* spp. Estévez & Mercado (2005).

Gamboa M, (2006), el muestreo tradicional de hongos endófitos se basa en el uso de medios artificiales de agar con diferentes nutrientes y antibióticos. Existen numerosos protocolos para elaborar tales medios que permiten el crecimiento selectivo de hongos endófitos. En general, el procedimiento consiste en esterilizar superficialmente el material vegetal que se desea examinar y ponerlo en cajas de Petri con el medio escogido. Esta preparación se mantiene en condiciones controladas hasta que el hongo colonice el medio. Uno de los hongos identificados fue *Colletotrichum crassipes* en *Orchideas* sp.

Guillén et al (2017), evaluó la sensibilidad in vitro de *Colletotrichum acutatum* donde se evaluaron los fungicidas benomilo y azoxystrobin a dosis alta, media y baja.

El fungicida que logró controlar en 100 % la colonia de *Colletotrichum acutatum* fue benomilo seguido en orden decreciente por azoxystrobin lograron más del 50 % de inhibición.

El fungicida con mayor porcentaje de inhibición fue: benomilo especialmente interesante el resultado porque se ha informado con bajos niveles de control sobre *Colletotrichum acutatum*, a diferencia de la alta sensibilidad de *C. gloeosporioides* (Peres et al., 2004)

Rodríguez (2018), realizó un trabajo de pre grado sobre la caracterización morfológica, molecular y de resistencia a fungicidas de *Colletotrichum* sp., aislado de tomate de árbol en Quito - Ecuador.

Se observó el bajo efecto inhibitorio del fungicida de ingrediente activo carbendazim 2,5 mg/l y 5,0 mg/l para los aislamientos de *Colletotrichum* sp y 2,5 mg/ml y 5,0 mg/ml para *Colletotrichum tamarilloi*, resultado que concuerdan con estudios realizados para aislamientos de *Colletotrichum acutatum*; sin embargo, estos resultados también indican que para un control de la antracnosis con este fungicida se requeriría mayores concentraciones del ingrediente activo, las cuales han sido probadas en otros estudios y no han dado resultados que indique una eficiencia de este fungicida en el combate de *Colletotrichum acutatum* presenta un bajo efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de los aislamientos de *Colletotrichum* sp y *Colletotrichum tamarilloi* a dosis de 2,5 y 5,0 mg/l.

Rondón et al (2006), respuesta *In vitro* a la acción de fungicidas para el control de antracnosis, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, en frutos de mango, Estación Experimental Miranda Venezuela.

El mejor control sobre la inhibición de crecimiento y esporulación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., se logró con Procloraz.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Tipo y nivel de investigación:

El método de investigación aplicado fue el nivel experimental.

2.2 Diseño de investigación

En la prueba de patogenicidad se aplicó el diseño experimental completamente al azar (DCA) con arreglo factorial y para la prueba de control *In vitro* de fungicidas se aplicó un diseño experimental completamente al azar DCA.

2.3 Población y muestra

Población

En la prueba de patogenicidad la población estuvo definida por 4 tratamientos, 3 repeticiones, 12 unidades experimentales y 6 medidas repetidas por cada unidad experimental haciendo un total de 72 medidas en todo el experimento.

En la prueba de control *In vitro* del crecimiento de colonia estuvo definida por 8 tratamientos y 5 repeticiones que hacen un total de 40 observaciones.

Muestra

La muestra en la prueba de patogenicidad estaba constituida por 1 planta con 6 inoculaciones. La muestra en el control *In vitro* con fungicidas consistió de una 1 placa Petri conteniendo el hongo aislado.

2.4 Técnica de procesamiento de datos

La información generada fue procesada utilizando el Software estadístico SAS para el análisis de varianza (ANVA) y prueba de Duncan a una probabilidad

de $\alpha=0,05$. En las tablas 3 y 4 se muestran el análisis de varianza y los tratamientos en estudio de la prueba de patogenicidad.

Tabla 3

Análisis de Varianza para el experimento en la prueba de patogenicidad.

Fuente de variabilidad	Fórmula	Grado de libertad
Factor A	$p-1=$	1
Factor B	$q-1=$	1
AB	$(p-1)(q-1)=$	1
Error	$(r-1)(pq)=$	8
Total	$pqr-1=$	11

Tabla 4

Tratamientos en estudio en la prueba de patogenicidad.

Tto	Combinaciones	Descripción
1	A1B1	<i>Dendrobium</i> sp-sin herida
2	A1B2	<i>Dendrobium</i> sp-con herida
3	A2B1	<i>Phalaenopsis</i> -sin herida
4	A2B2	<i>Phalaenopsis</i> sp-con herida

Fuente: Elaboración propia, (2018).

En las tablas 5 y 6 se muestran el análisis de varianza y los tratamientos en estudio.

Tabla 5

Análisis de Varianza para el experimento de eficiencia de fungicidas en el control In vitro.

Fuente de variabilidad	Fórmula	Grado de libertad
Tratamiento	$t-1=$	7
Error	$n-t=$	32
Total	$n-1=$	39

Tabla 6

Tratamientos estudiados en el experimento de eficiencia de fungicidas en el control In vitro.

TTO	Fungicida		Dosis g/l	Tipo
	Ingrediente activo	Nombre comercial		
T1	Azoxystrobin	Quadris SC	0.5	S
T2	Azoxystrobin 25 % + tebuconazole 50%	Epico 750 WG	1	CO
T3	Benomyl	Benlate 70 % PM	1	S
T4	Carbendazim	Protexin 500 SC	1.5	S
T5	Mancozeb + benomyl	Metamas PM	2.5	CO
T6	Mancozeb + Metalaxil	Hieloxil mix PM	2	CO
T7	Propineb	Antracol 70 % PM	1.5	CO
T8	Testigo	-	-	

Fuente: Elaboración propia, (2018).

2.5 Ubicación y condiciones del lugar experimental

2.5.1 Historial del vivero

El vivero cuenta con seis géneros de orquídeas tales como *Cattleya* sp, *Dendrobium* sp, *Phalaenopsis* sp, *Cattasetum* sp, *Tricosentrum* sp, *Rodriguesia* sp; en su gran mayoría proveniente de la producción *In vitro* y de otras fuentes, también encontramos heliconias, plantas carnívoras, plantones forestales y de jardinería. La investigación se realizó en las especies de orquídeas que obtuvieron mayor porcentaje de incidencia y severidad de la enfermedad (*Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp).

El trabajo de investigación se realizó en dos sitios:

Las actividades de aislamiento del hongo, caracterización biométrica, morfológica, identificación del patógeno y la prueba de control *In vitro* con fungicidas se realizaron en el Laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín cuya ubicación

política se encuentra en el distrito de Morales, provincia y departamento de San Martín, la ubicación geográfica está en Latitud sur $06^{\circ}29'40''$, Longitud Oeste $76^{\circ}27'55''$ y Altitud 295 m.s.n.m. y una zona de vida: bosque seco tropical.

La prueba de patogenicidad en las plantas inoculadas se llevó a cabo en las instalaciones del vivero de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de San Martín.



Figura 2: Laboratorio de Fitopatología – FCA-U.N.S.M-T

2.6 Conducción del experimento

2.6.1 En vivero

a. Descripción de síntomas

Se hizo un reconocimiento al sitio y a través de la observación directa se monitorearon todas las plantas de orquídeas, se describieron los síntomas de la enfermedad presentes tales como: clorosis y manchas necróticas tanto en hojas como en flores y su distribución en la planta.



Figura 3: Vivero – FCA-U.N.S.M-T

b. Determinación de la incidencia

Para este estudio no fue necesario aplicar un diseño estadístico y se utilizó la estadística descriptiva en base a valores porcentuales.

Para la evaluación en hojas se dispuso el 10% del total de plantas por cada género, resultando 100 plantas para *Dendrobium* sp y 400 plantas de *Phalaenopsis* sp; para la evaluación en flores se consideró el total de flores presentes obteniendo 9 para *Dendrobium* sp y 18 para *Phalaenopsis* sp.



Figura 4: Descripción de síntomas

Para determinar la incidencia de la enfermedad en porcentaje (IE) se utilizó la fórmula recomendada por Wolcan et al. (2001).

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de plantas enfermas}}{\text{Total de plantas (Sanas + enfermas)}} \times 100$$

c. Determinación de la severidad

Para evaluar el grado de severidad de la enfermedad causante de las manchas foliares se tomaron 50 muestras al azar por cada género, teniendo en cuenta de manera visual para la valoración del área afectada en la escala cualitativa para orquídeas propuesta por Merchán (2013).

Tabla 7

Escala de valoración para la evaluación de severidad (AFA) de enfermedades en orquídeas.

Valor escalar	Porcentaje
1	0,1-1,9
2	2-7,9
3	8-17,9
4	18-41,9
5	42-78

Fuente: Merchan, (2013).

d. Toma de muestras en vivo

Se colectaron muestras de hojas y flores que presentaron síntomas patogénicos visibles de la enfermedad, colectándose en total 10 muestras por cada género.

Se cortaron con una tijera previamente desinfectada, colocándose dentro de un sobre de papel con la información correspondiente a fecha y género con el fin de evitar confusión, contaminación y deterioro de las mismas por manipulación, finalmente fueron llevadas al laboratorio para su debido procesamiento.

2.6.2 En laboratorio

a. Preparación del medio de cultivo para el cultivo del hongo

Para el desarrollo del hongo se empleó como medio de cultivo Papa, Dextrosa y Agar (PDA) con la siguiente formulación:

Papa pelada y cortada 200 g.

Dextrosa 20 g

Agar agar 20 g

Agua destilada 1 000 ml

Procedimiento

Se pelaron, picaron y lavaron las papas, luego se pesaron 200 g y se colocaron en un vaso de precipitado de 1 000 ml aforando con agua hasta 450 ml para su respectiva cocción durante 15 minutos, filtramos el caldo de papa en un tamiz y se agregó 20 g de sucrosa, 20 g de agar agar y agua para completar los 1 000 ml obteniendo una solución al 2 %; se distribuyeron en botellas y fueron colocadas en una autoclave para esterilizar con calor húmedo a 121°C, 15 lb/cm³ de presión equivalente a 1 atm durante 20 minutos.



Figura 5: Esterilización del medio de cultivo PDA

b. Distribución del medio de cultivo

Se disolvió el medio de cultivo en el horno microondas durante 7 minutos, se dejó enfriar hasta 50 °C y se añadió el



Figura 6: Dispensado del medio de cultivo PDA

antibiótico (cloranfenicol) a una equivalencia de 50 ppm por 100 ml de medio de cultivo, en placas petri esterilizadas, se distribuyeron aproximadamente 20 ml de medio de cultivo por cada placa Petri.

c. Desinfestación de muestras

Todas las muestras de hojas y flores fueron lavadas con agua potable y enjuagadas con agua estéril, se cortaron en pequeños segmentos de 1-2 cm del margen de la lesión depositándolas en placas petri conteniendo hipoclorito de sodio al 1% por un tiempo de 2 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y finalmente se colocó las muestras sobre papel absorbente para su secado respectivo. Todo este procedimiento se realizó con la finalidad de eliminar cualquier contaminante extraño que puedan afectar el desarrollo del patógeno.

d. Incubación del patógeno en cámara húmeda

Para el desarrollo fúngico en cámara húmeda se utilizaron placas Petri estériles, en su interior se depositó papel absorbente estéril empapado con agua destilada estéril con el propósito de generar humedad, seguidamente se colocaron los segmentos de las muestras de hojas y flores sobre láminas porta objetos dentro de las placas Petri, se sellaron y se dejaron incubar por siete días bajo condiciones ambientales (24-30°C). Permanecieron en estas condiciones hasta observar el desarrollo del micelio para la identificación bajo el estéreo microscopio.

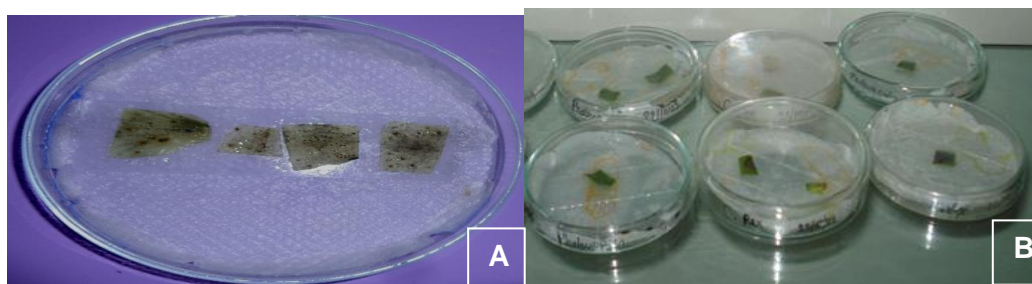


Figura 7: A: Cámara húmeda con muestras de flores B: Cámara húmeda con muestras de hojas.

e. Aislamiento del patógeno

Con ayuda de un estilete estéril y un estereomicroscopio se obtuvieron los acérvulos del patógeno, la cual fueron inoculadas en el centro de las placas petri conteniendo medio de cultivo PDA 2% glucosado, sellamos las placas con parafina para evitar la contaminación; se incubaron bajo condiciones ambientales (24-30 °C) entre 5 y 7 días según el crecimiento de la colonia.



Figura 8: Obtención del patógeno

f. Identificación del patógeno

La muestra se observó en el estereomicroscopio y con la ayuda de dos alfileres entomológicos se logró extraer el micelio del hongo y se colocó en una lámina porta objeto que contenía una gota de Cotton blue (azul de algodón). Esta muestra fue analizada en el microscopio compuesto. (Objetivo 40x / ocular 16x), para determinar las estructuras que caracterizan al patógeno.



Figura 9: Identificación del patógeno

Las estructuras observadas en los análisis fueron descritas y cuantificadas biométricamente utilizando la escala micrométrica, el cual permitió la identificación con ayuda de las claves de identificación de Barnet y Hunter (1998), Sutton (1992) y Arx (1970).

Tabla 8

Valoración en micras para un objetivo a seco

Ocular	Objetivo	Valor platina	Valor ocular	Valor micrométrico
10 x	4x	100	4	25
10x	10x	100	10	10
10x	40x	100	24	2.5

Fuente: French E y Teddy T (1983).

g. Prueba de patogenicidad

El método utilizado para realizar la prueba de patogenicidad está sustentado en el postulado de Koch descrito por Agrios, (2005).

- **Prueba de patogenicidad en hojas**

Se seleccionaron plantas que no presentaban síntomas ni signos de la enfermedad, se lavaron la superficie de las hojas con la ayuda de un aspersor manual y un algodón; para el tratamiento con heridas se realizaron incisiones en las hojas con una aguja entomológica y se inocularon cuadros de agar de 5 x 5 mm con el patógeno extraído de cepas puras de 7 días de crecimiento, haciendo contacto con el área foliar sujetando con un pedazo de cinta adhesiva y un clip tanto en las hojas con heridas y sin heridas de *Phalaenopsis* sp y *Dendrobium* sp. Las plantas fueron colocadas dentro de una estructura de plástico transparente de 270*170*60 mm, el cual cumplió la función de cámara húmeda que proporcionó condiciones de temperatura y humedad apropiada para el desarrollo del patógeno aplicándose riego con ayuda de un atomizador una vez al día durante 15 días.

- **Prueba de patogenicidad en flores**

Se protegieron los botones florales con bolsas brillomax de 300mm x 200mm con la finalidad de evitar que se contaminen con patógenos; después que se abrieron los botones florales se inocularon directamente cuadros de agar de 5 x 5 mm con el patógeno extraído de cepas puras de 7 días de crecimiento, haciendo contacto con el pétalo de la flor sujetando con un pedazo de cinta adhesiva y

clips. Con el fin de generar condiciones de temperatura y humedad se aplicó agua con ayuda de un atomizador.



Figura 10. (A): Inoculación de *Colletotrichum crassipes* en hojas (B): Incubación de plantas inoculadas (C): Protección de botones florales (D): Inoculación del hongo en flores (E): Flor de *Phalaenopsis* sp protegida con bolsa plástica.

h. Reaislamiento

Los síntomas de infección causados por el hongo inoculado en las hojas y flores fueron lavadas y cortadas en segmentos de 2 a 3mm, desinfectándose con hipoclorito de sodio al 1 %, seguidamente se aislaron en placas petri con medio de cultivo PDA con el fin de comprobar si existe concordancia con las descripciones del patógeno observado en el aislamiento inicial así validar y reportar como agente causal de la enfermedad.

i. Control químico *In vitro* con fungicidas

Método de bloques de agar

Una vez obtenido la colonia pura con el patógeno se procedió de la siguiente manera:

Se preparó el medio de cultivo PDA al 2% glucosado.

Se pesaron los fungicidas en polvo en balanza analítica y para medir el fungicida en emulsión concentrada se empleó una jeringa descartable considerando la medida que se mencionan en el cuadro 4.

Se homogenizó cada uno de los fungicidas con el medio de cultivo, se adicionó el antibiótico cloranfenicol y se distribuyeron en placas petri.

Con ayuda de un sacabocado se sacaron las muestras del patógeno y se inocularon en las placas petri conteniendo PDA con los fungicidas.



Figura 11: Incubación el patógeno en placas petri con tratamiento fungicida.

El patógeno estuvo expuesto a 7 fungicidas más un testigo con 5 observaciones, se incubaron por 7 días a una temperatura promedio de ± 2 °C 28.

Tabla 9

Fungicidas en estudio

TTO	Fungicida		Dosis g/l	Tipo
	Ingrediente activo	Nombre comercial		
T1	Azoxystrobin Azoxystrobin 25 %	Quadris SC	0.5	S
T2	+tebuconazole 50%	Epico 750 WG	1	CO
T3	Benomyl	Benlate 70 % PM	1	S
T4	Carbendazim	Protexin 500 SC	1.5	S
T5	Mancozeb + benomyl	Metamas PM	2.5	CO
T6	Mancozeb + Metalaxil	Hieloxil mix PM	2	CO
T7	Propineb	Antracol 70 % PM	1.5	CO
T8	Testigo	-	-	

Fuente: Elaboración propia, (2018).

2.7 Indicadores evaluados

a) Síntomas

Se evaluaron al momento de la recolección de las muestras enfermas y se sacaron imágenes con los síntomas de la enfermedad que presentaron las hojas y flores.

b) Características biométricas

- **Medición lineal de la colonia y tiempo de colonización**

Con ayuda de una regla milimetrada se procedió a medir el diámetro de la colonia en la placa petri y se contaron los días desde el aislamiento del hongo hasta que se haya formado completamente la colonia o esta haya cubierto toda la placa Petri.

- **Medición de la estructura del patógeno**

Se determinó la presencia de estructuras, con ayuda de un estilete se sacó una pequeña muestra del patógeno para luego ser colocada en una lámina porta objeto conteniendo una gota de azul de algodón (Cotton blue) después se cubrió con la laminilla de vidrio inmediatamente se flameó en la llama de un mechero; una vez fijada la muestra se procedió a observar en el microscopio compuesto con un objetivo de 40 x y un ocular de 16 y con ayuda de la escala micrométrica se procedió a medir las estructuras presentes.

c. Características morfológicas

Se observó directamente y se determinó el color de la colonia.

d. Incidencia de la enfermedad en vivero

Para determinar el porcentaje de incidencia se contaron el total de plantas por género (*Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp) y se tomaron al azar el 10 % de cada una para la evaluación de las plantas enfermas.

Se utilizó la fórmula recomendada por (Wolcan, et al 2001).

$$\% \text{ Incidencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de plantas enfermas}}{\text{Total de plantas (Sanas + enfermas)}} * 100$$

e. Severidad de la enfermedad en vivero

Para la valoración de la severidad del daño ocasionado por el patógeno causante de las manchas foliares se evaluaron 50 muestras al azar por cada género y se compararon con la escala de valoración porcentual propuesta por (Merchan, 2013). Se usó el mismo valor escalar en flores.

Tabla 10

Escala de valoración porcentual para la evaluación de severidad de enfermedades en orquídeas.

Valor escalar	Porcentaje
1	0,1-1,9
2	2-7,9
3	8-17,9
4	18-41,9
5	42-78

Fuente: Merchan. (2012).

f. Incidencia de la enfermedad en hojas y flores después de la inoculación en la prueba de patogenicidad

Esta prueba se realizó con el fin de confirmar las características morfológicas de los aislamientos iniciales, determinar la efectividad de los tipos de inoculación con herida y sin herida y comprobar la patogenicidad del patógeno colocando discos de micelio sobre las hojas y flores. Se contaron el total de plantas que fueron afectadas y se sometieron a prueba estadística.

g. Crecimiento de la colonia en el control químico *In vitro*

Se contaron los días en que el testigo sin fungicida colonizó por completo la placa petri, momento en que se procedió a medir el diámetro de las colonias con tratamientos fungicidas.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Síntomas

La enfermedad ocasionada por *Colletotrichum crassipes* conocida como antracnosis presentaron manchas necróticas en las hojas manifestándose lesiones circulares de forma irregular de color gris con halo clorótico alrededor de la lesión, en algunos casos las manchas presentaron el aspecto de simples quemaduras y diminutas manchas que se distribuyen en toda la hoja. En las flores la enfermedad presentó diminutas manchas necróticas con bordes irregulares distribuidas en toda la flor, tal como se observa en la figura 12.

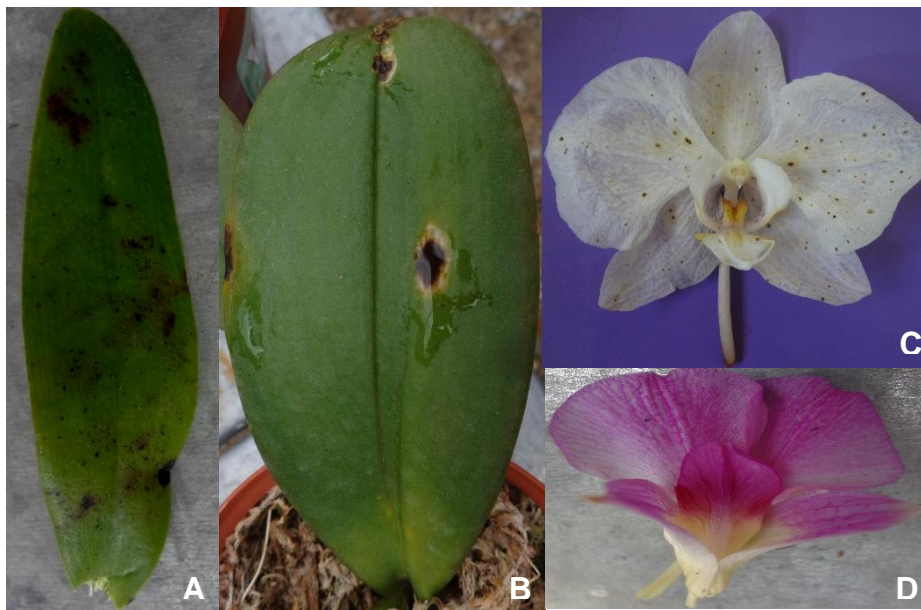


Figura 12: (A) Hoja de *Dendrobium* sp, (B) Hoja de *Phalaenopsis* sp, (C) Flor de *Phalaenopsis* sp (D), Flor de *Dendrobium* sp.

Estos resultados se corroboran con Cabrera et al., (2003), quienes mencionan que los síntomas de antracnosis en orquídeas mostraron necrosis con áreas de color gris oscuro bordeado de una zona clorótica, variando en el tamaño y tonalidad de las lesiones, según el género y lugar donde se localiza la misma, este daño se observa tanto en el haz de las hojas como en el envés. Salazar (2009) describe que las flores de orquídeas de los géneros: *Dendrobium* sp, *Cattleya* sp, *Cymbidium* sp, *Oncidium*

sp y *Vanda* sp, y *Phalaenopsis* sp presentan manchas circulares pequeñas de color marrón en los pétalos y sépalos; resultados muy similares a los que se obtuvieron en el presente trabajo.

3.2. Características morfológicas y biométricas del hongo aislado de orquídeas *Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp.

Tabla 11

Características morfológicas y biométricas del hongo observado en estructuras desarrolladas en Papa Dextrosa Agar - PDA al 2% y en muestras directas de las plantas.

<i>Colletotrichum crassipes</i>		
Características		Resultados
	Tiempo de colonización	7 días
Colonia	Medición lineal	90,00 mm
	Color	gris
	Forma	algodonoso
Micelio	Color	blanco grisáceo
	Largo	11-15 μm
	Ancho	5,5-7,5 μm
Conidia	Color	hialina
	Forma	recta cilíndrica
	Longitud	51 μm
Peritecio	Ancho	138 μm
Apresorio	Forma	normalmente crenate

Fuente: Elaboración propia (2018).

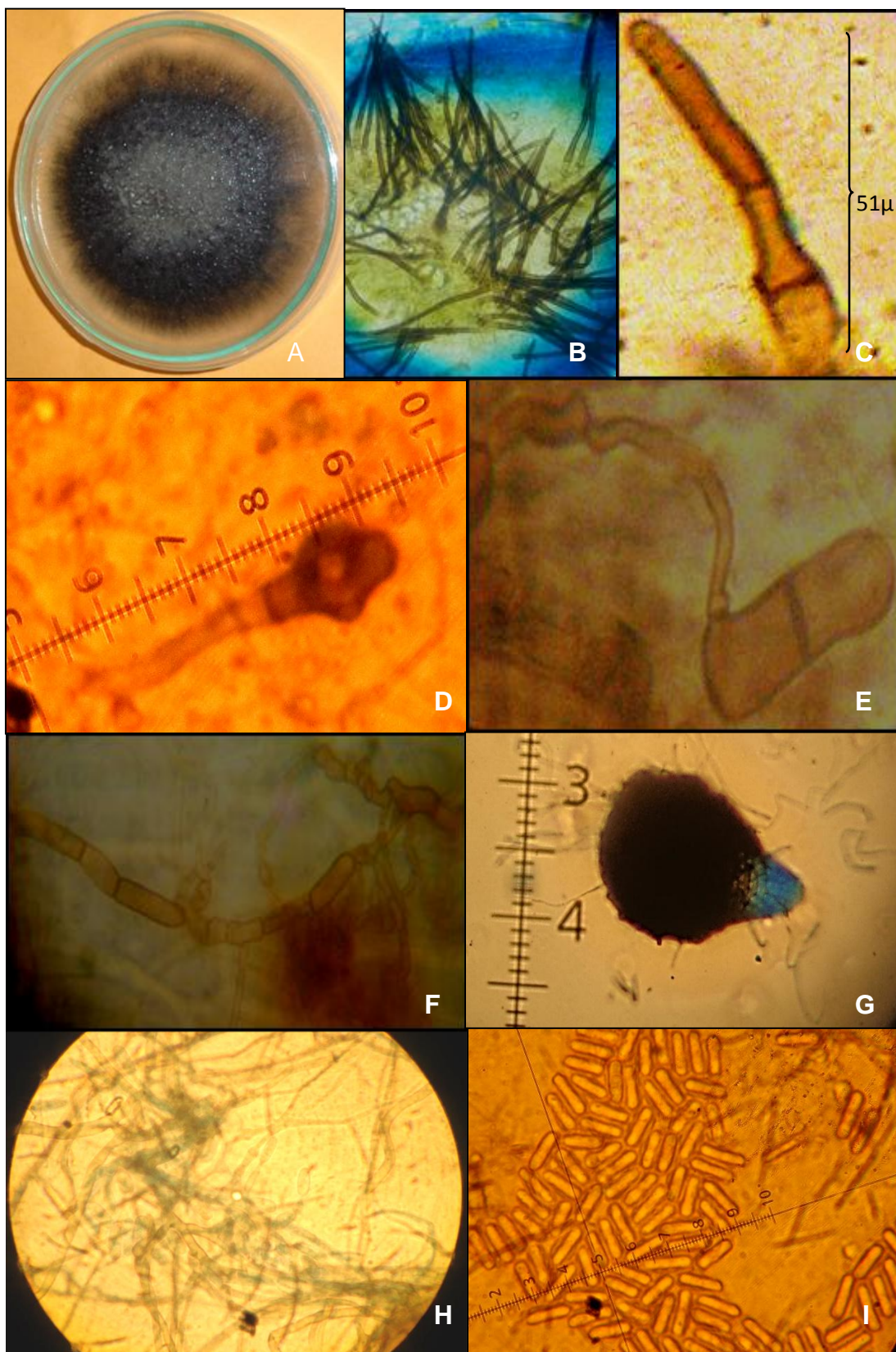


Figura 13: (A): Colonia (B): Acérvulo (C): Setas (D): Apresorio (E): Germinación de esporas (F): Hifas septadas (G) Peritecio: (H) hifas (I): Conidias unicelulares hialinas.

Las características morfológicas y biométricas (tabla 11 y figura 13) obtenidas durante la identificación del patógeno tanto en hojas y flores comparadas con las claves taxonómicas Barnett y Hunter (1998), (1971-1976) y el postulado de Koch permitieron identificar a *Colletotrichum crassipes* como el agente que ocasiona la antracnosis en orquídeas del vivero de la Universidad Nacional de San Martín. Agostini, (1992) menciona que los métodos tradicionales para identificar especies de *Colletotrichum* se han basado principalmente en diferencias morfológicas tales como el color de la colonia, tamaño, forma de los conidios, temperatura óptima para su desarrollo y presencia o ausencia de setas.

Se observó presencia de puntos negros que al ser analizados a nivel microscópico se determinó como acérvulos, se concuerda con la descripción de Arx (1970) donde menciona que en un análisis minucioso en hojas de orquídeas se muestra unos pequeños puntos negros casi siempre rodeados de una especie de pelos cortos de los que sale una masa con aspecto meloso; estos puntos negros son formaciones típicas de acérvulos del género *Colletotrichum*.

Herrera et al (2015) determinó que una de las enfermedades en el orquideario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca fue Antracnosis ocasionado por *Colletotrichum* sp, mediante aislamientos en medio PDA y postulado de Koch, realizando una descripción macroscópica y microscópica para determinar las características morfológicas y biométricas del patógeno de las colonias encontradas.

Cabrera et al., (2003) identificó a *Colletotrichum* sp como agente causal de las manchas foliares de diversas especies de orquídeas en ejemplares valiosos del Nor Este de Argentina.

Antracnosis es una enfermedad ocasionada por el género *Colletotrichum* considerado como un género con muchas especies que se encuentra distribuido en todo el mundo y teniendo en cuenta que el vivero se encuentra en un lugar de clima tropical; su desarrollo se ve favorecido por la alta humedad, temperaturas entre 10 y 30 °C, la capacidad de inoculación y sumado el manejo inadecuado que se les brinda.

3.3 Incidencia y severidad de *Colletotrichum crassipes* en hojas y flores de *Phalaenopsis* sp y *Dendrobium* sp en el vivero

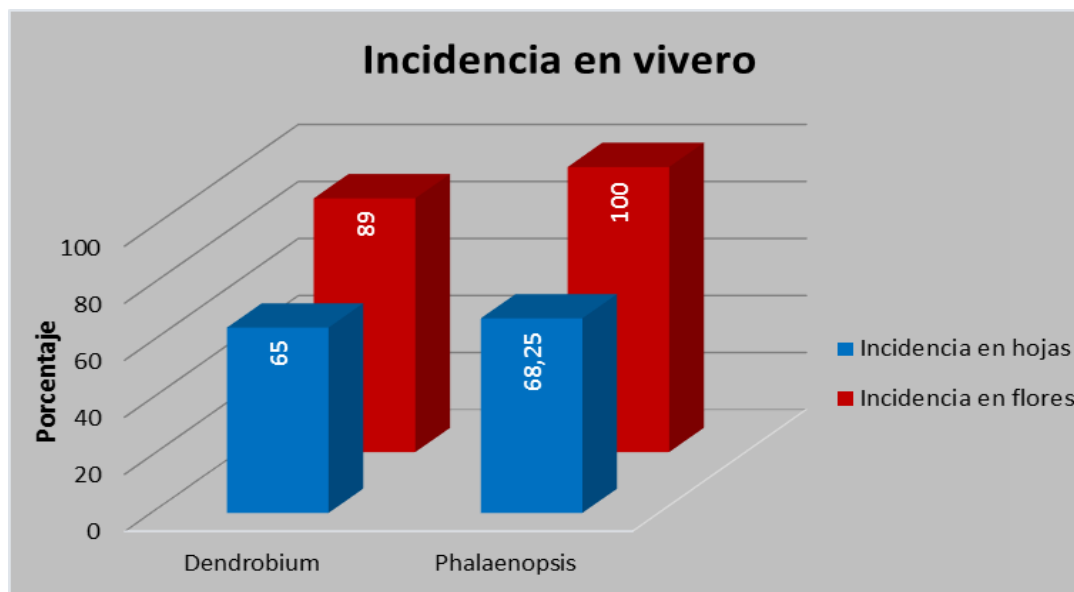


Figura 14: Incidencia de *Colletotrichum crassipes* en hojas y flores

Tabla 12

Severidad de la enfermedad en hojas y flores

Género	Grado de severidad en hojas	% AFA en hojas	Grado de severidad de en flores	% AA en flores
<i>Dendrobium</i> sp	E1	1.8	E2	5
<i>Phalaenopsis</i> sp	E1	1.5	E2	5

Fuente: Elaboración propia (2018)

La incidencia de la enfermedad en hojas se ve reflejada en un 65% para *Dendrobium* sp y 68,25% para *Phalaenopsis* sp. El grado de severidad presentó un valor escalar E1 tanto para *Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* que corresponde a un 1.8% y 1.5% de AFA respectivamente; en flores se obtuvo una alta incidencia de la enfermedad con 89 % para *Dendrobium* sp y 100 % para *Phalaenopsis* sp presentando un valor escalar de severidad (E2) con 5% de AFA.

Merchán (2012) evaluó hongos patógenos en el orquideario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca obteniendo una incidencia del 10,73% del total de plantas en el invernadero, en las hojas presentó valores bajos de la presencia de síntomas entre el 0,1 y 1,9% de AFA y un valor escalar (E1) de cobertura de la lámina foliar, en 22 casos se encontró la presencia de síntomas en el rango escalar de 2 y 7,9% de AFA con un valor escalar (E2), también se encontraron valores escalares de severidades comprendidos entre el 8 al 17,9% de AFA y un valor escalar (E3), con 14 casos tenían presencia de síntomas mayores al 42% del área foliar afectada, valor que manifiesta la pérdida de la hoja; la severidad categoría (E4) que corresponde a valores en porcentaje del 18 al 41,9% de manifestaciones de síntomas en el follaje.

Los niveles de incidencia encontrados tanto para hojas como para flores están por encima de lo encontrado por Merchan, B. (2013) y difieren de este debido a la presencia de factores que favorecen la diseminación del patógeno tales como presencia de residuos de material vegetal enfermo (hoja y flores), malezas en el contorno del vivero, uso de materiales de propagación sin desinfectar, tipo de riego (salpicaduras), manipulación inadecuada durante las labores culturales, presencia de insectos, falta de un plan de manejo fitosanitario, manejo inadecuado de la sombra, los antecedentes propios del lugar donde se ubica el vivero a todo esto sumado la capacidad patogénica que tiene el género *Colletotrichum*. El grado de severidad E1 encontrado con 1.8% y 1.5% de AFA coincide con Merchan, B. (2013).

3.4. Patogenicidad de *Colletotrichum crassipes* sobre hojas y flores de *Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp.

Respuesta del hospedero a la inoculación del hongo en hojas y flores (con herida y sin herida).



Figura 15: (A): Inoculación con herida en hojas de *Phalaenopsis* sp (B): Inoculación con herida en hojas de *Dendrobium* sp (C): Inoculación sin herida en hojas de *Phalaenopsis* sp (D): Inoculación sin herida en hojas de *Dendrobium* sp (E): Evaluación de la incidencia de la enfermedad después de la inoculación (F) Inoculación en flores de *Phalaenopsis* sp (G) Inoculación en flores de *Phalaenopsis* sp.

Tabla 13

ANVA para el porcentaje de incidencia de la enfermedad en hojas después de la inoculación en la prueba de patogenicidad (Con herida y sin herida) (transformado por \sqrt{x}).

F. de V	G.L	S.C	C.M.E	F.C.	P-valor	Sig.
Factor A	1	1,825	1,825	4,818	0,059	N.S.
Factor B	1	62,838	62,838	165,87	0,000	**
Factor A * Factor B	1	1,825	1,825	4,818	0,059	N.S.
Error	8	3,031	0,379			
Total	11	69,519				

N.S.= No significativo ** = Altamente Significativo

$$R^2 = 95,6\% \quad C.V. = 7,98\% \quad \text{Desv. Estándar} = 0,6156 \quad \text{Promedio} = 7,71$$

En la tabla 13, se puede observar el Análisis de Varianza para el porcentaje de incidencia de la enfermedad en hojas después de la inoculación, el cual determinó la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) para el FB: Tipo de Inoculación, por lo que se asume que los niveles del FB fueron diferentes entre sí; no determinó diferencias estadísticas significativas en el FA: géneros, ni en la interacción de FA*FB. El efecto que ejercieron los niveles del FA y del FB sobre el porcentaje de incidencia en hojas de *Dendrobium sp* y *Phalaenopsis sp* se explica en 95,6% (R^2), la desviación estándar con 0,6156 y el Coeficiente de variabilidad (C.V.) con 7,98% nos reporta la confiabilidad de la información obtenida, debido a que este valor se encuentra dentro del rango establecido por Calzada (1982).

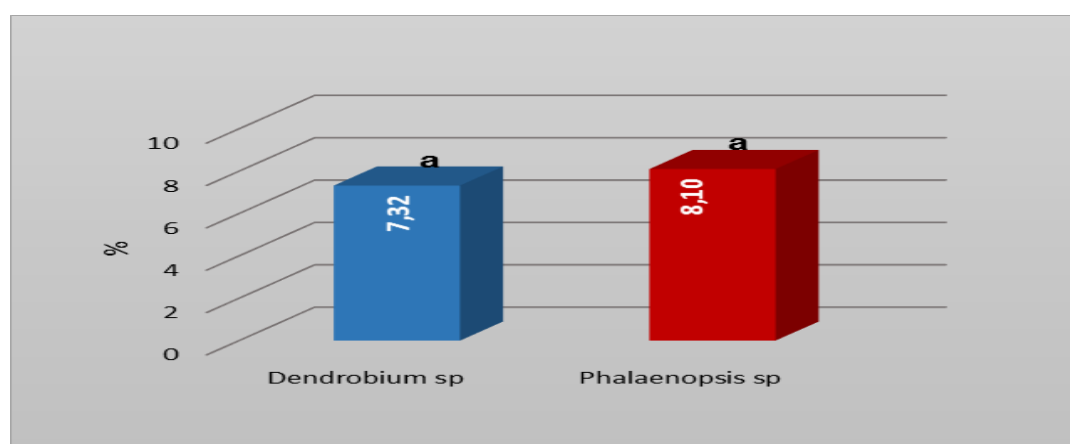


Figura 16: Prueba de Duncan ($p < 0,05$) para los promedios de los tratamientos en la incidencia de *Colletotrichum crassipes* después de la inoculación en la prueba de patogenicidad en hojas en los niveles del FA: Géneros. Datos corregidos.

La prueba de Duncan ($P < 0,05$) para promedios de tratamientos en los niveles del Factor A: género (figura 16), nos muestra que no existió diferencias significativas en el porcentaje de incidencia de *Colletotrichum crassipes* sobre las hojas de *Dendrobium sp* y *Phalaenopsis sp* quienes obtuvieron promedios de 7,32% y 8,1% respectivamente, la dispersión (desviación típica) que existió en cada uno de los tratamientos (niveles del FA) fueron muy pequeñas, lo que nos indica que la concentración de datos fue mayor alrededor de la media.

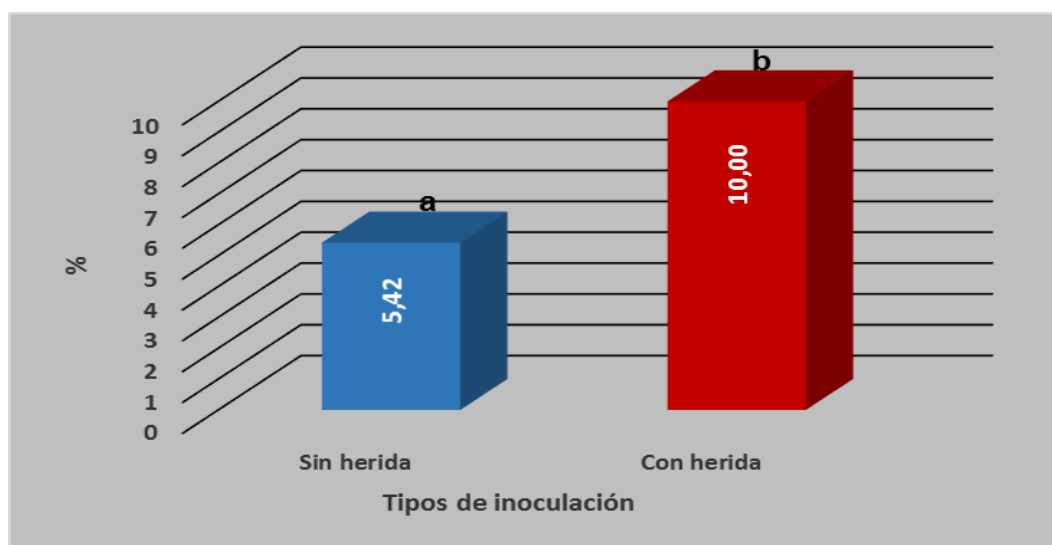


Figura 17: Prueba de Duncan ($\alpha=0,05$) para promedios de tratamientos respecto al porcentaje de incidencia de *Colletotrichum crassipes* en hojas en los niveles del FB: Tipo de inoculación. Datos corregidos

La prueba de Duncan ($P < 0,05$) para promedios de tratamientos en los niveles del Factor B: Tipo de inoculación (figura 17), nos muestra la existencia de diferencias significativas del porcentaje de incidencia de *Colletotrichum crassipes* sobre las hojas de *Dendrobium sp* y *Phalaenopsis sp*, en donde las hojas inoculadas a través de heridas el porcentaje de incidencia fue mayor con 10,0% superando estadísticamente al de la inoculación sin herida donde se obtuvo un promedio de 5,42%. La dispersión (desviación típica) que existió en cada uno de los tratamientos (niveles del FB) nos indica que la concentración de datos fue mayor alrededor de la media y variablemente altas.

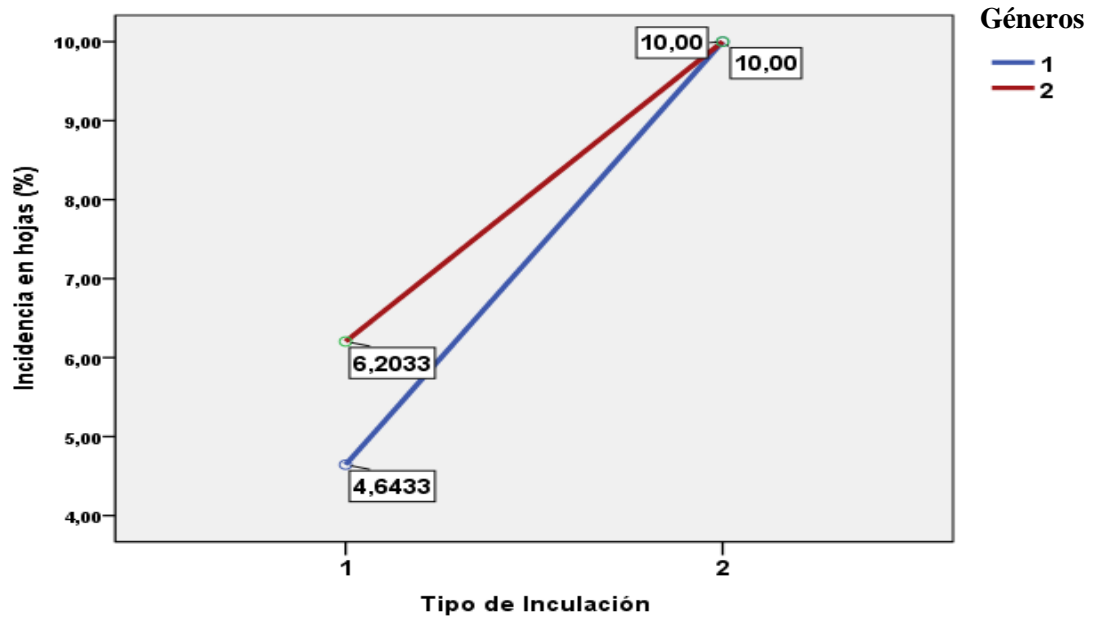


Figura 18: Efectos principales de interacción de los niveles del FA: Géneros dentro de los niveles del FB: Tipo de inoculación.

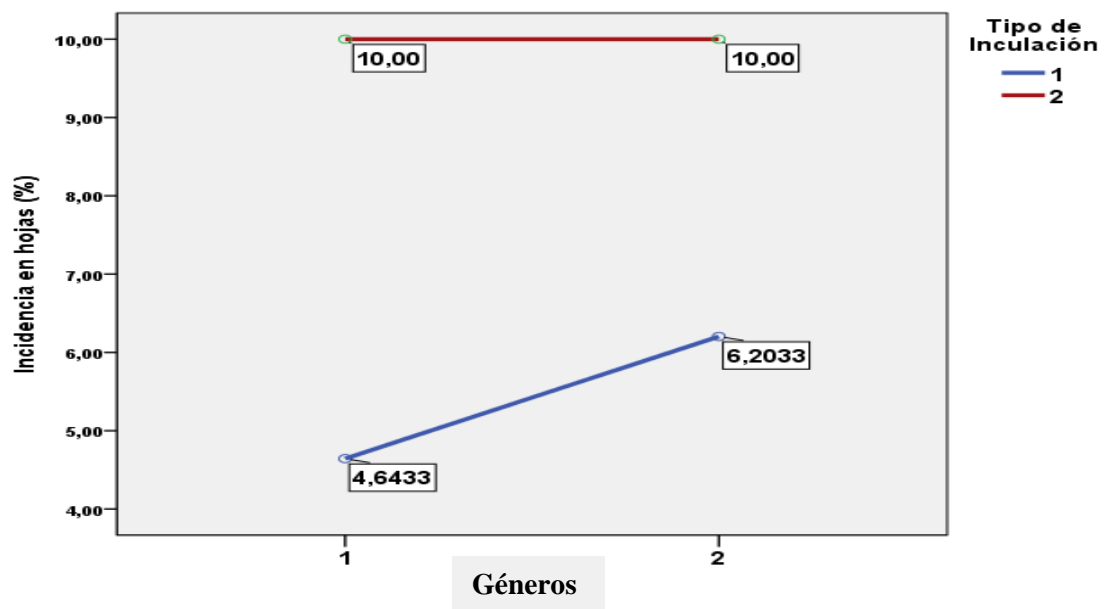


Figura 19: Efectos principales de interacción de los niveles del FB: Tipo de inoculación dentro de los niveles FA: Géneros

Observamos además en la figura 18, que los efectos principales de interacción de los niveles del FA: géneros dentro de los niveles del FB: Tipo de inoculación, tuvieron respuesta similares cuando las hojas de *Dendrobium sp* y *Phalaenopsis sp* fueron inoculadas con herida con promedios de 10,0% de incidencia de *Colletotrichum crassipes* y cuando la inoculación fue en hojas sin herida, la especie *Phalaenopsis sp* mostró el mayor porcentaje de incidencia con 6,2% frente al obtenido por la especie *Dendrobium sp* quien obtuvo un promedio de 4,6% de incidencia. Este mismo comportamiento también se observa en la figura 19, efectos principales de interacción de los niveles del FB: Tipo de inoculación del dentro de los niveles FA: géneros.

Esto se corrobora con lo publicado por Cabrera et al., (2003), quien realizó pruebas de patogenicidad de *Colletotrichum sp* en orquídeas resultando positivo a la inoculación y obteniendo mayor efectividad en el tratamiento con heridas, con manifestación de síntomas similares a los originales, pero teniendo resultados negativos respecto a los testigos y las plantas inoculadas sin heridas, las cuales no manifestaron síntomas sucediendo lo contrario en el presente trabajo, donde se obtuvieron resultados positivos en la inoculación sin heridas evidenciando los síntomas característicos de la enfermedad; demostrándose que *Colletotrichum crassipes* es capaz de infectar plantas sin heridas, sin embargo la incidencia de la enfermedad fue mayor con la inoculación a través de heridas.

Colletotrichum sp. es un hongo que se encuentra distribuido en todo el mundo, siendo más frecuente en los climas tropicales y sub tropicales y que su desarrollo se ve favorecido por la alta humedad, salpicaduras de agua al momento del riego, lesiones ocasionadas por daños mecánicos, frío, temperatura y humedad que favorecen las infecciones (Studt, 2008).

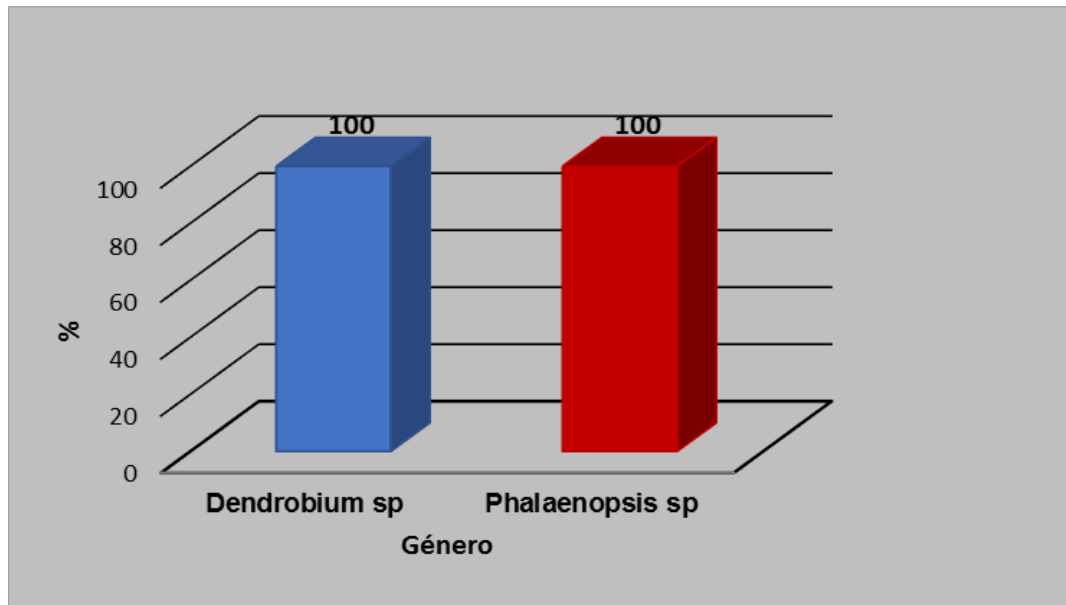


Figura 20: Incidencia de *Colletotrichum crassipes* en flores de *Dendrobium sp* y *Phalaenopsis sp* después de la inoculación en la prueba de patogenicidad.

Para esta variable no fue necesario aplicar un diseño estadístico debido a que se aplicaron evaluaciones en base a valores porcentuales, aplicándose estadística descriptiva utilizando gráfica de barras.

Así mismo en la figura 20 se aprecia el porcentaje de incidencia de *Colletotrichum crassipes* en flores después de la inoculación directa con un 100% de efectividad tanto para *Dendrobium sp* y *Phalaenopsis sp* coincidiendo con (Salazar 2009) quien menciona que *Colletotrichum sp* es el patógeno que ocasiona puntos negros en flores de orquídea; corroborando con (Stevez y Mercado 2005) donde menciona que en pétalos y sépalos de *Phalaenopsis sp* , *Dendrobium sp* y *Cattleya sp* se identificaron hongos de los géneros *Colletotrichum*.

Tabla 14

ANVA para determinar el crecimiento de la colonia de *Colletotrichum crassipes* en el control químico In vitro expresado en longitud (mm)

F. de V	GL	S.C	C.M.E	F.C.	P-valor	Sig.
Tratamientos	7	36 060,400	5 151,486	23 152,75	0,000	**
Error	32	7,120	0,223			
Total	39	36067,520				

** : Altamente significativo

$$R^2 = 100,0\% \quad C.V. = 2,6\% \quad \text{Desv. Standar} = 0,47 \quad \text{Promedio} = 18,2$$

En la tabla 14, observamos el Análisis de Varianza para la longitud en mm de la colonia del hongo *Colletotrichum crassipes*, el cual determinó la existencia de diferencias altamente significativas ($P < 0,05$) para tratamientos, por lo que se asume que al menos uno de los tratamientos fue diferente al de los demás. El efecto que ejercieron los tratamientos sobre la longitud en mm de la colonia del hongo se explica en 100,0% (R^2), la desviación estándar con 0,47 y el Coeficiente de variabilidad (C.V.) con 2,6 reporta la confiabilidad de la información obtenida, debido a que este valor se encuentra dentro del rango establecido por Calzada (1982).

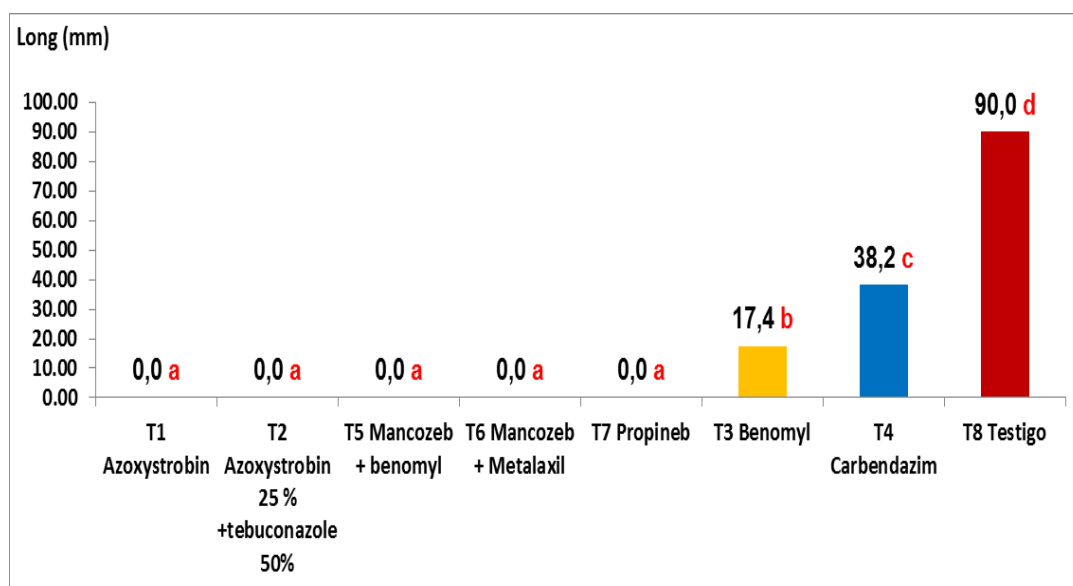


Figura 21: Prueba de Duncan ($P=0,05$) para promedios de tratamientos respecto a la longitud en mm del crecimiento de la colonia de *Colletotrichum crassipes*.

La prueba de Duncan ($P < 0,05$) para promedios de tratamientos (figura 21) muestra que Azoxystrobin (T1), Azoxystrobin 25 % + tebuconazole 50% (T2), Mancozeb + benomyl (T5), Mancozeb + metalaxil (T6), Propineb (T7) tuvieron mayor efecto inhibitorio controlando el crecimiento de colonia de *Colletotrichum crassipes* quienes obtuvieron 0,0mm de longitud superando estadísticamente a los promedios de los tratamientos Benomyl (T3) 17,4mm, Carbendazim (T4) 38,2mm y el testigo (T8) 90 mm con el mayor crecimiento en longitud de la colonia.

Resultados contradictorios se encontró con (Guillén et al., 2017) quien menciona que benomil a dosis altas, medias y bajas es el fungicida que mejor controló el crecimiento de la colonia (100%) y que azoxystrobin a dosis alta media y baja logra más del 50% de inhibición.

Los fungicidas de menor potencial inhibitorio sobre *Colletotrichum acutatum* fueron fluoxastrobin, trifloxystrobin y azoxystrobin con porcentajes de inhibición por debajo de 50 %, aunque demostraron ser menos efectivos aplicados solos, resultados recientes indican que son mejores cuando se emplean mezclados con tebuconazol (Silva J, et., al 2014), esto coincide con lo encontrado en el presente trabajo de investigación donde las mezclas demostraron tener un elevado efecto inhibitorio tales como azoxystrobin + tebuconazole, Mancozeb+ benomyl, mancozeb + metalaxil obteniendo 0,00 mm de crecimiento de Colonia.

CONCLUSIONES

- En vivero se encontró una alta incidencia de antracnosis tanto en hojas y flores de *Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp; con un nivel escalar E1 en hojas y E2 en flores siendo crítica en las flores debido a que genera pérdida de vigor, estética comercial disminuyendo la calidad de la planta y afectando económicamente.
- Se determinó que la enfermedad presente en las hojas y flores de las orquídeas *Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp es Antracnosis ocasionada por el hongo *Colletotrichum crassipes*.
- *Colletotrichum crassipes* demostró su gran capacidad patogénica a través de la prueba de patogenicidad sin herida y con herida tanto en hojas y flores de *Dendrobium* sp y *Phalaenopsis* sp manifestando síntomas característicos a los observados en las plantas afectadas, siendo este capaz de ocasionar una enfermedad infecciosa en orquídeas a partir de re aislamientos de plantas inoculadas superando en efectividad la inoculación a través de heridas.
- Se logró controlar el crecimiento *In vitro* de la colonia en un 100% con los tratamientos T1 (Azoxystrobin), T2 (Azoxystrobin 25 % + Tebuconazole 50 %) T5 (Mancozeb + benomil) T6 (Mancozeb + Metalaxil) y T7 (Propineb).

RECOMENDACIONES

- Antes de ingresar nuevas plantas al vivero realizar cuarentenas para evitar introducir plagas y enfermedades.
- Realizar labores culturales y mantenimiento al vivero para reducir posibles fuentes de inóculo.
- Evitar los daños mecánicos a las plantas para evitar el fácil ingreso de enfermedades.
- Con los fungidas que demostraron buen control sobre el crecimiento de la colonia del patógeno realizar ensayos aplicando directamente en las plantas.
- Implementar un plan de manejo fitosanitario con el fin prevenir posibles enfermedades.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrianzen, R. (1996). *Vademécum Agrario 95/96*: Ingeniero Agrónomo. Editorial. Prensa. Impreso En Lima – Perú. 768 P.
- Agostini, J. (1992). *Selective isolation procedures for differentiation of two strains of Colletotrichum gloeosporioides from citrus*. Plant Disease 76:1176-1178.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th Ed., Elsevier Academic Press, Londres. Pp. 425.
- Apablaza, G. (2000). *Patología de cultivos*. Epidemiología y control holístico. Colección en Agricultura Facultad De Agronomía e Ingeniería Forestal, Ediciones Universidad Católica De Chile, Santiago, Chile, P. 283 – 305.
- Arx, J. (1970). *The genera of Fungi sporulating in pure culture*. J. Gramer: Germany.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota. USA.
- Barnett, H. L. y Hunter, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi*. Third Edition. Printed in The United States of America. Miniospolia Minnesota –USA. Pp 241.
- Bayman, P., Lebron. L., Tremblay, R., & Lodge, D. (1997). *Fungal Endophytes in Roots and Leaves of Lepanthes (Orchidaceae)*. New Phytol. 1997; 135: 143-149.
- Bennett, (1992). *Conserving Peruvian Orchids*. Aos Bulletin (EE. UU). (11):1247-1249.
- Cabezas, (2004). *Curso Taller: Diagnóstico Y Evaluación de Plagas*. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (Senasa). Tingo María- Perú Pag.2-3.
- Cabrera, M., Galmarini., M., & Flachslan, E. (2003). *Colletotrichum Gloeosporioides*. Patógeno de Orquídeas en el Nor Este de Argentina. Cátedra de Fitopatología - Facultad de Cs. Agrarias - UNNE.

- Calzada, J. (1982). *Métodos estadísticos para la Investigación* 5ta Edición. Edit. Milagros S.A. Lima-dic. 1982.
- Cating, R., Palmateer, A. J., Stiles, C. M., & Davison, D. A. (2009). *Black Rot of Orchids Caused by **Phytophthora palmivora** y **Phytophthora cactorum***. One of a series of the Plant Pathology Department, Florida Cooperative Extension Servi. pp. 260. Plant Pathology Department, UF/IFAS Extension. University of Florida. 5 pp. Recuperado de <http://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/PP/PP26000.pdf>.
- Cavero, M.; Collantes, B. & Patroni, C. (2007). *Orquídeas de Perú*. 1° Parte, Cdc-Lima.
- Clin, J. (2004). *American Society for Microbiology*. Características morfológicas mas importante para separar cinco especies de *Colletotrichum*.
- Dressler, R.L. (1993). *Phylogeny and classification of the orchic family*. Dioscorides Press, Portland, Oregón.
- Estévez, C., & Mercado, W. (2005). *Determinación del agente causal de manchas en flores de orquídeas*. Universidad de Puerto Rico. Departamento de Protección de Cultivos. Recuperado de <http://136.145.83.33:8000/jspui/bitstream/10476/19>.
- FAO, (2000). *El código Internacional de la FAO*. Sobre la distribución y utilización de pesticidas.
- Fernández, H. (2004). *Curso Taller: Diagnóstico de enfermedades de plantas*. Servicio Nacional de Sanidad Agraria (Senasa). Arequipa-Perú. Pág. 2.
- French, E y Hebert, T. (1983). *Métodos de investigación fitopatológica*. Editorial IICA.
- Gamboa, M. (2006). *Hongos endófitos tropicales*. Conocimiento actual y perspectivas. Acta biológica Colombiana 11:3 -20.
- Giraldo, G., & Betancur, J. (2011). *Guía de campo de las orquídeas de Santa María Boyacá - Colombia*.

- Guillén, D., Cadenas, C., Tejada I., López V., Andrade M., & Juárez P. (2017) *Inhibición colonial in vitro de un aislado de Colletotrichum acutatum Simmonds a tratamientos con fungicidas*. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Pp 14-16
- Herrera, A., Prado A., & Moreno P. (2015). *Estudiantes Ingeniería Agronómica*. 2Grupo de Investigación PROSAFIS. Universidad de Cundinamarca. Aislamiento y pruebas de patogenicidad de hongos asociados con hojas de orquídeas de los géneros *Cattleya* sp, *Odontoglossum* sp y *Miltonia* sp. Suplemento de la revista Mexicana vol 33 suplemento 2015 S 77. Recuperado de <http://rmf.smf.org.mx/suplemento/docs/Volumen332015/Resumenes Posters.pdf>.
- Isacáz, M. J. (2000). *Respuesta de Odontoglossum pardinum a cuatro tipos de sustratos en el bosque nativo de Nueva América*. Tesis de Ingeniero en Recursos Naturales Renovables. Ibarra, Universidad Técnica del Norte.
- Jones, S. (2002). *Black Rot*. American Orchid Society. Recuperado de <http://www.aos.org/Default.aspx?id=119>.
- León, M. (1995). *Conservación de Especies Peruanas de Orquídeas usando Técnicas de Cultivo In Vitro*. Tesis para optar el Título de Biólogo. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima – Perú. 46 P.
- Light, M. H. (2004). *Orchid Diseases: Part II - Problems and Solutions*. Ottawa Orchid Society. Recuperado de www.ottawaorchidsociety.com/diseases_two.pdf.
- Merchan, B. (2013). *Autor de la tesis Evaluación de hongos y pseudohongos patógenos en el Orquideario de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Cuenca*.
- Peres, N., Souza N., Peever T., & Timmer L. (2004). *Benomyl sensitivity of isolates of Colletotrichum acutatum and c. gloeosporioides from citrus*. Plant Disease, 88 (2): 125-130. citado por Guillen D. (2001).

- Rivera, C. G. (1998). *Orquídeas, Generalidades y cultivo*. Heredia, Costa Rica.
- Rivera, C.G. (2005). *Estudio de las enfermedades que afectan las orquídeas en Costa Rica*. Revista Tícorquídeas.1 (1):13-14.
- Rodríguez, M. (2018). *Caracterización morfológica, molecular y de resistencia a fungicidas de Colletotrichum sp aislado de tomate de árbol*. pp. 51. Universidad Central del Ecuador Facultad de Ciencias Agrarias.
- Salazar, W., Rivera G., & Corrales, G. (2007). *Comparación de los problemas fitosanitarios en orquídeas de poblaciones silvestres y de cultivo, como evaluación de riesgos de plagas o epidemias Lankesteriana International Journal on Orchidology*, vol. 7, núm.1-2, marzo, 2007, pp.362-367. Universidad de Costa Rica Cartago, Costa Rica.
- Salazar, W. J. (2009). *Descripción de problemas fitosanitarios de orquídeas en dos ambientes: zona protectora cerros de la Carpintera, Cartago y orquideario 25 de mayo, Sabanilla de Montes*. Recuperado de http://siemprelistos.org/files/download/247_descripcion_problemas_fitosanitarios_orquideas.pdf.
- Silva, J., Spósito, M., Marín, D.R., & Amorim, L. (2014). *Efficacy and timing of application of fungicides for control of citrus postbloom fruit drop*. Crop Protection, 59: 51-56.
- Studt, E. H. (2008). *Levantamento e desenvolvimento de kit diagnóstico de patógenos e propagação in vitro de orquídeas no estado do Rio de Janeiro*. (Tesis Maestría, Universidad de Federal Rural do Rio de Janeiro). Citado en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=44339813074>.
- Sutton, B.C. (1992). *El género Glomerella y su anamorfo Colletotrichum*. En: *Colletotrichum: biología, patología y control* (eds. JA Bailey y MJ Jeger). CAB International, Wallingford:1-27.

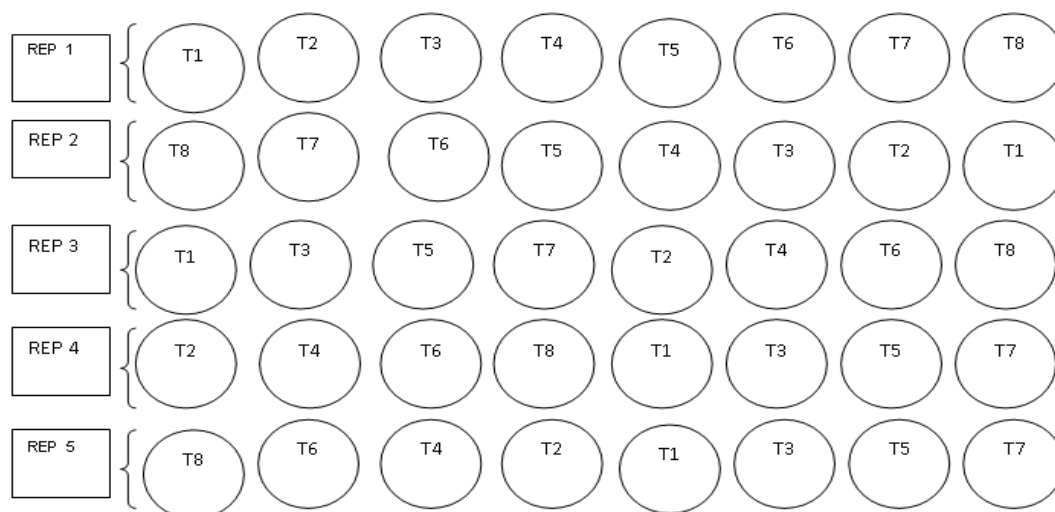
- Tabares, F. (2002). *Evaluación In vitro de diferentes compuestos químicos agrícolas para el control de los hongos Colletotrichum gloesporioides y C. acutatum, causantes de la antracnosis de los cítricos*. Trabajo de grado para optar por el título de Microbiólogo Industrial – Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias básicas.
- Tobar, F. (2005). *Estudio de orquídeas en Nuevo Mundo (Los Bancos Pichincha) para determinar especies potencialmente comerciales como alternativa de conservación del bosque*. Tesis de Ingeniero en Recursos Naturales Renovables. Ibarra, Universidad Técnica del Norte.
- Waller, J.M. (1992). *Colletotrichum diseases of perennial and other cash crops*. In *Colletotrichum : Biology, pathology and control*. Bailey, J.A. and Jeger, M.J. (Eds.). p. 167-185. CAB International. Wallingford, U.K. Recuperado de http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Mario_Orozco_Sanchez.pdf.
- Wolcan, S. M., Lori, G. A., Ronco, L. M.; & Fernández, R. (2001). *Enanismo y podredumbre basal de Eustoma grandiflorum y su relación con la densidad de Fusarium solani en el suelo*. Fitopatol. bras. Recuperado de <http://www.scielo>
- Yaringaño, C. (1985). “Control Químico del Ojo de sapo del Tabaco negro en almaciguera y campo definitivo. Boletín Técnico. E. E. A. “El Porvenir”. San Martín – Perú. 23 P.

Linkografía visitada

www.species2000.org. Clasificación taxonómica de las orquídeas.

ANEXOS

Anexo 1: Distribución de tratamientos en la prueba de control *In vitro* de fungidas



Anexo2: Distribución de los tratamientos para la prueba de Patogenicidad.

REPETICIONES	TRATAMIENTOS			
	T1	T2	T3	T4
REP1	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
REP2	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2
REP3	A1B1	A1B2	A2B1	A2B2

Anexo 3: Escala gráfica de la severidad de hongos para orquídeas. Merchan B (2012).

E1 0,1 – 1,9

E2 2,0 – 7,9

E3 8 a 17,9

E4 18 a 41,9

E5 42 a 78%



Elaborada en base al área afectada.

E1 = Valor escalar 1.

0,1 – 1,9 = Rango de porcentajes.