UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Caracterización morfológica, molecular y patogénica de *Pestalotiopsis* sp. Agente causante de la enfermedad del clavo en la guayaba *Psidium guajava* L. y evaluación in-vitro de biofungicidas.

Andrés Fernando Solarte Quintero

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias agropecuarias
Palmira, Colombia
2014

Caracterización morfológica, molecular y patogénica de *Pestalotiopsis* sp. Agente causante de la enfermedad del clavo en la guayaba (*Psidium guajava*) y evaluación in-vitro de biofungicidas.

Andrés Fernando Solarte Quintero

Tesis de investigación presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Agropecuarias.

Directora: **Elizabeth Álvarez**
Ph.D Fitopatóloga
Codirector: **Carlos Germán Muñoz**
Ph.D Fitomejorador

Protección de Cultivos

Patología de Yuca y Frutas tropicales CIAT.

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Palmira, Colombia
2014

“ A Dios y a mis padres Elvia Rosa y Moisés Por su apoyo incondicional, la fuerza, el aliento y el amor….”

Agradecimientos

Al Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT y a Oped Found for International development, OFID, por la oportunidad de desarrollar este proyecto y por la financiación.

A la Dra. Elizabeth Álvarez, por su confianza, orientación, conocimientos y la oportunidad recibidos.

Al profesor Carlos Germán Muñoz por su orientación, apoyo y conocimientos.

A mis compañeros de laboratorio Lederson, Germán, Juan Manuel, Michael, Viviana, Fabián, María José, Zulma y Nedy, quienes me brindaron un apoyo enorme para la elaboración y culminación de este trabajo.

A Natalia Andrea Mendoza, por su amor y su apoyo.

A mis hermanas Victoria y Diana, por su cariño y apoyo.

A todos los agricultores, personas y asociaciones que apoyaron con invaluables conocimientos, información, logística, muestras vegetales; en cada una de las regiones encontramos grandiosos seres humanos, siempre amables y cálidos.

A Sajeewa S. N. Maharachchikumbura por sus consejos y recomendaciones.

Resumen

Psidium guajava L (Guayaba), es una especie de árbol frutal de gran importancia económica a nivel mundial debido a su exquisito aroma y sabor, a sus propiedades alimenticias y medicinales, se cultiva principalmente en Asia, América Central y Hawái. Esta especie es afectada por enfermedades como Roya, Antracnosis y Pestalotiopsis (clavo de la guayaba); sin embrago, es la última la que se reporta frecuentemente a nivel mundial como la más limitante, es causada por *Pestalotiopsis* spp. y ocasiona lesiones en los frutos y pérdida de su calidad y valor comercial. En este trabajo se estudió la caracterización de aislamientos de *Pestalotiopsis* spp*.,* asociados a la enfermedad del clavo de la guayaba en las variedades más importantes cultivadas en Colombia, se analizó la morfología, patogenicidad y diversidad genética usando cebadores Ap-PCR y análisis de genes múltiples de las regiones ITS, β-tubulina y *Tef-1*. Se determinó que los aislamientos poseen una alta diversidad genética, patogénica y morfológica, y que dicha diversidad, no está relacionada con la procedencia, cultivar o tejido de donde fueron aislados. De 69 aislamientos incluidos en el análisis de genes múltiples, se encontró por lo menos 13 especies diferentes.

Palabras clave: Multilocus, *Pestalotiopsis*, filogenia, ITS, β-tubulina, *Tef-1*, Agresividad.

Abstract

Psidium guajava L. (Guava), is a species of fruit tree of great economic importance worldwide due to its exquisite aroma and flavor and nutritional and medicinal properties, is grown mainly in Asia, Central America and Hawaii. This species is affected by diseases such as rust, anthracnose and Pestalotiopsis (guava scrab disease), it is reported worldwide as the most limiting disease caused by *Pestalotiopsis* spp. and causes injuries and loss of fruit quality and commercial value. In this paper the characterization of isolates of *Pestalotiopsis* spp. In this study, its association with nail disease of guava in the major varieties grown in Colombia, morphology, pathogenicity and genetic diversity were analyzed using primers Ap-PCR and analysis of multiple genes ITS regions, β-tubulin and *Tef-1*. It was determined that have isolates a high genetic, morphological and pathogenic diversity and that this diversity is not related to the origin, cultivar or tissue from which they were isolated. Of 69 isolates included in the multiple genes analysis, were found at least 13 different species.

Keywords: Multilocus, *Pestalotiopsis*, phylogeny, ITS, β-tubulin, *Tef-1*, Virulence

Tabla de contenido.

Lista de figuras. 11

Lista de tablas. 13

Lista de Anexos. 14

1. Introducción. *15*

1.1 Aspectos generales del género Psidium. 17

1.1.1 Origen, importancia y distribución. 17

1.1.2 Clasificación taxonómica. 18

1.2 Aspectos generales del patógeno Pestalotiopsis spp.. 19

1.2.1 Biología de *Pestalotiopsis* spp. 19

1.2.2 Distribución geográfica. 20

1.2.3 Taxonomía. 20

1.2.4 Clasificación taxonómica. 21

1.2.5 Identificación del patógeno. 22

1.2.6 Pestalotiopsis en guayaba. 23

1.2.7 Síntomas. 24

1.2.8 Epidemiologia. 25

3. Objetivos. *26*

3.1 Objetivo General. 26

3.2 Objetivos específicos. 26

4. Metodología *27*

4.1 Colecta del material vegetal. 27

4.2 Aislamiento del hongo. 29

4.3 Cultivos monospóricos. 30

4.4 Caracterización morfológica. 31

4.4.1 Caracterización macroscópica. 31

4.4.2 Caracterización microscópica. 32

4.5 Caracterización patogénica. 32

4.5.1 Preparación del inóculo. 33

4.5.2 Obtención de frutos. 33

4.5.3 Montaje de ensayos. 33

4.5.4 Diseño experimental. 34

4.6 Extracción de ADN. 35

4.7 Evaluación de variabilidad por Ap-PCR. 36

4.8 Análisis filogenético de genes múltiples. 37
4.8.1 Limpieza de los productos de PCR. 38
4.8.2 Análisis de la secuencia. 39
4.8.3 Análisis filogenético. 39

4.9 Evaluación *in-vitro* de Biofungicidas. 40
4.9.1 Montaje del ensayo. 40
4.9.2 Diseño experimental. 40
4.9.3 Preparación de extractos. 41

5. Resultados y Discusión. 42

5.1 Aislamiento del hongo. 42

5.2 Pruebas de patogenicidad. 46

5.3 Caracterización morfológica. 55
5.3.1 Caracterización macroscópica. 55
5.3.2 Caracterización microscópica. 65

5.4 Evaluación de variabilidad por Ap-PCR. 69

5.5 Análisis filogenético de genes múltiples. 71

5.6 Pruebas de inhibición de crecimiento. 77

6. Conclusiones. 81

7. Bibliografía 82

Lista de figuras.

Figura 1. **Distribución geográfica del cultivo de la guayaba. 18**

Figura 2. **Distribución geográfica de *Pestalotiopsis* spp. 20**

Figura 3. **Lesiones en frutos de guayaba.. ..... 23**

Figura 4. **Síntomas de *Pestalotiopsis* spp. sobre frutos de guayaba.. ..... 24**

Figura 5. **Zonas de muestreo de material vegetal afectado por *Pestalotiopsis* spp.. 28**

Figura 6. **Signos identificados en las muestras colectadas 29**

Figura 7. **Aislamiento del patógeno 30**

Figura 8. **Colonia típica de *Pestalotiopsis* sp. 32**

Figura 9. **Conidias típicas de *Pestalotiopsis* sp. 32**

Figura 10. **Montaje de las pruebas de patogenicidad 35**

Figura 11. **Frutos en diferente estado de desarrollo cv. Regional Roja afectados por *Pestalotiopsis* sp. 42**

Figura 12. **Colección de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp..... 45**

Figura 13. **Progreso de lesiones en frutos de guayaba cv. Pera (ICA 1) inoculados con 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. 47**

Figura 14. **Diferentes grados de agresividad. 49**

Figura 15. **Agresividad de los aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. 52**

Figura 16. **Análisis de cluster de aislamientos de *Pestalotiopsis* en función de ABCDL.**

Figura 17. **Gráfica de regresión lineal resultado de la correlación entre ABCDL (eje Y) y DL (eje X). 54**

Figura 18. **Morfotipo 1, Vista frontal y posterior. 56**

Figura 19. **Morfotipo 2, Vista frontal y posterior. 56**

Figura 20. **Morfotipo 3, Vista frontal y posterior. 57**

Figura 21. **Morfotipo 4, Vista frontal y posterior. 57**

Figura 22. **Morfotipo 5, Vista frontal y posterior. 58**

Figura 23. **Morfotipo 6, Vista frontal y posterior. 58**

Figura 24. **Morfotipo 7, Vista frontal y posterior. 59**

Figura 25. **Morfotipo 8, Vista frontal y posterior. 59**

Figura 26. **Morfotipo 9, Vista frontal y posterior. 60**

Figura 27. **Aislamiento con dos morfologías diferentes en una misma caja de petri. 64**

Figura 28. **Coloraciones en la conidia de *Pestalotiopsis* sp. 65**

Figura 29. **Perfiles electroforéticos de la amplificación de ADN de Pestalotiopsis spp. de guayaba con el cebador CGA. 69**

Figura 30. **Filograma radial generado con el método UPGMA basado un coeficiente DICE de 75%, calculado con los datos combinados de cinco cebadores Ap-PCR de la estructura genética de los 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. 70**

Figura 31. **Gap en la región ITS ubicado entre la base 72 y la 135 ..... 73**

Figura 32. **Filograma consenso generado con el software Mr. Bayes, usando la combinación de las secuencias ITS, β-tubulina y *Tef-1* de 70 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. obtenidos a partir de guayaba y secuencias de 22 especies epitificadas, *Seiridium sp.* fue usado como outgroup. 75**

Figura 33**. Inhibición de crecimiento de extractos de Fique y Swinglea..... 78**

Lista de tablas.

Tabla 1. Características Geo-Climáticas de los municipios muestreados. 27
Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificación de regiones 38
Tabla 3. Aislamientos de *Pestalotiopsis* spp., obtenidos a partir diferentes variedades de *Psidium guajava*. 43
Tabla 3. Categorías y frecuencias de Agresividad de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. 49
Tabla 5. Agresividad expresada como área bajo la curva del progreso de la lesión y diámetro final de la lesión de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis.* 51
Tabla 6. Caracterización morfológica de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* sp. 61
Tabla 7. Caracterización microscópica de aislamientos de *Pestalotiopsis* sp. 66
Tabla 8. Especies epitificadas de *Pestalotiopsis* usadas en este estudio. 71
Tabla 9. Prueba de rango múltiple para pruebas de inhibición de crecimiento. 79
Tabla 10. Porcentaje de inhibición de extractos de Fique y Swinglea. 80

Lista de Anexos.

Anexo A. **Listado de aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. con datos de pasaporte……..86**

Anexo B. **Prueba de medias de Agresividad asociando ABCDL y DL (ABCDL/DL)……88**

Anexo C**. Coeficiente de correlación entre ABCDL y DL……..90**

Anexo D**. Separación de medias de tasa de crecimiento de *Pestalotiopsis* spp. en medio de cultivo…….……91**

Anexo E. **Prueba de medias Relación Largo Ancho (Largo/Ancho) de las conidias de *Pestalotiopsis* spp……..93**

Anexo F. **Datos de agrupamiento de análisis de diversidad con marcadores Ap-PCR con el método UPGMA en el software DARwin5…….……95**

Anexo G**. Separación de medias para pruebas de inhibición de crecimiento usando extractos vegetales……..…102**

1. Introducción.

El guayabo *Psidium guajava* L. es un árbol perteneciente al género *Psidium,* que se caracteriza por agrupar pequeños árboles de hasta 10 m. de altura (Pérez *et al.,* 2008), el guayabo tiene su centro de origen en el continente Americano, entre México y Perú, ya que allí es donde se encuentra de manera silvestre y con mayor diversidad genética; se cultiva en casi todos los países tropicales y subtropicales (Pérez *et al.,* 2008); en suelos con diferentes texturas y drenaje, con un rango de pH entre 4.5 a 9.4, zonas de alta precipitación media anual y puede soportar condiciones de sequía (Keith *et al.,* 2006).

En Colombia la guayaba se consume generalmente en fresco, abarcando un 4.9 % del consumo total de frutas en las zonas urbanas (Plan Frutícola Nacional, 2004). A nivel nutricional, se ha destacado como una fuente de calcio, hierro y fósforo, (Pachanawan *et al.,* 2008), provee excelentes propiedades alimenticias ya que posee calcio, fósforo, hierro, vitamina A, B3 y ácido ascórbico 3 aminoácidos esenciales: triptófano, lisina y metionina; además de tiamina, rivoflavina, niacina (Pérez. 2008).

En el 2012, el cultivo de guayaba ocupó el sexto lugar de los frutales con mayor área cultivada en Colombia, con alrededor de 9000 Has. en las cuales se produce 143.000 t. (Agronet, 2014), es de gran importancia socioeconómica, ya que contribuye con la generación de empleos, por ejemplo, en La Hoya del río Suarez, ubicada entre el sur de Santander y el norte de Boyacá, el cultivo demanda aproximadamente 4556 empleos directos y 300 empleos indirectos (Rodríguez y Rangel 2005). En Colombia la guayaba es consumida en fresco o procesada como pulpa para jugos, bocadillos y mermeladas, además, tiene gran importancia en el mercado local como fruta en fresco y procesada; tiene gran potencial de exportación, debido a las bondades alimenticias, aromáticas y a su sabor. La producción de guayaba posee varias limitantes entre las que se encuentran las plagas y enfermedades que afectan a este cultivo.

Pestalotiopsis es la enfermedad más importante y limitante; ésta afecta frutos, hojas y brotes (Buriticá 1999), es causada por el hongo *Pestalotia* spp. (Morera y Blanco 2009) y/o *Pestalotiopsis* spp. (Keith *et al.,* 2006). Los primeros síntomas visibles de la enfermedad inician con pequeñas manchas de color café, que se desarrollan con el tiempo hasta formar costras de textura corchosa en la superficie del fruto con la apariencia de la cabeza de un clavo oxidado, las lesiones coalescen hasta formar una gran lesión que cubre parte de la superficie del fruto llegando hasta la pulpa y puede finalmente deformarlo.

Farfán *et al.,* (2006) encontraron que *Pestalotia* sp. se encuentra ampliamente distribuido por la Hoya del rio Suarez y encontró que en el municipio de Vélez es donde más frutos afectados se encuentran en los periodos de transición de la época seca a la lluviosa (90,6%) y de la época lluviosa-seca (93,1%).

De Notaris fue quien inicialmente describió a *Pestalotia* como un nuevo género en 1839, inicialmente esta especie se caracterizaba por tener una conidia fusiforme compuesta de seis células y apéndices en los extremos apical y basal; Posteriormente Steyaert dividió el género en tres, de acuerdo al número de células que componían las conidias; *Pestalotia, Pestalotiopsis y Truncatella* con 6, células 5 y 4 respectivamente; esta última es la clasificación más usada en la actualidad por los taxónomos para su identificación (Maharachchikumbura *et al.,* 2012, 2013, Zhang *et al.* 2013, Geng *et al.,* 2013).

En la actualidad no hay estudios que identifiquen que especies de *Pestalotiopsis* spp. que afectan el cultivo de la guayaba en Colombia y a nivel mundial no se han caracterizado con las nuevas técnicas, como por ejemplo, el análisis de genes múltiples, de igual manera, tampoco se ha estudiado la distribución del patógeno por las principales zonas productoras del país; por ello, este tipo de estudios son necesarios para establecer medidas eficaces de control y manejo, además de programas de mejoramiento.

El uso de biofungicidas a partir de extractos ya ha sido reportado por investigadores como alternativa al control de hongos fitopatógenos en diferentes cultivos, Parada (2005), encontró muy buen control por parte del extracto de hojas de eucalipto para

Pestalotiopsis en guayaba; Prapagdee *et al.,* (2012), obtuvo buen control de *Colletotrichum gloeosporioides*, en orquídeas usando compuestos obtenidos a partir de bacterias antagonistas. Los estudios descritos, y reportes científicos, demuestran que el uso de biofungicidas es una alternativa importante que puede contribuir en el manejo integrado de Pestalotiopsis en los cultivos de guayaba y permitiría disminuir el uso de productos de síntesis química.

En este estudio se caracterizó la morfología, la patogenicidad y la filogenia de diferentes aislamientos de *Pestalotiopsis* spp., colectado en diferentes regiones de Colombia, se evaluó la diversidad del patógeno y se determinó el efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento micelial del patógeno en condiciones de laboratorio.

1.1 Aspectos generales del género *Psidium*.

1.1.1 Origen, importancia y distribución.

Psidium es un género originario de América tropical entre México y Brasil, algunos investigadores determinaron como centro de origen a Centroamérica específicamente Costa Rica, Guatemala y México; otros sugieren como centro de origen Colombia, Perú y Ecuador; el género *Psidium* pertenece a la familia de las Mirtáceas, que agrupa alrededor de 150 géneros y más de 5650 especies (Morra *et al.,* 2012). Las plantas pertenecientes al género *Psidium* se caracterizan por producir frutos globosos, ovoides con un exquisito aroma y sabor.

Desde la época precolombina, en América, la guayaba ya era usada medicinalmente por algunas culturas indígenas (Pérez *et al.,* 2008); sus propiedades medicinales y alimenticias han sido estudiadas en los últimos años (Pérez *et al.,* 2008, Pachanawan *et al.,* 2008, Begum *et al.,* 2002, Morra *et al.,* 2012), estos estudios han revelado propiedades antibióticas en contra de infecciones intestinales (Pachanawan *et al.,* 2008) y gran contenido de vitaminas A, B, C, además de calcio, zinc, fósforo y hierro (Morra *et al.,* 2012).

La guayaba se siembra en la mayor parte de países tropicales y sub tropicales (Pérez *et al.,* 2008), siendo los principales productores en el mundo India, Pakistán, México, Brasil, Egipto, Tailandia, Colombia, Indonesia, Venezuela, Sudan, Bangladesh, Vietnam, Malasia, Perú, Ecuador, Estados Unidos, Costa Rica, Cuba y Sur África (Figura 1) (Pommer y Murakami, 2009).

Figura 1. Distribución geográfica del cultivo de la guayaba.

1.1.2 Clasificación taxonómica.

El género *Psidium* pertenece al:

Súper reino: Eukaryota
Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Orden: Myrtales
Familia: Myrtaceae
Subfamilia: Myrtoideae
Tribu: Myrteae
Género: *Psidium*

1.2 Aspectos generales del patógeno *Pestalotiopsis* spp..

1.2.1 Biología de *Pestalotiopsis* spp.

Pestalotiopsis pertenece a la familia Amphisphaeriaceae*,* se caracteriza por presentar conidias con cinco células, apéndices apicales y basales, siendo estas características las más usadas en la sistemática para el género, ya que las células medias presentan diferente patrón de pigmentación, y el número de apéndices apicales varía entre dos y cuatro (Jeewon *et al.,* 2003), son comúnmente patógenos vegetales en zonas con climas tropicales (Maharachchikumbura *et al.,* 2011), también son aislados frecuentemente como endófitos (Tejesvi *et al.,* 2007) y algunos saprófitos que se han aislado del suelo, hojas; unas pocas especies están relacionados con la descomposición de madera, papel y lana (Guba, 1961).

Pestalotiopsis spp. se encuentra generalmente en su estado anamorfo ó imperfecto; solo 20 especies de las 235 descritas hasta ahora se les conoce su estado teleomorfo ó perfecto *Pestalosphaeria* (Maharachchikumbura *et al.,* 2011).

Algunas especies de *Pestalotiopsis* han adquirido mucha importancia en los últimos años, ya que se ha descubierto que producen gran cantidad de metabolitos secundarios de importancia (Maharachchikumbura *et al.,* 2011, Tejesvi *et al.,* 2007), por ejemplo: *P. versicolor* produce celulosa, *P microspora* produce isobenzofuranona que posee actividad antifúngica y antioxidante (Strobel *et al.,* 2002). El ácido ambuico, la pestacina e isopestacina aislada de *Pestalotiopsis* poseen actividad antifúngica contra *Pythium ultimum*. Adicionalmente, la jesterona e hidroxilo jesterona son producidas por *P. jesteri,* patógeno aislado de un árbol medicinal del género *Terminalia* (Tejesvi *et al.,* 2007).

Las especies patógenas de *Pestalotiopsis* generalmente no se especializan en una sola planta, género ó familia; muchas de ellas son cosmopolitas (Keith *et al*., 2006, Hopkins and McQuilken 2000), algunas especies se han reportado afectando dos ó más especies vegetales a veces sin relación filogénica; en algunos casos especies de

Pestalotiopsis se han reportado como endófitas en unos cultivos y en otros como patógenos.

1.2.2 Distribución geográfica.

Diferentes especies de *Pestalotiopsis* han sido reportadas en estudios alrededor del mundo, principalmente como patógeno vegetal en países tropicales y sub-tropicales; ha sido asociado a cultivos en varios países, y su distribución es amplia, encontrándose en Estados Unidos, Canadá, Argentina, Chile, Brasil, Italia, Francia, Alemania, Holanda, Portugal, Japón, India y Australia (Maharachchikumbura *et al.,* 2011), Colombia (Insuasti, 2008), Costa Rica (Morera y Blanco 2009), Hawai (Keith *et al.,* 2006) (Figura 2).

Figura 2 Distribución geográfica de *Pestalotiopsis* spp.

1.2.3 Taxonomía.

De Notaris fue el primero en introducir el género *Pestalotia* en 1839, las primeras especies descritas se caracterizaban por tener conidias compuestas por seis células, las cuatro centrales pigmentadas, las células apical y basal hialinas; posteriormente en 1949 Steyaert, introdujo dos nuevos géneros, *Truncatella* caracterizado por especies

con conidias de 4 células y *Pestalotiopsis*, especies con conidias de 5 células; esta clasificación es la más usada en la actualidad.

Por otro lado Guba, en su monografía "*Monochaetia* and *Pestalotia*" (1961), los clasificó de acuerdo al número de células de la conidia así: *Quadriloculatae, Quinqueloculatae y Sexloculatae*, con 4, 5 y 6, respectivamente, además las subdividió de acuerdo a la pigmentación y al número y posición de los apéndices unificando a los géneros propuestos por Steyaert, *Truncatella y Pestalotiopsis,* dentro de *Pestalotia*, (Maharachchikumbura *et al*., 2011).

En general, las características de la conidia tales como largo, ancho, pigmentación de las células medias son usadas para la descripción de la especie (Jeewon *et al.,* 2003), también el número y longitud de los apéndices apicales y el basal; además de las subdivisiones y ramificaciones de los apéndices apicales (Maharachchikumbura *et al.,* 2011).

Se evidencia que la taxonomía de este género abarca diferentes aspectos y no pueden diferenciarse claramente los aislamientos a nivel morfológico, por ello, para identificarlos a nivel de especie, es necesario el uso de herramientas moleculares que facilitan el estudio filogenético y su clasificación en Taxas mejor definidas.

1.2.4 Clasificación taxonómica.

El género *Pestalotiopsis* pertenece al:

Reino: Fungí
Sub-Reino; Dikarya
Filo: Ascomycota
Sub-Filo: Pezizomycotina
Clase: Sordariomycetes
Subclase: Xylariomycetidae
Orden: Xylariales
Familia: Amphisphaeriaceae
Género: *Pestalosphaeria* (anamorfo *Pestalotiopsis*)

1.2.5 Identificación del patógeno.

La taxonomía de *Pestalotia, Pestalotiopsis y Truncatella* es difícil ya que las características morfológicas usadas para el propósito de identificación y clasificación como número y posición de las setas y patrón de pigmentación, Longitud y ancho, siempre tienen excepciones por lo cual estas características varían en muchas especies que tienen relación filogénica; convirtiéndose así, mas en una herramienta de apoyo a las técnicas de biología molecular. Por lo tanto usar solo caracteres morfológicos no es suficiente.

Joshi y colaboradores (2009) estudiaron la diversidad genética del género *Pestalotiopsis* en el cultivo de té, *Camellia sinensis* en el sur de la India, lograron obtener 42 aislamientos de varias localidades al sur del país y evaluaron la diversidad genética del patógeno comparando dos técnicas (RAPD e ISSR). Ellos observaron que de los 42 aislamientos, 22 poseían características morfológicas y genéticas diferentes. En otro estudio, Keith y colaboradores (2006) encontraron diferentes especies de *Pestalotiopsis* afectando guayaba, en Hawái, entre las más importantes se encuentran *P. microspora*, *P. clavispora*, *P.* sp. GJ-1 y *P. disseminata* (Thum.) Estas especies se identificaron usando los cebadores correspondientes a las regiones ITS1 e ITS4.

Hu y colaboradores en (2007) demostraron que el gen ITS, es mucho menos informativo para diferenciar especies de *Pestalotiopsis* que el gen β-tubulina (Maharachchikumbura *et al.,* 2011). Maharachchikumbura y colaboradores (2012) desarrollaron un análisis multilocus que involucra el uso de los cebadores para la amplificación parcial del gen β-tubulina (BT2A y BT2B) y el factor de elongación (*tef*1) amplificados por medio de PCR; en este estudio se caracterizaron 13 nuevas especies de *Pestalotiopsis*.

1.2.6 Pestalotiopsis en guayaba.

El clavo de la guayaba es causada por hongos del género *Pestalotia* y *Pestalotiopsis*, los cuales se caracterizan principalmente por tener conidias divididas en cuatro, cinco y seis septos, siendo características casi generales, las células medias con diferente patrón de pigmentación, la células apical y basal de la conidia generalmente hialinas y con terminación en punta; de las células apical y basal se desprenden uno o varios apéndices, dependiendo del género y la especie (Maharachchikumbura *et al*., 2011).

Esta enfermedad se ha reportado en varios países productores de guayaba como por ejemplo en México (Morera y Blanco 2009), India, Australia (Jeewon *et al.,* 2003) Estados Unidos (Hawái). Estudios preliminares han señalado a *Pestalotia psidii*, *Pestalotiopsis versicolor*, *P*. *microspora*, *P*. *clavispora* (Keith *et al*., 2006) como el agente causante de la enfermedad en la guayaba.

El clavo se presenta con mayores severidad consecuencias en condiciones de humedad y temperatura altas; Keith y colaboradores (2006), encontraron que las lesiones sobre los frutos (Figura 3) (costras, clavos) se forman a temperaturas entre (25 y 35ºC) y humedades relativas entre 80 y 100%.

a b

Figura 3. Lesiones en frutos de guayaba. a) Individuales, b) Coalescentes.

1.2.7 Síntomas.

Pestalotiopsis es una enfermedad que ataca la epidermis del fruto; se caracteriza por la formación de acérvulos opacos, subepidérmicos (Insuasty *et al.,* 2006). La especie *Pestalotia* sp. Inicia la infección como una mancha de color marrón, que al crecer, se convierte en un círculo gris con un borde marrón oscuro (Keith *et al.,* 2006), en esta etapa la lesión, tiene un aspecto levantado por la presencia de acérvulos bajo la epidermis del fruto que se rompe dándole a la lesión una textura corchosa. Finalmente el tejido se necrosa formando una costra generalmente redonda (Figura 4), con su perímetro marcado por una depresión, esto le da al conjunto un aspecto de un clavo oxidado, de ahí su nombre.

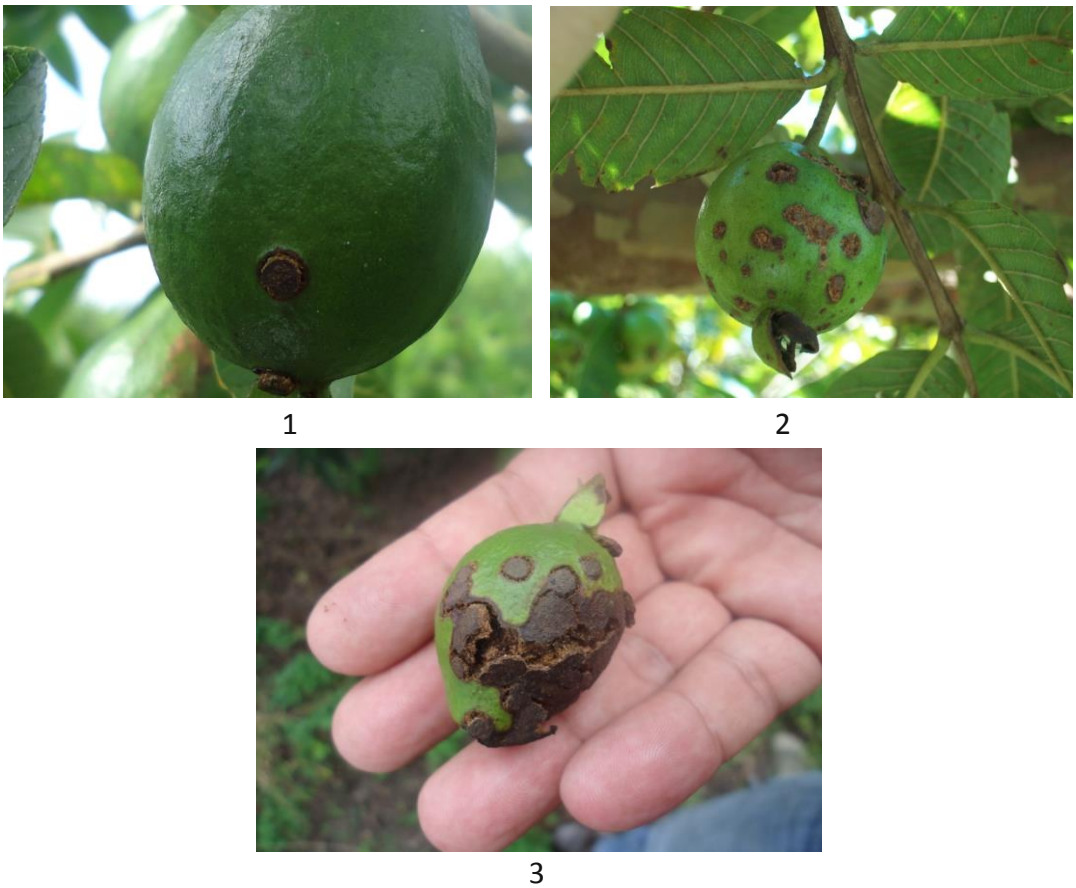


Figura 4. Síntomas de *Pestalotiopsis* spp. sobre frutos de guayaba. 1) Fruto con una sola lesión, 2) Fruto con lesiones múltiples, 3) Fruto con lesiones múltiples coalescentes, parcialmente momificado.

1.2.8 Epidemiología.

Varios autores han reportado que, Pestalotiopsis se presenta con mayor incidencia en condiciones de humedad entre 80 y 100% y temperaturas entre 25 y 35º C; Keith y colaboradores (2006), mencionan que la enfermedad ataca frutos en todos los estadios de desarrollo, ya que el patógeno aparece en el epicarpio cuando el fruto es pequeño y progresa a medida que éste crece, también se encuentra en hojas cuando no hay cosecha. Las especies patógenas de *Pestalotiopsis* inicialmente hacen contacto con el hospedero cuando se produce la infección (inóculo), probablemente por medio de las conidias o esporas fragmentadas; las esporas de *Pestalotiopsis* se consideran esporas secas. Watanabe y colaboradores (2000) estudiaron la adhesión de las conidias y la germinación de las esporas de *P. neglecta* y demostraron que la infección se produce en cuatro etapas. Al principio, las esporas bajas del centro germinan y se adhieren firmemente al sustrato. El ciclo del hongo se presenta completo en su hospedero hasta que las esporas son dispersadas por el agua y el viento (Maharachchikumbura *et al*., 2011).

3. Objetivos.

3.1 Objetivo General.

Identificar y caracterizar morfológica, patogénica y molecularmente, aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. agente causante de la enfermedad del clavo de la guayaba y evaluar la efectividad de diferentes extractos vegetales en el crecimiento del patógeno.

3.2 Objetivos específicos.

- Evaluar la diversidad de *Pestalotiopsis* spp. y caracterizar la morfología, patogenia y filogenia del agente causante de la enfermedad del clavo en la guayaba, aislado de diferentes regiones de Colombia.

- Evaluar el efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento micelial en condiciones de laboratorio.

4. Metodología

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio del programa de Patología de yuca y frutas tropicales del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira.

4.1 Colecta del material vegetal.

Con el objetivo de obtener la mayor cantidad de aislamientos a partir de las lesiones típicas de la enfermedad, se hicieron muestreos en tres importantes zonas productoras del País con marcadas diferencias agroecológicas; para ello se escogieron los departamentos de Boyacá (Briseño, Pauna y Tununguá), Santander (Barbosa, Puente Nacional, San Benito y Vélez) y Valle del Cauca (La Unión, Roldanillo y Toro) (Figura 5) (Tabla 1).

Tabla 1. Características Geo-Climáticas de los municipios muestreados.

Departamento	Municipio	Altura m.s.n.m.	HR (%)	Temperatura (ºC)	Precipitación anual (mm)
	Vélez	2.150	70	17	1,886
Santander	**Barbosa**	1.610	87,9	21	1,900
	San Benito	1.200	-	21	1,700
	Pauna	1.215	88,5	22	1,800
Boyacá	**Tunungúa**	1.246	-	26	-
	Briseño	1.500	80	20	-
	Roldanillo	996	72	23	1,000
Valle	**La Unión**	975	75	24	1,000
	Toro	950	73	23	1,000

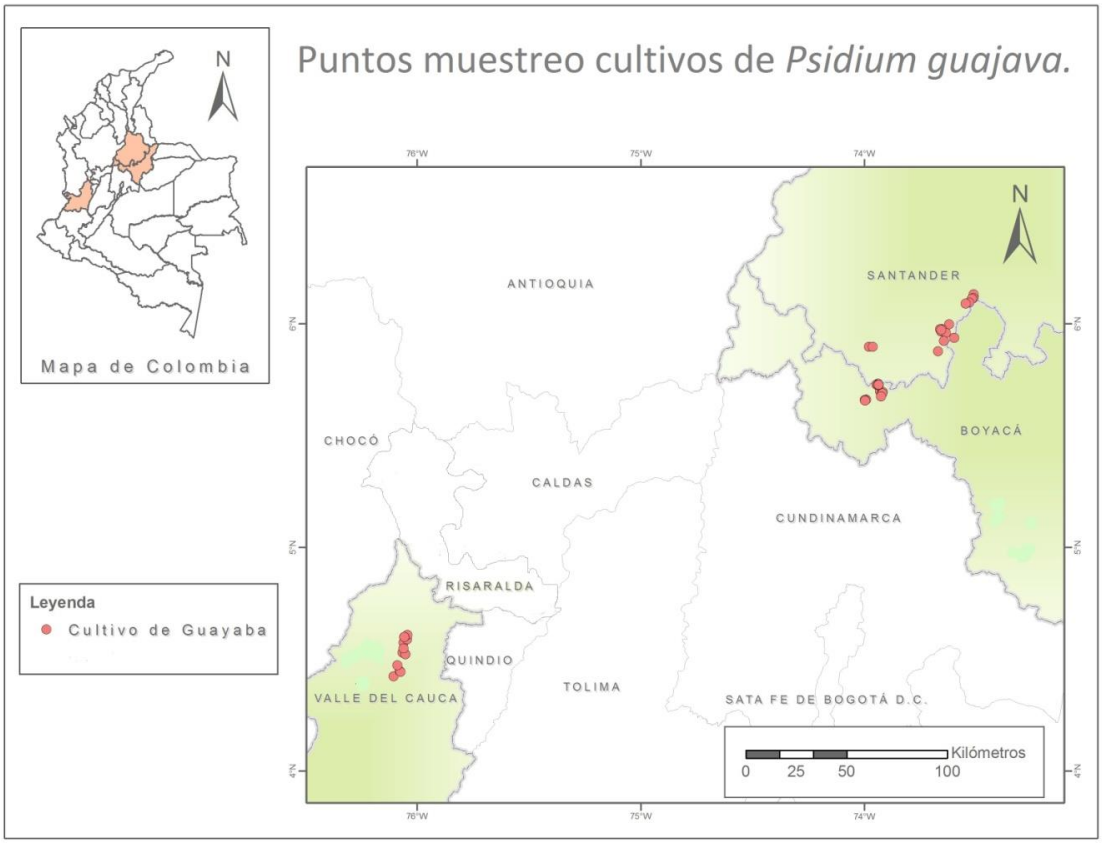


Figura 5. Zonas de muestreo de material vegetal afectado por *Pestalotiopsis* spp.

Se colectaron muestras de diferentes variedades con signos de Pestalotiopsis en hojas (Figura 6) y frutos, para un total de 520 muestras en 50 fincas. El tejido se empacó en bolsas de papel, se almacenó en nevera de poliestireno expandido y se conservó a una temperatura de 4°C. Bajo estas condiciones se mantuvo hasta el inicio del aislamiento del hongo, con el fin de evitar su deterioro y facilitar el aislamiento del patógeno.

a

b

c d

Figura 6. Signos identificados en las muestras colectadas a) *Pestalotiopsis* sp. en hojas de guayabo; b) signos en fruto de guayaba; c) signos tempranos de *Pestalotiopsis* spp. en fruto de guayaba; d) signos avanzados de *Pestalotiopsis* spp. en frutos de guayaba.

4.2 Aislamiento del hongo.

Se cortaron fragmentos de aproximadamente 3 a 5 mm^2 de tejido sano y tejido de frutos de todos los estados de desarrollo afectados por la enfermedad (Figura 6-a), estos se lavaron durante 10 min. en chorro de agua limpia constante; posteriormente se lavaron 1 min. con alcohol al 70%, inmediatamente después se enjuagaron con hipoclorito de sodio al 1% y se enjuagaron 2 veces con agua estéril por un periodo de un minuto. Luego se dejaron secar sobre papel toalla estéril y se sembraron en medio PDA + Acido láctico. Finalmente, se incubaron a 22 ± 1 ºC (Temperatura ambiente del laboratorio) hasta que el crecimiento fue suficiente para identificarlos morfológicamente, se uso la guía ilustrada de géneros para hongos imperfectos de Barnett y Hunter 4th edición (1998) (Figura 6-b y c).

Después de identificar morfológicamente el aislamiento como *Pestalotiopsis* spp. se procedió a purificar el cultivo para obtener los cultivos monoconidiales ó monospóricos.

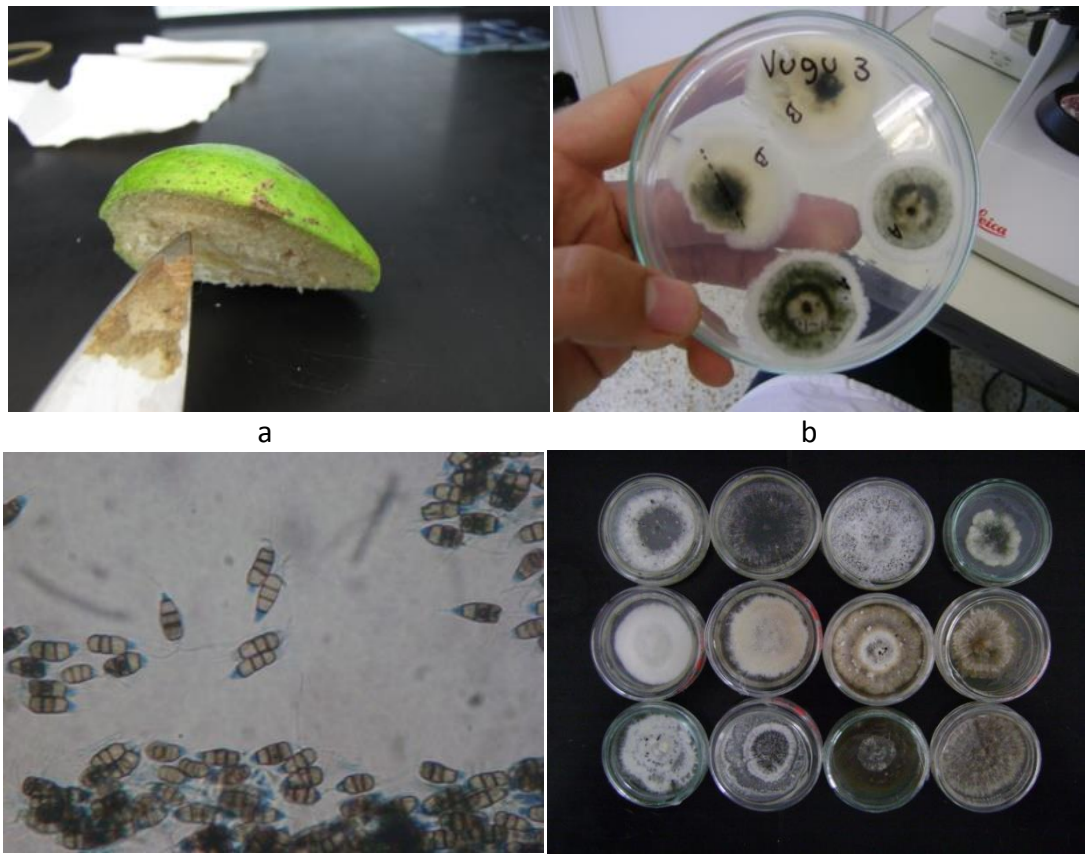


Figura 7. Aislamiento del patógeno a) procesamiento de muestras; b) Caja petri con aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. sin purificar; c) Conidias de *Pestalotiopsis* spp.; d) Cultivos monospóricos de *Pestalotiopsis* spp..

4.3 Cultivos monospóricos.

Para obtener los cultivos monospóricos (Figura 7-d) de cada uno de los aislamientos, se partió de un aislamiento puro y esporulado de *Pestalotiopsis* spp., primero se tocó uno de los acérvulos que están sobre la colonia con una aguja; luego sobre una caja de Petri con medio Agar-agua se lavó la punta de la aguja con una gota de agua estéril y se procedió a esparcir la gota en la superficie del medio usando un asa triangular de vidrio; observando al microscopio estereoscópico se identificó una sola conidia y se cortó un fragmento de medio, asegurándose que solo llevara una espora, este fragmento se sembró en una caja de petri con medio PDA con ácido láctico, para inhibir el crecimiento de bacterias y se incubó a 22 ±1 ºC.

4.4 Caracterización morfológica.

Se evaluó la morfología de los aislamientos de *Pestalotiopsis* spp., obtenidos de muestras provenientes de campo, de los departamentos de Boyacá, Santander y Valle del Cauca.

4.4.1 Caracterización macroscópica.

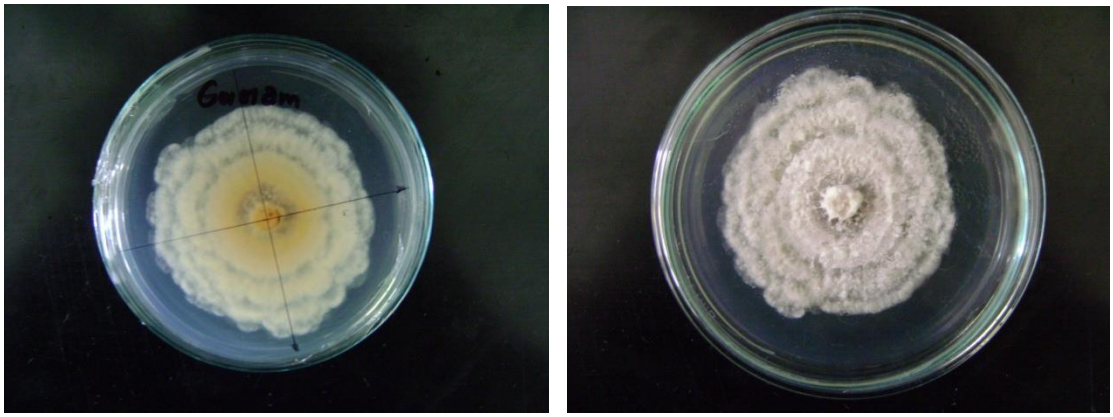
Los parámetros de caracterización macroscópica y microscópica se obtuvieron siguiendo los resultados de los estudios de Jeewon y colaboradores (2003), Keith y colaboradores (2006) y Liu y Colaboradores (2010) y recomendación de Sajeewa S. N. Maharachchikumbura.

De cada uno de los aislamientos obtenidos previamente crecidos sobre PDA, se tomó un disco de 6.5 mm. de diámetro con crecimiento de micelio y se transfirió sobre el centro de otra caja de petri con medio PDA. Las cajas fueron incubadas a 22 ± 1ºC con 12 horas luz y 12 horas oscuridad durante 6 días. Las variables evaluadas para la caracterización macroscópica fueron: velocidad de crecimiento, color frontal (Figura 8-b) y reverso de la colonia (Figura 8-a), tipo de crecimiento y presencia o ausencia de acérvulos.

El color de la colonia se estableció usando el predominante de la colonia de cada aislamiento.

Para determinar la tasa de crecimiento, los aislamientos se sembraron en PDA (39g/L) durante 5 días a 22°C ±1, se tomaron discos de 5 mm. de diámetro con micelio y se transfirieron a una caja nueva con medio PDA y se evaluó el crecimiento radial. Para la evaluación se hicieron observaciones diarias por 6 días. Para cada aislamiento se midió dos radios uno orientado norte sur y el otro oriente occidente, se hizo un análisis de varianza con un diseño complemente al azar con tres repeticiones. Los análisis se

hicieron usando el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS) versión 9.3. Con los datos obtenidos se determinó la velocidad de crecimiento, expresada como el valor de la pendiente (modificado de Keith, *et al.,* 2006).

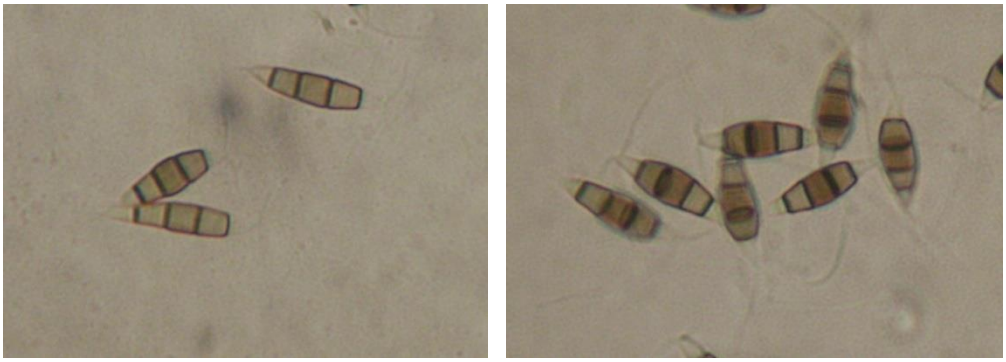


a b

Figura 8. Colonia típica de *Pestalotiopsis* sp. a) Vista posterior de colonia; b) Vista frontal de colonia.

4.4.2 Caracterización microscópica.

Se montaron placas de cada uno de los aislamientos a partir de cultivos de 10-12 días que presentaron estructuras jóvenes. Para la caracterización microscópica se usó un microscopio y únicamente se tuvo en cuenta la coloración de las células medias de la conidia, concolora (con las tres células del mismo color) o versicolora (las células medias con diferente coloración), el ancho y largo de las conidias y apéndices.



a b

Figura 9. Conidias típicas de *Pestalotiopsis* sp. a) Conidia de *Pestalotiopsis* spp. concolora. b) Conidia de *Pestalotiopsis* spp. versicolora; tomadas a 100X.

4.5 Caracterización patogénica.

Esta prueba se hizo principalmente para evaluar la capacidad de infección de cada aislamiento y medir su agresividad en frutos desprendidos de guayaba variedad Pera (ICA 1). Para el montaje de los ensayos se usó la metodología descrita por Keith y colaboradores (2006) solo para frutos, para medir la agresividad no se utilizó una escala de severidad y no fue posible obtener todos los frutos del mismo tamaño, por ello en la evaluación, solo se tuvo en cuenta el tamaño de las lesiones.

4.5.1 Preparación del inóculo.

Se sembraron los aislamientos en medio PDA y se incubaron a 22 ±1ºC a 12 h luz y 12 h oscuridad. Después de 16 días, se tomaron discos de 5.5 mm. de diámetro con micelio del hongo.

4.5.2 Obtención de frutos.

Las pruebas de patogenicidad se hicieron sobre frutos de guayaba pera (ICA 1), los frutos sanos fueron colectados en el mismo cultivo comercial durante todas las pruebas en estado de madurez fisiológica.

4.5.3 Montaje de ensayos.

Los frutos fueron sumergidos en una solución de alcohol al 70 % durante 1 min., posteriormente en hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min. Y finalmente lavados con agua estéril. En la cámara de flujo se hizo una herida sobre el fruto con un bisturí estéril de 10mm. de diámetro y 5mm de profundidad (Figura 10-a), la parte superior fue retirada; sobre la herida se colocó un disco de PDA con micelio del hongo (Figura 10-b) y se cubrió posteriormente con el fragmento de tejido que se retiró inicialmente; éste se fijó con parafilm para evitar la deshidratación del tejido (Figura 10-c). Los frutos se colocaron en cajas crisper sobre una lámina de agua estéril para mantener la

humedad y los frutos se mantuvieron en rejillas plásticas para evitar el contacto directo con el agua, las cajas se almacenaron a una temperatura de 22 ±1ºC a 12 h luz y 12 h oscuridad. Se evaluó el progreso de la lesión midiendo el radio cada 4 días por 12 días, se calculó el área bajo la curva del desarrollo de la lesión (*ABCDL*) y el diámetro final de la lesión (DL).

4.5.4 Diseño experimental.

Para las pruebas de patogenicidad se usó un diseño completamente al azar; cada aislamiento fue inoculado en tres frutos, siendo cada uno de ellos una repetición, los testigos fueron tres frutos inoculados con discos de PDA sin micelio. Los datos fueron analizados usando el paquete estadístico SAS versión 9.3, realizando un análisis de varianza, y una correlación entre las dos variables *ABCDL*, área bajo la curva del desarrollo de la lesión y DL, diámetro final de la lesión.

El cálculo del *ABCDL* se determinó mediante la siguiente ecuación.

$$\boldsymbol{ABCDL} = \sum_{i=1}^{n} \left(\frac{\mathbf{X}_i + \mathbf{X}_{i-1}}{\mathbf{2}}\right)(\mathbf{t}_i - \mathbf{t}_{i-1})$$

Donde:
X_i = Desarrollo de la lesión
T_i = Tiempo en días de la evaluación
n= Número de evaluaciones

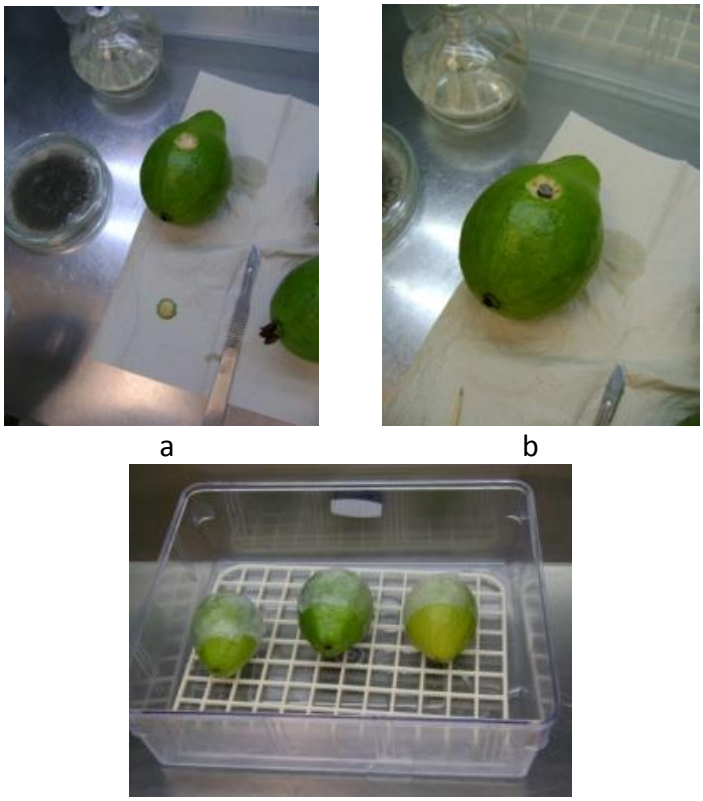


Figura 10. Montaje de las pruebas de patogenicidad. a) Herida artificial; b) Inoculación con disco con crecimiento micelial; c) Montaje en cámara húmeda.

4.6 Extracción de ADN.

Para la extracción de ADN se usó la metodología reportada por Damm y colaboradores (2008).

Se tomó un fragmento de micelio del hongo con cinco días de crecimiento sobre medio PDA y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1,5ml con 200 µl de buffer de extracción CTAB (0,2 M de Tris, 1,4 M de NaCl, 20 mM EDTA, 0,2g/l CTAB). El micelio se maceró usando micro pistilos estériles hasta pulverizarlo y la solución quedó turbia y se aforó a 600 µl; luego se incubó a 65ºC en baño de maría por 15 min y después se agregó 400 µl de cloroformo:isoamilalcohol (24:1) y se mezcló por inversión, inmediatamente después se centrifugó a 15800 gravedades por 5 min., se transfirió el sobrenadante (aprox. 500 µl) a un nuevo tubo y se agregaron 600 µl de isopropanol frio y 166 µl de

acetato de amonio 7.5 M frio para lograr una concentración final, de 2.5 M. Luego se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. y se centrifugaron a 15800 gravedades por 5 min., se descartó el sobrenadante rescatando únicamente el pellet y se adicionó 1 ml de etanol frio al 70% y nuevamente se centrifugó a 15800 gravedades por 5 min., se descartó el sobrenadante y finalmente el pellet se secó en una centrifuga al vacio a 37ºC durante 50 min..

Después de secar el pellet se re-suspendió en Buffer TE, se le agregó 1,5 µl de ARNasa y se incubó a 37ºC durante 30 min..

4.7 Evaluación de variabilidad por Ap-PCR.

Para el análisis mediante marcadores Ap-PCR se utilizaron los cebadores (CAG)5, (AGG)5, (GACA)4, (TCC)5, (GACAG)3 derivados de microsatelites o secuencias rápidas. Cada reacción (25 µl) estuvo conformada por 1X Máster Mix (Promega), 0,5 µM de cada cebador, agua pura grado HPLC y 5ng/µl de ADN.

La amplificación se hizo en un termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc., Watertown, MA) utilizando las siguientes condiciones: Un ciclo inicial de 5 min. a 95ºC seguido por 30 ciclos de 30 seg. a 95ºC, 30 seg. a 60ºC para los cebadores (CAG)5, (AGG)5 y (TCC)5 ó 48ºC para los cebadores (GACA)4 y (GACAG)3 y una temperatura final de 72ºC por 1,5 min..

Los productos de la amplificación (6 µl) fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 0,5X a 85V/cm. por 7 h. y se visualizaron con luz UV. En cada gel se adicionaron 2 µl del marcador de peso molecular Hiperladder II, para facilitar la comparación de los patrones de bandas entre las muestras. Las imágenes se capturaron en un lector de geles Gel Doc 2000 de BioRad.

Inicialmente se evaluaron 8 cebadores AP-PCR con un grupo de 5 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. representativos de las diferentes zonas de procedencia y diferentes morfotipos, esto con el fin de establecer las mejores condiciones de amplificación.

Para el análisis de los productos amplificados, cada fragmento generado fue considerado como un carácter independiente. Los fragmentos de ADN del mismo tamaño se asumieron como representantes del mismo locus genético y se evaluaron como "ausente o presente". Para cada banda individual presente se asignó un valor de "1" y a la ausencia "0", generando así una matriz binaria de datos para todos los aislamientos de *Pestalotiopsis* spp.

Con la matriz generada, se obtuvo una matriz de similitud aplicando el coeficiente de similitud de DICE a partir de la cual se construyó un filograma utilizando el algoritmo $UPGMA$, usando DARwin 5.

$$DICE \qquad Sij = \frac{2a}{(2a+b+c)}$$

Sij: Similitud entre el individuo *i* y el *j*
a: Número de bandas presentes simultáneamente en los individuos *i* y *j.*
b: Número de bandas presentes en *i,* pero ausentes en *j.*
c: Número de bandas presentes en *j*, pero ausentes en *i.*

4.8 Análisis filogenético de genes múltiples.

Amplificación de la región ITS, β-tubulina y *Tef-1*. Las regiones se amplificaron mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con cebadores universales de la región conservada del ADN ribosomal descrita por White y colaboradores (1990). El objetivo de dicha región es la de establecer la presencia de una única identidad de ADN para *Pestalotiopsis* spp.

Para la amplificación completa de la región ITS del ADNr, se usaron en la reacción PCR, los cebadores universales ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') (White *et al.,,* 1990) que amplifican un segmento

de 580 pb (Álvarez *et al.,,* 2004), para la amplificación parcial del gen β-tubulina se usó BT2A (5´-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3´) y BT2B (5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3') (Glass and Donalson 1995) y para *tef*1 se usaron EF1-526F (5'-GTCGTYGTYATY GGHCAYGT-3') and EF1-1567R (5'-ACHGTRCCRATACCACCRATCTT-3') (Rehner 2001)).

Tabla 2. Cebadores utilizados para amplificación de regiones

Región	Cebador	Forward	Cebador	Reverse
ITS	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'
Parcial β-tubulina	BT2A	5´-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC-3´	BT2B	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'
Parcial *Tef*1	EF1-526F	5'-GTCGTYGTYATY GGHCAYGT-3'	EF1-1567R	5'-ACHGTRCCRATACCACCRATCTT-3'

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Para ITS una desnaturalización inicial de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de amplificación de 95°C durante 30 s, 52°C durante 45 s y 72°C durante 90 s; finalmente una extensión final de 72°C por 10 min. Las condiciones β-tubulina fueron: desnaturalización inicial de 3 min a 95°C, 35 ciclos de 1 min a 94°C, 50s a 55°C, y 1 min a 72°C, seguido por 10 min a 72°C. Para TEF1, desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, 10 ciclos de 30 s a 94°C, 55 s a 63°C ó 66°C (disminuyendo 1°C cada ciclo), 90s a 72°C, además de 36 ciclos de 30s a 94°C, 55 s a 53°C o 56°C, 90s a 72°C, seguido de 7 minutos a 72°C (Maharachchikumbura, *et al.,* 2012).

4.8.1 Limpieza de los productos de PCR.

A los productos de amplificación que se obtuvieron con los cebadores ITS4-ITS5, BT2A-BT2B y EF1-526F- EF1-5167R (25 µl), se les adicionó el mismo volumen de una solución de PEG (20%) y NaCl (2.5M). La mezcla se homogenizó usando un vortex y se incubó a temperatura ambiente por 15 min., posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min y se descartó el sobrenadante, luego se adicionaron 100 µl de etanol

(70%) y nuevamente se centrifugó a 13000 por 3 min; después el etanol se removió cuidadosamente y se dejó secar el pellet incubando la muestra durante 30 min a 38°C.

Finalmente, el pellet de ADN se re-suspendió en 20 µl de agua ultrapura y se analizó la calidad, en un gel de agarosa (0,8%) teñido con SYBR® Safe DNA gel stain (invitrogen), en cada poso se introdujeron 3 µl de ADN marcados con 6 µl de una mezcla en relación 1:2 de glicerol (30%) y azul de bromofenol (5%).

4.8.2 Análisis de la secuencia.

Los productos de amplificación fueron enviados a Iowa State University al departamento de DNA sequencing facility, en donde fueron secuenciados. Al recibir las secuencias, estas fueron editadas y alineadas en el software Chromas Pro© versión 1.49 beta y Mega 5.2©. Posteriormente se buscaron homologías en el banco de genes GenBank (www.nbci.nlm.nih.gov) usando la herramienta Blast.

Se descargaron del GenBank las secuencias de especies tipo (holotipo, epitipo, ex-epitipo) publicadas en artículos científicos de referencia; el conjunto de secuencias descargadas fue editado con las secuencias de los aislamientos obtenidos a partir de guayaba, usando el software Mega 5.2.

4.8.3 Análisis filogenético.

Las secuencias alineadas con las de las especies tipo se analizaron usando la aplicación MrbBayes 3.2.1 (http://mrbayes.sourceforge.net/download.php), previamente se corrieron los datos en la aplicación JModelTest 2.1.4 (http://darwin.uvigo.es/our-software/) (Posada, 2008), esta aplicación permitió conocer el mejor modelo de sustitución de nucleótidos para calcular las probabilidades de cambio entre los nucleótidos a lo largo de las ramas del árbol filogenético. Para el análisis de las regiones combinadas (Multilocus) se corrieron 30´000.000 de árboles muestreando cada 1000 y se eliminó el 25% inicial.

4.9 Evaluación *in-vitro* de Biofungicidas.

Los aislamientos de *Pestalotiopsis* spp., se seleccionaron de acuerdo a su agresividad, origen y filogenia. Se evaluaron extractos de fique *Furcraea andina* y Swinglea *Swinglea glutinosa*, que en pruebas preliminares fueron los únicos que mostraron algún tipo de efecto inhibitorio, estas se probaron a concentraciones de 2 y 5%, se Midió el porcentaje de inhibición de crecimiento hasta que el testigo de la especie de crecimiento más rápido ocupara toda la caja.

4.9.1 Montaje del ensayo.

Se tomó un disco de 5 mm. de diámetro con crecimiento de micelio del aislamiento y se transfirió a una caja de petri con medio PDA enmendado con el extracto. Las cajas se incubaron a 22±1ºC, 12h luz y 12h oscuridad y se midió el crecimiento radial del aislamiento.

4.9.2 Diseño experimental.

El experimento se hizo bajo un diseño completamente al azar para cada aislamiento, se realizaron 3 repeticiones con un testigo absoluto PDA y un testigo positivo compuesto por PDA+Mancozeb.

El efecto inhibitorio de los extractos se determinó como el porcentaje de la inhibición del crecimiento radial del micelio con respecto al testigo PDA, empleando la siguiente fórmula:

$$PIC = \frac{Crecimiento\ del\ testigo - Crecimiento\ del\ tratamiento}{Crecimiento\ del\ testigo} x\ 100$$

4.9.3 Preparación de extractos.

Para preparar el extracto al 5% se usaron 5 g de tejido vegetal fresco por cada 100 ml de agua; de igual manera, para el extracto al 2% se usaron 2 g de tejido para la misma cantidad de agua; el tejido vegetal se licuó con la medida de agua exacta para la cantidad de cajas petri a verter (20 ml x caja), el licuado se pasó por 4 filtros de gasa y uno Whatman de papel con poros de 20 a 25 μm, posteriormente para obtener los medios modificados, se le agregó el PDA (39g x litro) y se autoclavaron.

5. Resultados y Discusión.

5.1 Aislamiento del hongo.

Se logró aislar *Pestalotiopsis* spp. a partir de frutos y hojas enfermos de guayabo. En frutos se encontró *Pestalotiopsis* spp. en todos los estados de desarrollo; en hojas solo se aisló a partir de las más maduras. Fué Posible obtener aislamientos de las cuatro variedades de guayaba muestreadas (Pera, Manzana, Coronilla y regional roja).

Figura 11. Frutos en diferente estado de desarrollo cv. Regional Roja afectados por *Pestalotiopsis* sp.

En total se obtuvieron 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. (Tabla 3) provenientes de 23 fincas, en 9 municipios ubicados en los 3 departamentos (Figura 12, Anexo A).

Tabla 3. Aislamientos de *Pestalotiopsis* spp., obtenidos a partir diferentes variedades de *Psidium guajava*.

			Latitud N			Longitud W						
No.	**Departamento**	**Municipio**	**Grad**	**Min**	**Seg**	**Grad**	**Min**	**Seg**	**Asnm**	**Variedad**	**Tejido**	**Código**
1	Valle Del Cauca	La Unión	4	31	289	76	3	123	939	Pera	Fruto	**VUve 1**
2	Valle Del Cauca	La Unión	4	31	289	76	3	123	939	Coronilla	Fruto	**VUve 2**
3	Valle Del Cauca	La Unión	4	31	289	76	3	123	939	Pera	Fruto	**VUve 3**
4	Valle Del Cauca	La Unión	4	31	289	76	3	123	939	Pera	Fruto	**VUve 4**
5	Valle Del Cauca	La Unión	4	34	423	76	3	665	931	Pera	Fruto	**VUgu 1**
6	Valle Del Cauca	La Unión	4	34	423	76	3	665	931	Pera	Fruto	**VUgu 2**
7	Valle Del Cauca	La Unión	4	34	423	76	3	665	931	Pera	Fruto	**VUgu 3**
8	Valle Del Cauca	La Unión	4	31	724	76	3	92	931	Pera	Fruto	**VUgy**
9	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	35	948	76	3	395	948	Pera	Fruto	**VTpo**
10	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	26	500	76	4	426	923	Pera	Fruto	**VRle P**
11	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	28	26	76	5	269	916	Manzana	Fruto	**VRes 1**
12	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	28	26	76	5	269	916	Manzana	Fruto	**VRes 2**
13	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	28	26	76	5	269	916	Manzana	Fruto	**VRes 3**
14	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	28	26	76	5	269	916	Manzana	Fruto	**VRes 4**
15	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	25	290	76	6	348	932	Pera	Hoja	**VRte 1**
16	Valle Del Cauca	Roldanillo	4	25	290	76	6	348	932	Pera	Hoja	**VRte 2**
17	Valle Del Cauca	Toro	4	36	467	76	2	630	925	Pera	Fruto	**VTman 1**
18	Valle Del Cauca	Toro	4	36	467	76	2	630	925	Pera	Fruto	**VTman 2**
19	Valle Del Cauca	Toro	4	36	467	76	2	630	925	Pera	Hoja	**VTman 3**
20	Valle Del Cauca	Toro	4	36	467	76	2	630	925	Pera	Hoja	**VTman 4**
21	Valle Del Cauca	Toro	4	36	467	76	2	630	925	Pera	Fruto	**VTman 5**
22	Valle Del Cauca	Toro	4	36	467	76	2	630	925	Pera	Hoja	**VTman 6**
23	Valle Del Cauca	Toro	4	35	197	76	2	741	925	Pera	Hoja	**VTsin1**
24	Valle Del Cauca	Toro	4	35	197	76	2	741	925	Pera	Hoja	**VTsin2**
25	Valle Del Cauca	Toro	4	35	197	76	2	741	925	Pera	Hoja	**VTsin3**
26	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Hoja	**SVsnp 1**
27	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 2**
28	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Hoja	**SVsnp 3**
29	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 4**
30	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Hoja	**SVsnp 5**
31	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 6**
32	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 7**
33	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Hoja	**SVsnp 8**
34	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 9**
35	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Hoja	**SVsnp 10**
36	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 11**
37	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 12**
38	Santander	Vélez	5	59	84	73	37	293	1764	Reg. roja	Fruto	**SVsnp 13**
39	Santander	Vélez	5	58	573	73	39	741	1925	Reg. roja	Hoja	**SVpa 1**
40	Santander	Vélez	5	58	573	73	39	741	1925	Reg. roja	Fruto	**SVpa 2**
41	Santander	Vélez	5	58	573	73	39	741	1925	Reg. roja	Fruto	**SVpa 3**
42	Santander	Vélez	5	58	573	73	39	741	1925	Reg. roja	Fruto	**SVpa 4**
43	Santander	Vélez	5	58	573	73	39	741	1925	Reg. roja	Fruto	**SVpa 5**
44	Santander	Vélez	5	58	573	73	39	741	1925	Reg. roja	Fruto	**SVpa 6**
45	Santander	Vélez	5	58	573	73	39	741	1925	Reg. roja	Fruto	**SVpa 7**
46	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Fruto	**SVpo 1**
47	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Fruto	**SVpo 2**
48	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Fruto	**SVpo 2-2**
49	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Fruto	**SVpo 3**
50	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Fruto	**SVpo 4**
51	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Hoja	**SVpo 5**

52	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Fruto	**SVpo 6**
53	Santander	Vélez	5	57	989	73	39	437	1917	Reg. roja	Hoja	**SVpo 7**
54	Santander	P. Nacional	5	52	581	73	40	307	1602	Reg. roja	Fruto	**SPugra 1**
55	Santander	P. Nacional	5	52	581	73	40	307	1602	Reg. roja	Fruto	**SPugra 2**
56	Santander	P. Nacional	5	52	581	73	40	307	1602	Reg. roja	Fruto	**SPugra 2**
57	Santander	P. Nacional	5	52	581	73	40	307	1602	Reg. roja	Fruto	**SPugra 3**
58	Santander	P. Nacional	5	52	581	73	40	307	1602	Reg. roja	Fruto	**SPugra 5**
59	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Fruto	**SSbu 1**
60	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Fruto	**SSbu 2**
61	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Fruto	**SSbu 3**
62	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Hoja	**SSbu 3**
63	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Hoja	**SSbu 4**
64	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Hoja	**SSbu 5**
65	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Hoja	**SSbu 6**
66	Santander	San Benito	6	7	245	73	30	770	1403	Reg. roja	Fruto	**SSbu 7**
67	Santander	San Benito	6	6	703	73	31	159	1401	Reg. roja	Fruto	**SSpla**
68	Santander	Barbosa	5	56	191	73	35	900	1546	Reg. roja	Fruto	**SBma1**
69	Santander	Barbosa	5	56	191	73	35	900	1546	Reg. roja	Fruto	**SBma2**
70	Santander	Barbosa	5	56	191	73	35	900	1546	Reg. roja	Fruto	**SBma3**
71	Santander	Barbosa	5	57	486	73	38	109	1950	Reg. roja	Hoja	**SBac 1**
72	Santander	Barbosa	5	57	486	73	38	109	1950	Reg. roja	Hoja	**SBac 2**
73	Boyacá	Pauna	5	63	934	73	99	770	1051	Reg. roja	Fruto	**BVayr 1**
74	Boyacá	Pauna	5	63	934	73	99	770	1051	Reg. roja	Fruto	**BVayr 2**
75	Boyacá	Pauna	5	53	937	73	97	773	1062	Reg. roja	Fruto	**BPpa 1**
76	Boyacá	Pauna	5	53	937	73	97	773	1062	Reg. roja	Fruto	**BPpa 2**
77	Boyacá	Pauna	5	39	566	73	59	880	866	Reg. roja	Fruto	**BPca 1**
78	Boyacá	Pauna	5	39	566	73	59	880	866	Reg. roja	Fruto	**BPca 2**
79	Boyacá	Pauna	5	39	67	73	59	562	1049	Reg. roja	Fruto	**BPva 1**
80	Boyacá	Tununguá	5	43	848	73	56	387	1214	Reg. Roja	Fruto	**BTca 1**
81	Boyacá	Tununguá	5	43	579	73	56	421	1186	Reg. Roja	Fruto	**BTca 2**

Los tres departamentos contrastan por las condiciones geo-climáticas, por las técnicas de producción y las variedades, por ejemplo: en Santander en la mayoría de las fincas visitadas la producción no es tecnificada y se hace escasa aplicación de productos para el control de problemas fitosanitarios y fertilizantes; en contraste, en el Valle del Cauca, el paquete tecnológico empleado es mucho más amplio y la aplicación de productos para el control de problemas fitosanitarios se hace periódicamente, especialmente los de síntesis química; el cultivo de guayaba en el departamento de Boyacá está tecnológicamente situado en el medio de los departamentos del Valle y Santander (Datos no publicados Grupo de Frutas Tropicales CIAT, 2012).

La enfermedad se encontró en todos los departamentos donde se hicieron los muestreos, el patógeno se aisló en todos los departamentos en diferente proporción

(Boyacá 9, Santander 47 y Valle del Cauca 25), a pesar de que el número de fincas muestreadas en cada departamento fue el mismo; en Boyacá y el Valle, se muestrearon 15 fincas distribuidas en 3 municipios y en Santander 15 fincas distribuidas en 4 municipios.

En el Valle de Cauca fue mucho más difícil encontrar y colectar frutos afectados por la enfermedad a diferencia de Boyacá y Santander, donde se ubicaron con mayor facilidad y frecuencia; es posible que esto se deba al hecho que en el Valle se aplican fungicidas en mayor cantidad y periodicidad que en los otros dos departamentos (Datos no publicados Grupo de Frutas Tropicales CIAT, 2012); sin embargo de Boyacá se obtuvieron muy pocos aislamientos, posiblemente porque las muestras se deterioraron durante el transporte y al aislar crecieron hongos saprófitos.

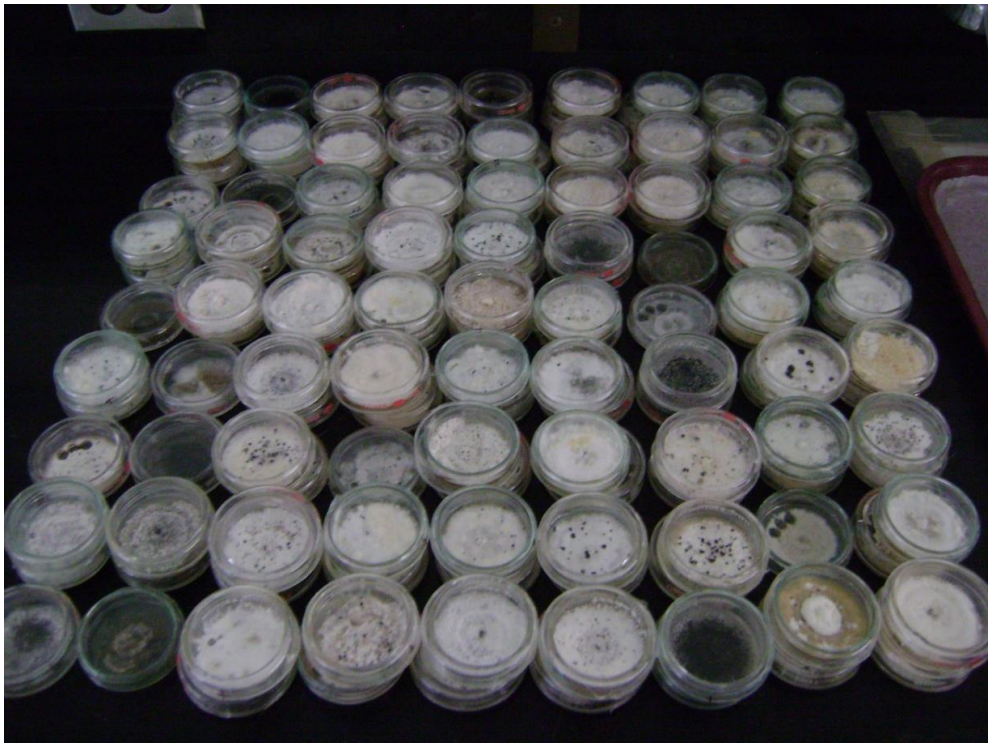


Figura 12. Colección de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp.

5.2 Pruebas de patogenicidad.

La metodología de inoculación de *Pestalotiopsis* sp. en frutos de guayaba cv. Pera (ICA 1) consistente en discos de agar con micelio permitió desarrollar en los frutos lesiones con presencia de micelio y acérvulos típicos del hongo y establecer diferencias entre la agresividad de los aislamientos inoculados.

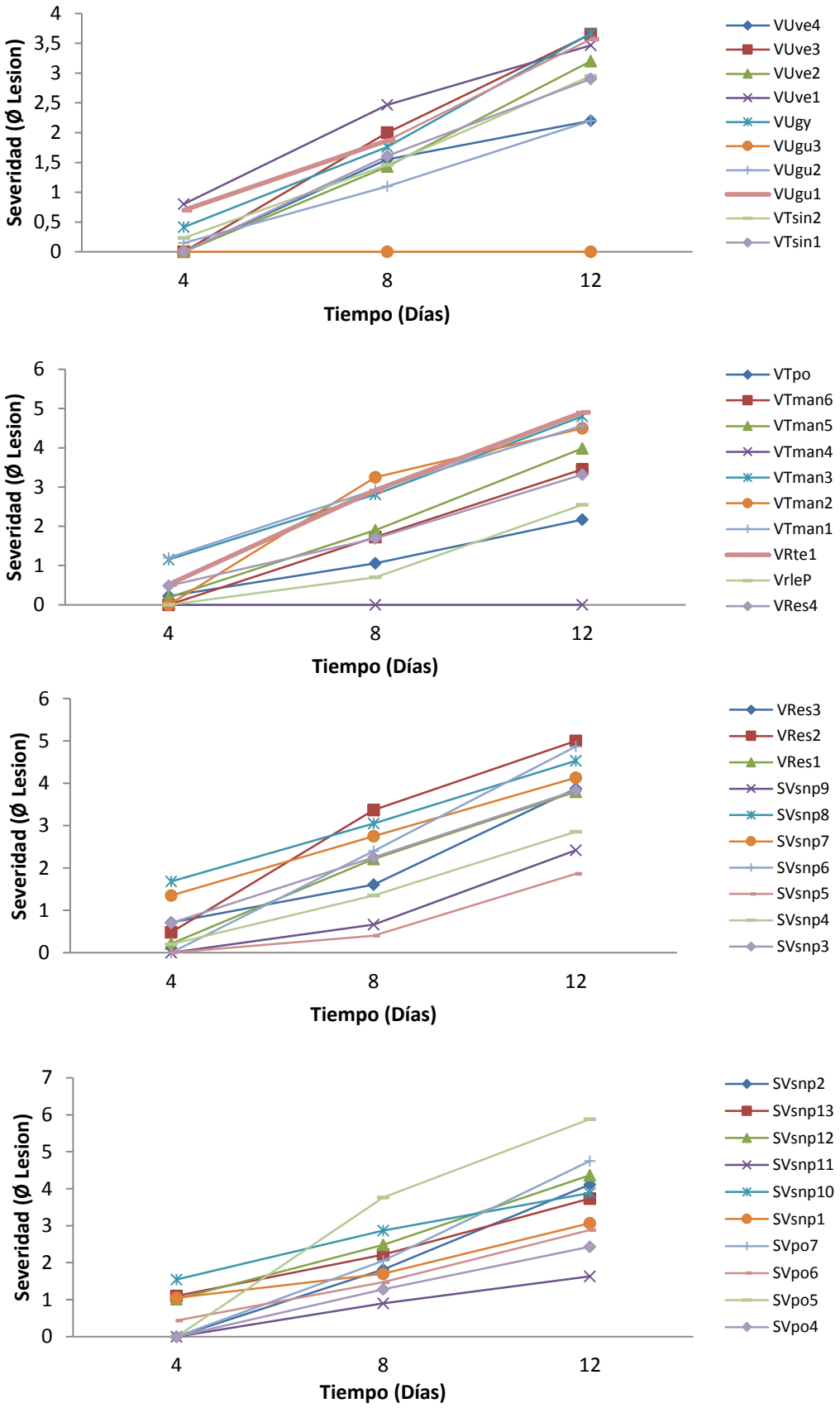
Las variables ABCDL y DL permitieron caracterizar los aislamientos según la agresividad según los resultados del análisis estadístico arrojó diferencias significativas entre los aislamientos (<0.01) y se pudieron categorizar según a prueba de rango múltiple de Ryan Einot Gabriel Welsch α= 0.05 (Tabla 3, Anexo B).

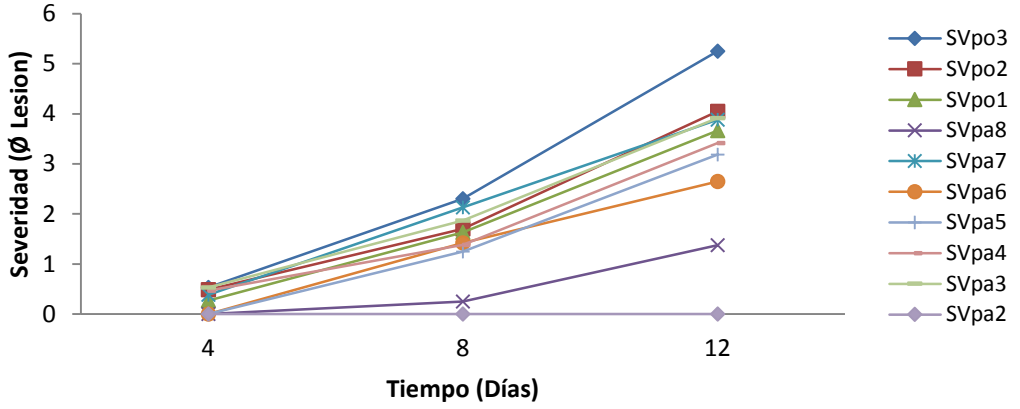
El aislamiento más virulento fue SVpo5, proveniente de Vélez Santander, este aislamiento es el único que mostró ser en términos de agresividad, ser diferente a todos los demás aislamientos, incluso a otros de agresividad alta (VRes2, SVpa1, BVayr1, SVsnp8, VRte1); los aislamientos más agresivos son en su mayoría provenientes de los departamentos de Santander y Valle del cauca, exceptuando el aislamiento BVayr1, único procedente del departamento de Boyacá (Figura 13, Tabla 3).

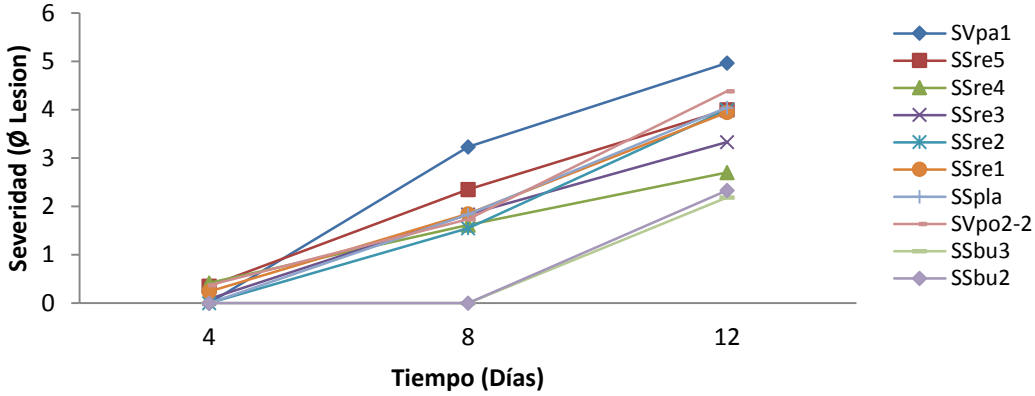
La desviación estándar de las variables *ABCDL* y DL, fueron bajas para la mayoría de los aislamientos, excepto para SVsnp8, BPca2, VRes2, VUve2 y SPugra3, que mostraron desviaciones mas altas de lo normal (Figura 15).

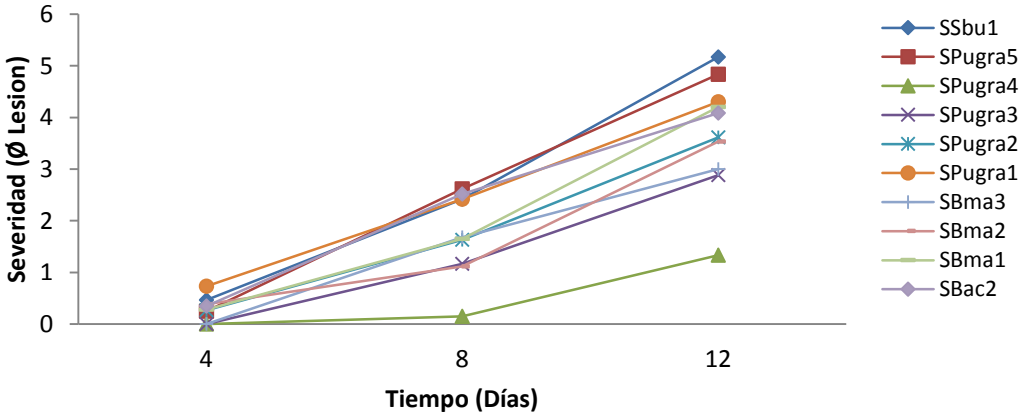
Las pruebas de patogenicidad mostraron que 77 de los aislamientos, son patogénicos y 4, no patogénicos; entre los 77 aislamientos patogénicos se encontraron diferentes grados de agresividad de acuerdo a las dos variables evaluadas; diámetro final de la lesión (DL) y área bajo la curva del crecimiento de la lesión (ABDCL) (Figura 13), Un análisis de cluster separó los aislamientos en tres grupos; Poco agresivos, Medianamente agresivos y Altamente agresivos (Figura 16).

Figura 13. Progreso de lesiones en frutos de guayaba cv. Pera (ICA 1) inoculados con 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp.




Severidad (Ø Lesion)
0
1
2
3
4
5
6
4
8
12
Tiempo (Días)
SVpo3
SVpo2
SVpo1
SVpa8
SVpa7
SVpa6
SVpa5
SVpa4
SVpa3
SVpa2


Severidad (Ø Lesion)
0
1
2
3
4
5
6
4
8
12
Tiempo (Días)
SVpa1
SSre5
SSre4
SSre3
SSre2
SSre1
SSpla
SVpo2-2
SSbu3
SSbu2


Severidad (Ø Lesion)
0
1
2
3
4
5
6
4
8
12
Tiempo (Días)
SSbu1
SPugra5
SPugra4
SPugra3
SPugra2
SPugra1
SBma3
SBma2
SBma1
SBac2

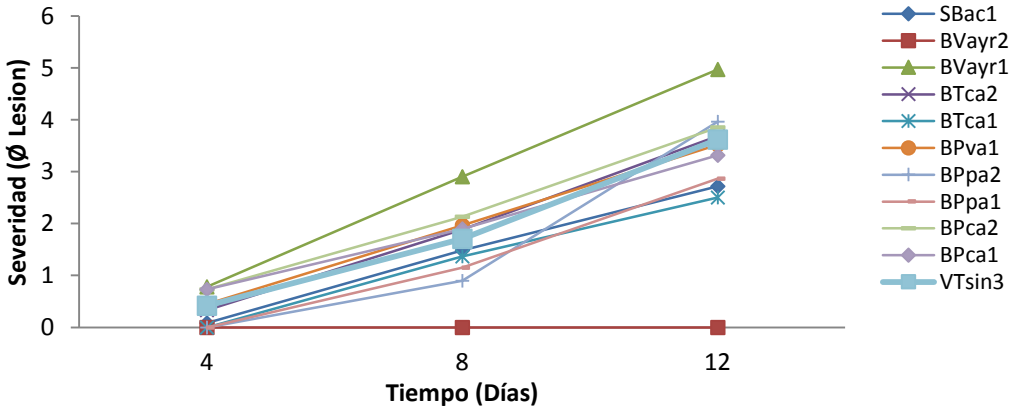

Severidad (Ø Lesion)
0
1
2
3
4
5
6
4
8
12
Tiempo (Días)
SBac1
BVayr2
BVayr1
BTca2
BTca1
BPva1
BPpa2
BPpa1
BPca2
BPca1
VTsin3

Tabla 3. Categorías y frecuencias de Agresividad de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp.

Agresividad	Cantidad de aislamientos	Aislamientos (%)
Alta	18	22,22
Media	35	43,21
Baja	24	29,63
Cero	4	4,94
Total	**81**	**100**

Prueba de rango múltiple de Ryan Einot Gabriel Welsch α= 0.05.

Los aislamientos poco agresivos, desarrollaron lesiones pequeñas y produjeron pocos acérvulos visibles sobre los frutos (Figura 14 b) a diferencia de los aislamientos medianamente agresivos que generalmente produjeron mayor cantidad de acérvulos superficiales, pero poco micelio (Figura 14 c); los aislamientos altamente agresivos produjeron gran cantidad de micelio y acérvulos superficiales especialmente 12 días después de la inoculación (Figura 14 d). *Pestalotiopsis* spp. fue re-aislado consistentemente de los frutos.

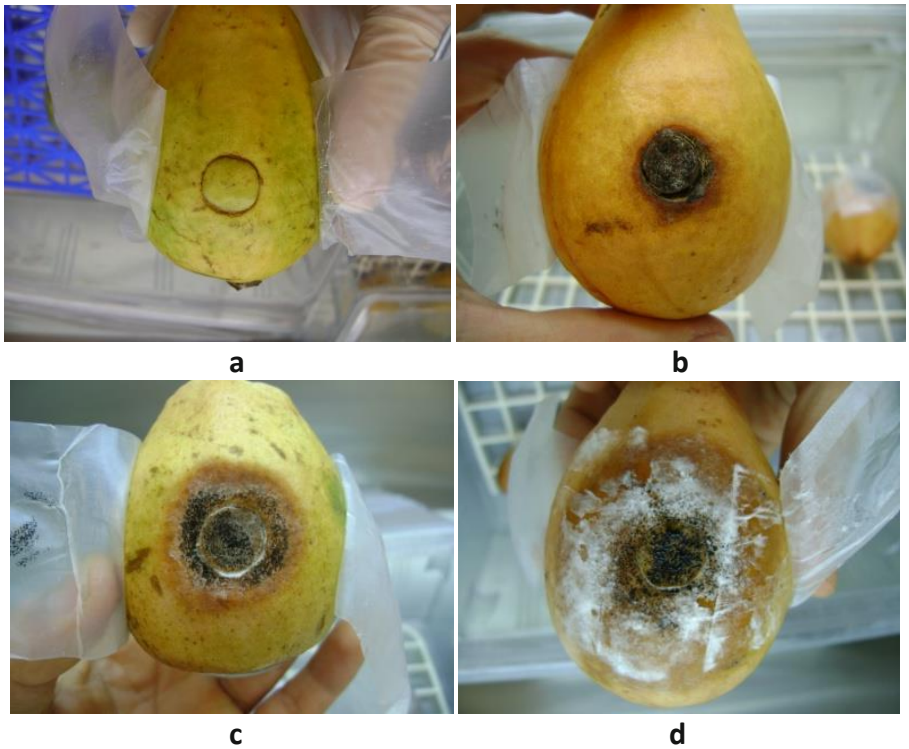


Figura 14. Diferentes grados de agresividad 12 días después de la inoculación a) Testigo; b) Poco virulento; c) Medianamente virulento y d) Altamente virulento.

Los aislamientos se agruparon de acuerdo a su grado de agresividad con un análisis de clúster en función de las dos variables evaluadas (ABCDL y DL), con este análisis se separaron los tres grupos principales teniendo en cuenta un nivel de significancia del 5%; el rango de agrupamiento para los aislamientos con alta agresividad fue 99,21 cm^2 a 48,87 cm^2 para la variable ABCDL y 5,88 cm a 4,13 cm para DL; el rango de los aislamientos de agresividad media fue de 48,49 cm^2 a 23,31 cm^2 para ABCDL y 4,38 cm a 3,00 cm para DL; para los aislamientos de agresividad baja el rango fue 23,27 cm^2 a 3,01 cm^2 para ABCDL y 3,19 cm a 1,38 cm para DL (Tabla 5, Figura 15).

Los clados agruparon los aislamientos de la siguiente forma; de abajo hacia arriba, el primer grupo contiene los 18 aislamientos más agresivos, el segundo contiene los 24 aislamientos de agresividad baja y los 4 no que no causaron síntomas sobre ninguno de los frutos y el tercer grupo contiene los 35 aislamientos de agresividad intermedia (Figura 16).

Tabla 5. Agresividad expresada como área bajo la curva del progreso de la lesión y diámetro final de la lesión de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis.*

Aislamiento	ABDCL	DL	Agresividad	**Aislamiento**	ABDCL	DL	Agresividad	**Aislamiento**	ABDCL	DL	Agresividad
SVpo5	99,21	5,88	Alta	VTman5	36,68	3,98	Media	VTsin1	21,78	2,90	Baja
VRes2	75,72	4,17	Alta	SBma1	36,67	4,20	Media	SVpa5	20,88	3,18	Baja
SVpa1	71,86	4,97	Alta	SSpla	36,52	4,05	Media	VTsin2	20,71	2,95	Baja
BVayr1	66,40	4,97	Alta	SVpa3	35,75	3,92	Media	SVpo6	20,52	2,88	Baja
SVsnp8	66,12	4,53	Alta	SSre1	35,59	3,95	Media	SSre4	20,15	2,70	Baja
VRte1	65,18	4,90	Alta	SVpo2	35,48	4,05	Media	SVsnp4	18,87	2,86	Baja
VTman2	65,14	4,50	Alta	SVpa7	34,57	3,88	Media	SBac1	18,61	2,72	Baja
VTman3	63,26	4,80	Alta	VUve3	33,78	3,65	Media	SPugra3	17,39	2,88	Baja
VTman1	62,66	4,57	Alta	BTca2	32,88	3,68	Media	SVpa6	17,39	2,65	Baja
SSbu1	60,76	5,17	Alta	SSre2	32,77	4,00	Media	BPpa1	17,30	2,87	Baja
SVpo3	60,57	5,25	Alta	VRes3	32,62	3,88	Media	BTca1	16,01	2,50	Baja
SPugra5	58,87	4,83	Alta	BPva1	32,27	3,52	Media	VUve4	15,23	2,20	Baja
SVsnp6	55,49	4,87	Alta	VUgu1	31,85	3,57	Media	SVpo4	14,55	2,43	Baja
SVsnp7	54,05	4,13	Alta	VUgy	31,46	3,67	Media	VUgu2	11,99	2,20	Baja
SVsnp10	53,61	3,88	Alta	VTsin3	30,49	3,62	Media	VrleP	11,84	2,55	Baja
SVsnp12	52,01	4,37	Alta	SVpo1	30,13	3,67	Media	SVsnp9	11,50	2,42	Baja
SVpo7	48,89	4,75	Alta	BPca1	29,82	3,32	Media	VTpo	11,18	2,17	Baja
SPugra1	48,49	4,30	Media	SPugra2	29,52	3,62	Media	SSbu2	8,58	2,33	Baja
SBac2	47,95	4,08	Media	VTman6	28,78	3,45	Media	SSbu3	7,53	2,18	Baja
SSre5	42,95	4,00	Media	SSre3	28,14	3,33	Media	SVsnp5	7,05	1,87	Baja
BPca2	40,34	3,85	Media	BPpa2	27,33	3,97	Media	SVsnp11	7,03	1,63	Baja
SVpo2-2	40,19	4,38	Media	VRes4	27,20	3,32	Media	SVpa8	3,58	1,38	Baja
SVsnp3	39,93	3,83	Media	SVsnp1	26,00	3,07	Media	SPugra4	3,01	1,33	Baja
VUve1	39,92	3,47	Media	SVpa4	24,91	3,42	Media	VUgu3	0,00	0,00	Cero
SVsnp13	39,37	3,73	Media	SBma2	24,16	3,53	Media	VTman4	0,00	0,00	Cero
VRes1	38,58	3,80	Media	SBma3	23,31	3,00	Media	SVpa2	0,00	0,00	Cero
SVsnp2	37,18	4,12	Media	VUve2	23,27	3,19	Baja	BVayr2	0,00	0,00	Cero

Prueba de rango múltiple de Ryan Einot Gabriel Welsch $\alpha = 0.05$

Figura 15. Agresividad de los Aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. expresada como ABCDL y DL.

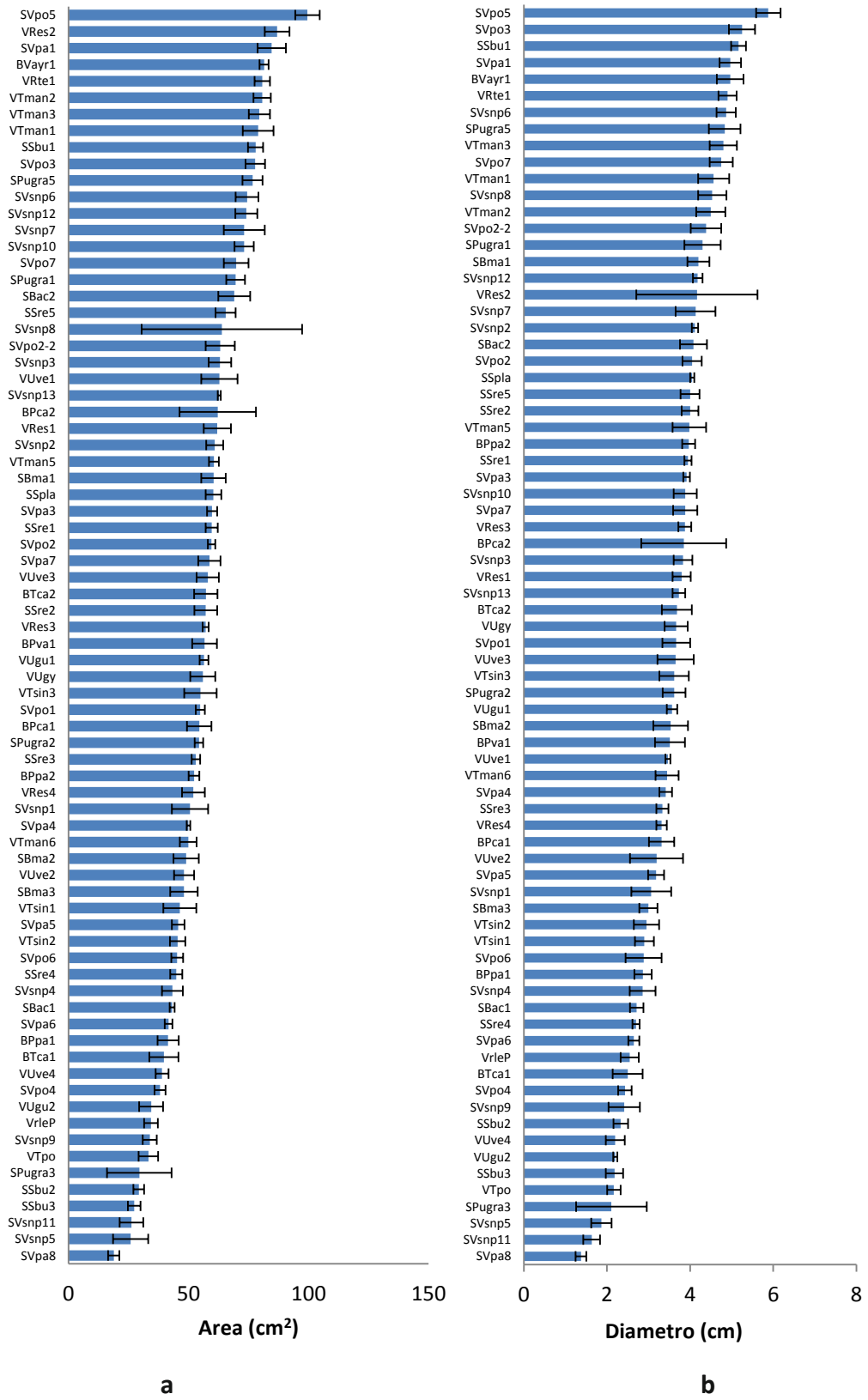
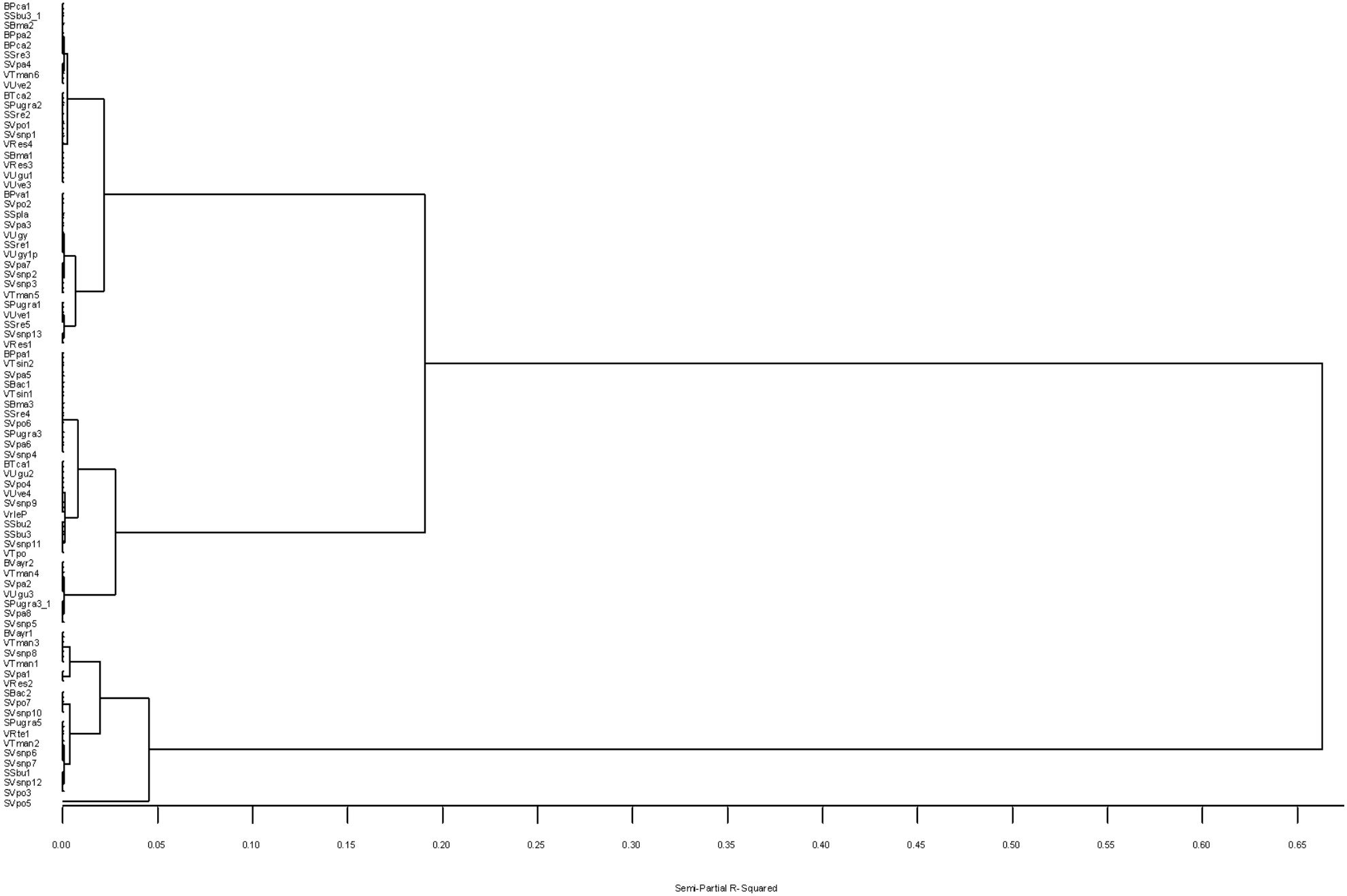


Figura 15. a) Agresividad de los aislamientos de *Pestalotiopsis* spp., expresada como ABCDL. b) agresividad de los aislamientos de *Pestalotiopsis* spp., expresada como DL.

Figura 16. Análisis de cluster de aislamientos de *Pestalotiopsis* en función de ABCDL y DL.



Con los resultados obtenidos de las pruebas de patogenicidad se logró establecer entre las dos principales variables medidas (*ABCDL* y DL) una correlación de 89% (Anexo C), esto quiere decir que en general, entre mayor es el valor del diámetro final de la lesión, mayor área bajo la curva y viceversa (Figura 17). Esta correlación positiva indica que los aislamientos que ocasionaron lesiones mayores en las primeras evaluaciones, en general, fueron los que causaron mayor daño sobre el fruto al final.

El valor de la pendiente es 18.08, quiere decir que por cada centímetro que aumenta el Diámetro Final de la Lesión, el Área Bajo la Curva aumenta 18.08 centímetros cuadrados.

La fórmula de la regresión es:

$$Y = 18.08\ X - 30.23$$

$$R^2 = 0{,}7925$$

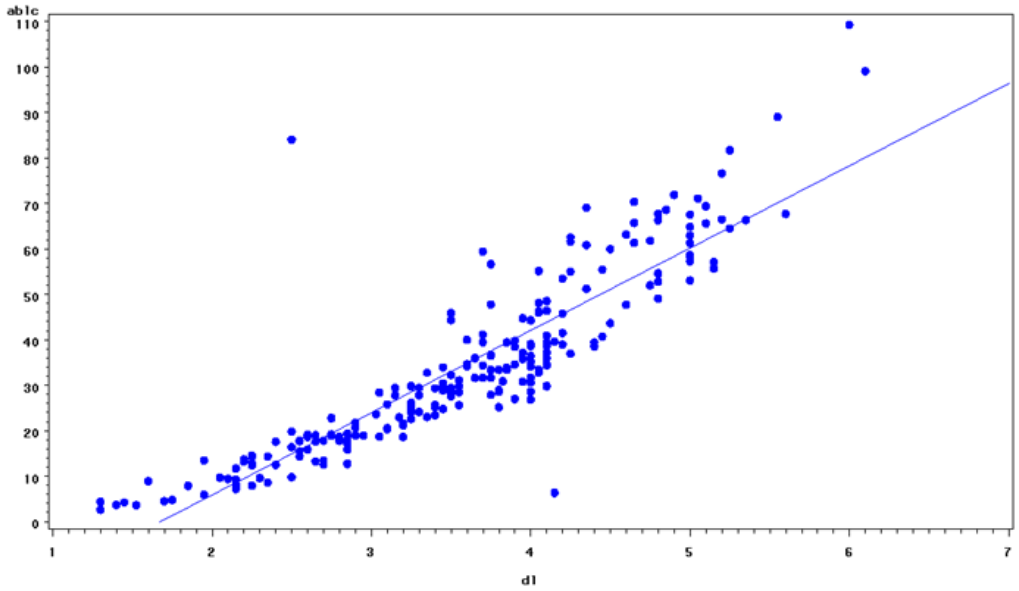


Figura 17. Gráfica de regresión lineal resultado de la correlación entre ABCDL (eje Y) y DL (eje X).

En general *Pestalotiopsis* spp. se ha considerado como un patógeno débil, que aprovecha las aberturas naturales del tejido o el daño por insectos, para colonizar su hospedero; sin embargo muchos de ellos pueden causar grandes daños. La mayoría de las especies de

Pestalotiopsis descritas, son cosmopolitas (Keith *et al.,* 2006, Hopkins and McQuilken 2000), ya que varias, se han reportado afectando dos o más hospederos lejanos genéticamente, también se han reportado como endófitas y saprófitas (Joshi *et al.,* 2009, Tejesvi *et al.,* 2007); por ello es posible que se encuentren aislamientos afectando una especie vegetal con agresividad baja e intermedia que probablemente no han tenido coevolución con el hospedero.

La variabilidad en la agresividad de los aislamientos puede explicarse gracias a la amplía dispersion de *Pestalotiopsis*, además de su diversidad y su amplio rango de hospederos, por ejemplo: en té (Joshi *et al.,* 2009) y en guayaba (Keith *et al.,* 2006) ya se ha reportado más de una especie de *Pestalotiopsis* asociada a una enfermedad.

Xu y colaboradores (2010), encontraron 130 diferentes compuestos aislados de diferentes especies de *Pestalotiopsis*. Entre ellos alcaloides bioactivos, terpenoides, derivados, isocumarina, cumarinas, cromonas, quinonas, semiquinonas, péptidos, xantonas, derivados de xantonas, fenoles, ácidos fenólicos, y lactonas, varias de ellas están asociadas con la agresividad; cada especie de acuerdo a su hábitat posee su propio conjunto de metabolitos.

5.3 **Caracterización morfológica.**

5.3.1 **Caracterización macroscopica.**

Se agruparon los 81 aislamientos según las características de las colonias en 9 morfotipos; los principales descriptores fueron: el color superficial, la textura, tipo de borde, producción de micelio (mucho, medio ó poco) y la presencia o ausencia de acérvulos superficiales; sin embrago, las características a las que se les dio mas peso en la caracterización, fue al color superficial, la producción de micelio y la textura, debido a que las otras características fueron altamente variables y por lo tanto poco confiables.

Según las características evaluadas se obtuvieron los siguientes morfotipos:

Morfotipo 1: Colonias de color blanco, con mucha producción de micelio, textura algodonosa ó algodonosa-motosa, márgenes onduladas, generalmente producen acérvulos superficiales, el color inferior de la colonia puede ser salmón, amarillo, anaranjado o blanco crema (Figura 18).

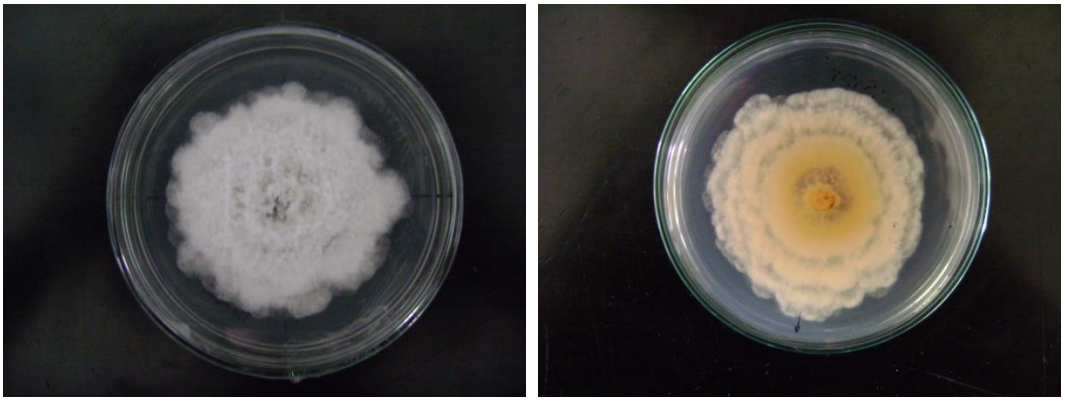


Figura 18. Morfotipo 1, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 2: Colonias de color blanco, amarillo claro, salmón ó café claro; mediana producción de micelio, textura aterciopelada y márgenes principalemente onduladas; la mayoria no producen acérvulos y el color inferior de la colonia puede ser amarillo, salmón o blanco crema (Figura 19).

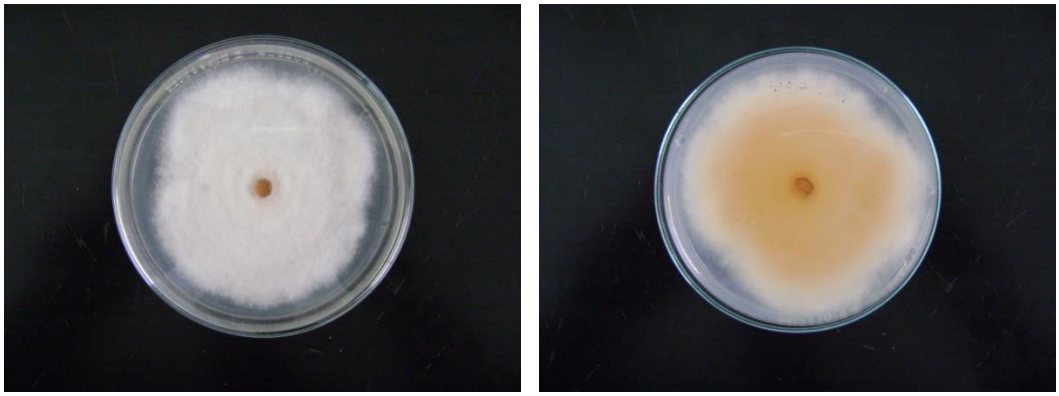


Figura 19. Morfotipo 2, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 3: Colonia de color blanco y gris en el centro, mediana producción de micelio, textura motosa ó algodonosa-motosa, márgenes onduladas, sin presencia de acérvulos y el reverso de la colonia puede ser de color amarillo ó blanco en los extremos y café en el centro (Figura 20).

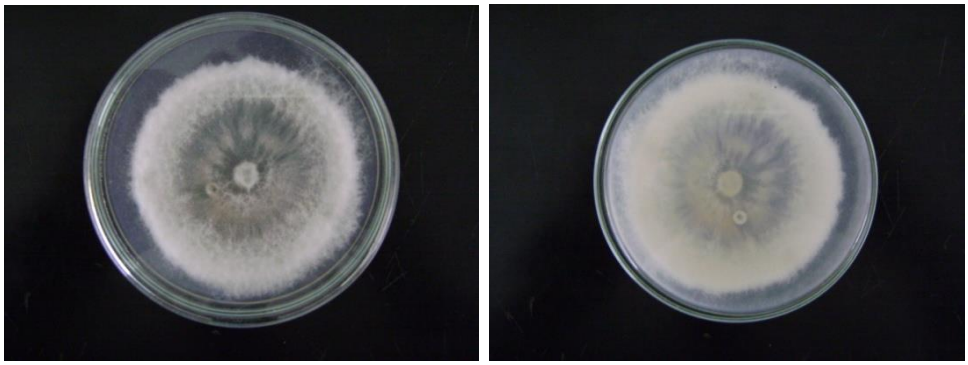


Figura 20. Morfotipo 3, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 4: Colonia de color blanco, mediana producción de micelio, textura algodonosa-motosa ó polvosa motosa, con márgenes onduladas y presencia de acérvulos, el reverso de la colonia puede ser de color amarillo, blanco ó naranja en los bordes y café en el centro; es diferente al morfotipo 1 por que produce mucho menos micelio (Figura 21).

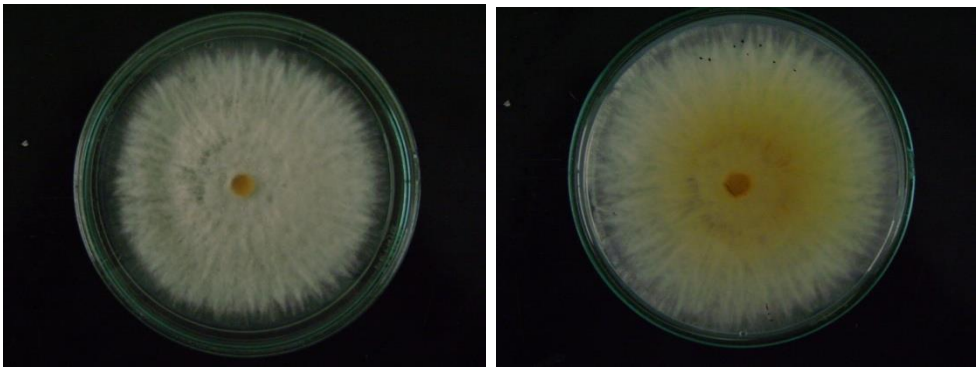


Figura 21. Morfotipo 4, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 5: Colonia de color gris, Amarillo ó salmón en la superficie y por el reverso es de color amarillo en los bordes y café en el centro; tiene poca producción de micelio y la

textura es granulada y forma una capa corrugada sobre el medio de cultivo, produce salientes de micelio desuniformes en la superficie; las márgenes pueden ser onduladas ó irregulares con presencia de acérvulos esparcidos en la superficie (Figura 22).

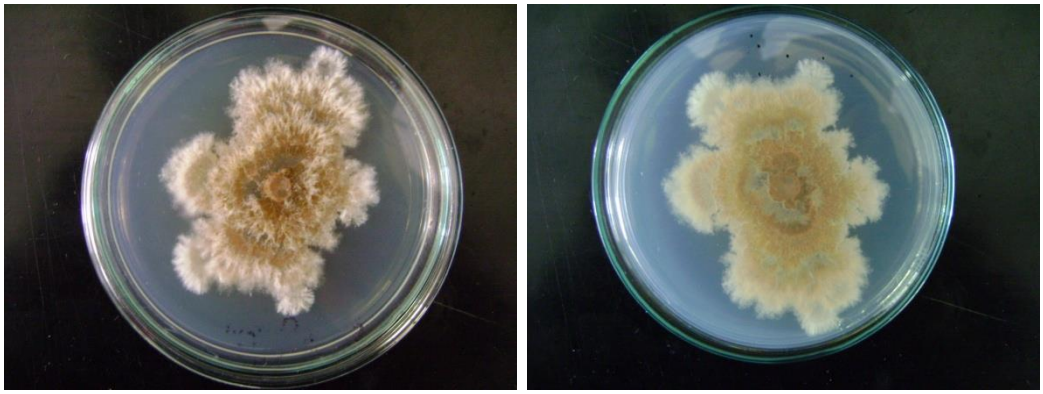


Figura 22. Morfotipo 5, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 6: Colonia de color blanco y café claro, poca a mediana producción de micelio, de textura polvosa, márgenes onduladas, sin presencia de acérvulos, el reverso es de color de café oscuro a naranja oscuro en el centro y mas claro en los bordes (Figura 23).

Figura 23. Morfotipo 6, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 7: Colonia de color blanco en los bordes y el centro de color gris oscuro ó salmón, de textura polvosa, mediana producción de micelio, márgenes onduladas y sin acérvulos superficiales (Figura 24).

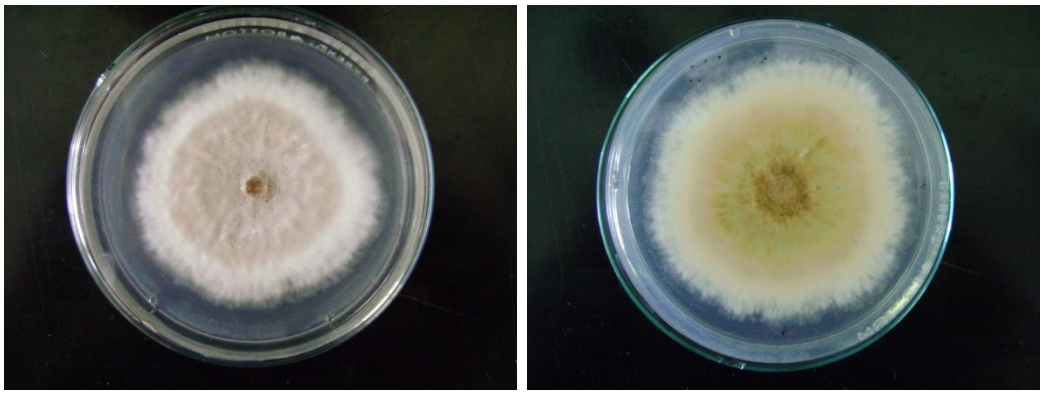


Figura 24. Morfotipo 7, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 8: Colonia de color gris oscura en la superficie y gris clara ó café al reverso, poca producción de micelio, texgtura terronuda, márgenes irregulares, produce grandes cantidades de acérvulos superficiales (Figura 25).

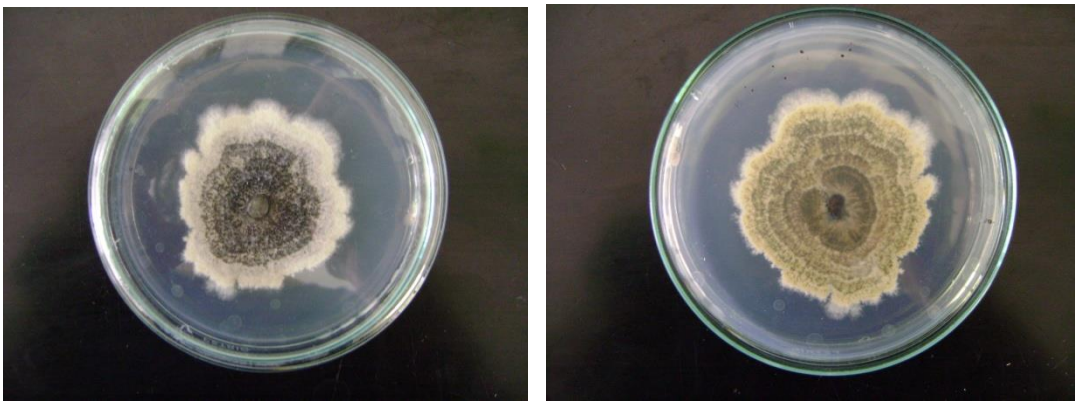


Figura 25. Morfotipo 8, Vista frontal y posterior.

Morfotipo 9: colonia de color negro en la parte superior y el reverso, muy poca producción de micelio, textura aceitosa, con márgenes onduladas ó irregulares, el color negro de la colonia lo da la gran cantidad de conidias producidas (Figura 26).

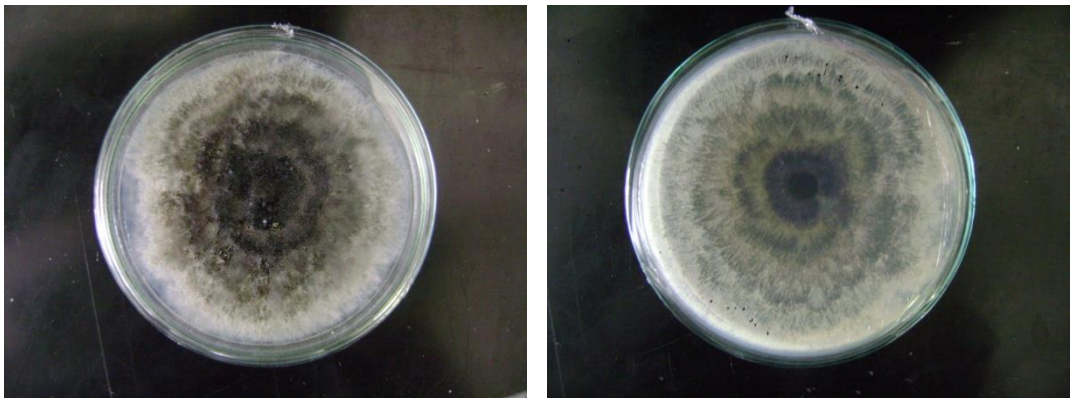


Figura 26. Morfotipo 9, Vista frontal y posterior.

El grupo 1 estuvo conformado por el 42.3% de los aislamientos, El grupo 2 por 20% de ellos, el grupo 3 por 6,3%, el grupo 4 por 6,3%, El grupo 5 por 4,9%, el grupo 6 por 1,4%, El grupo 7 por 7,6%, el grupo 8 por 4,9% y el grupo 9 por el 6,3% de los aislamientos (Tabla 6).

La mayoría de los aislamientos exhibieron variabilidad en las características morfológicas evaluadas, al sub-cultivar los aislamientos con las mismas condiciones de crecimiento, estos cambiaban una ó más características de la colonia, respecto a la inicial; esto ya había sido reportado para *Pestalotiopsis* spp. por Hu y colaboradores (2007), que describen por primera vez, que las características morfológicas de la colonia de *Pestalotiopsis* spp. no son estables al sub-cultivar los aislamientos (color, tasa de crecimiento y la textura). En ocasiones observamos en una misma caja de petri, con un solo aislamiento, dos morfologías diferentes (Figura 27).

Se observó que en algunos de los aislamientos podían cambiar una o más características de la colonia, y que ello, también podía suceder una ó más veces; por eso, la caracterización morfológica se hizo en el primer repique después de re-aislar el patógeno de los frutos utilizados para las pruebas de patogenicidad.

Tabla 6. Características morfológicas de 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* sp.

Aislamiento	Color Frontal	Color Reverso	Producción de micelio	Textura	Elevación	Márgenes	Acérvulos Superficiales	Morfología	Crecimiento
BPca1	Blanco	Amarillo claro	Mucho	Algodonosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Lento
BPpa1	Blanco	Amarillo claro	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	No	1	Lento
BPpa2	Blanco	Salmón	Mucho	Algodonosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Lento
BPva1	Blanco	Amarillo	Mucho	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	Si	1	Lento
BTca1	Blanco	Amarillo-negro	Mucho	Algodonosa-motosa	Umbonada	Onduladas	Si	1	Lento
BVayr1	Blanco	Blanco crema	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	No	1	Lento
SBma1	Blanco	Blanco	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Lento
SBma3	Blanco	Blanco	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	No	1	Lento
SSpla	Blanco	Blanco crema	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Lento
SSre4	Blanco	Verde oliva	Mucho	Algodonoso-motosa	Plana	Onduladas	Si	1	Medio
SVpa6	Blanco	Salmón-Amarillo	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Medio
SVpa7	Blanco	Salmón-Amarillo	Mucho	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	No	1	Medio
SVpo2	Blanco	Salmón	Mucho	Algodonosa-motosa	Elevada	Irregular	No	1	Medio
SVpo2-2	Blanco	Salmón	Mucho	Algodonosa-motosa	Elevada	Irregular	No	1	Medio
SVpo3	Blanco	Naranja-café	Mucho	Algodonosa	Umbonada	Onduladas	Si	1	Medio
SVsnp1	Blanco	Salmón-Blanco	Mucho	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	No	1	Medio
SVsnp11	Blanco	Amarillo-café	Mucho	Algodonosa-motosa	Crateriforme	Lisa	Si	1	Medio
SVsnp13	Blanco	Amarillo claro	Mucho	Algodonosa-motosa	Plano	Onduladas	Si	1	Medio
SVsnp3	Blanco	Amarillo claro	Mucho	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	Si	1	Medio
SVsnp4	Blanco	Salmón-Amarillo	Mucho	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	No	1	Medio
SVsnp5	Blanco	Amarillo	Mucho	Algodonosa	Umbonada	Onduladas	No	1	Medio
SVsnp6	Blanco	Amarillo	Medio	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	No	1	Medio
VRes2	Blanco	Amarillo-café	Mucho	Algodonosa	Elevada	Onduladas	No	1	Rápido
VRes3	Blanco	Blanco crema	Medio	Algodonosa	Elevada	Onduladas	Si	1	Rápido
VRes4	Blanco	Blanco crema	Mucho	Algodonosa-motosa	Crateriforme	Onduladas	Si	1	Rápido
VrleP	Blanco	Blanco	Mucho	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	Si	1	Rápido
VTman1	Blanco	Amarillo-café	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Rápido

Aislamiento	Color Frontal	Color Reverso	Producción de micelio	Textura	Elevación	Márgenes	Acérvulos Superficiales	Morfología	Crecimiento
VTman3	Blanco	Amarillo claro	Mucho	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	Si	1	Rápido
VTman4	Amarillo-café	Amarillo café	Mucho	Algodonosa-motosa	Con Salientes	Onduladas	No	1	Rápido
VTman5	Blanco	Amarillo	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Rápido
VUgu1	Blanco	Amarillo claro	Mucho	Algodonosa-motosa	Con salientes	Onduladas	Si	1	Rápido
VUgy	Blanco	amarillo claro	Mucho	Algodonosa	Elevada	Onduladas	No	1	Rápido
VUve1	Blanco	Amarillo café	Mucho	Algodonosa	Umbonado	Onduladas	Si	1	Rápido
VUve2	Blanco	Amarillo-café	Mucho	Algodonosa-motosa	Umbonado	Onduladas	Si	1	Rápido
SBac1	Blanco	Amarillo claro	Medio	Aterciopelada	Con salientes	Irregular	No	2	Lento
SPugra4	Blanco	Salmón	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Lento
SPugra5	Blanco	Salmón	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	Si	2	Lento
SSre1	Amarillo claro	Amarillo-café	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	Si	2	Lento
SSre2	Blanco	Salmón	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	Si	2	Lento
SSre3	Blanco	Verde oliva	Medio	Aterciopelada	Plana	Ciliadas	No	2	Lento
SSre5	Blanco rosa	Salmón	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Medio
SVpa8	Blanco	Salmón	Medio	Aterciopelada	Con salientes	Onduladas	Si	2	Medio
SVpo5	Blanco rosa	Amarillo crema	Medio	Aterciopelada	Plana	Lobado	Si	2	Medio
SVsnp10	Blanco	Amarillo crema	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Medio
SVsnp12	Blanco	Amarillo	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Medio
SVsnp2	Salmón	Salmón	Medio	Aterciopelada	Crateriforme	Onduladas	Si	2	Medio
SVsnp7	Café claro	Amarillo café	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Medio
VRte1	Blanco	Salmón	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Rápido
VTman2	Blanco	Salmón	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Rápido
VTsin1	Blanco	Blanco crema	Medio	Aterciopelada	Plana	Onduladas	No	2	Rápido
BTca2	Blanco	Amarillo claro	Medio	Motosa	Plana	Onduladas	Si	3	Lento
SBac2	Blanco-café	Café	Medio	Motosa	Con salientes	Irregular	Si	3	Lento
SPugra1	Blanco	Blanco crema	Medio	Motosa	Con salientes	Onduladas	Si	3	Lento
SPugra3	Blanco	Blanco-café	Medio	Motosa	Con salientes	Onduladas	No	3	Lento
SVpo6	Blanco	Amarillo-café	Medio	Algodonosa-motosa	Elevada	Onduladas	No	3	Medio
SSbu1	Blanco	Amarillo claro	Medio	Algodonosa	Plana	Onduladas	No	4	Lento

Aislamiento	Color Frontal	Color Reverso	Producción de micelio	Textura	Elevación	Márgenes	Acérvulos Superficiales	Morfología	Crecimiento
SVpa1	Blanco	Blanco crema	Medio	Algodonosa	Plana	Onduladas	No	4	Medio
SVpa4	Blanco	Amarillo	Medio	Polvosa-Motosa	Plana	Onduladas	Si	4	Medio
SVsnp8	Blanco	Naranja	Medio	Algodonosa-motosa	Plana	Onduladas	Si	4	Medio
VTsin3	Blanco	Blanco crema	Medio	Algodonosa	Plana	Onduladas	Si	4	Rápido
BVayr2	Amarillo-café	Amarillo-café	Poco	Granulosa	Con salientes	Onduladas	No	5	Lento
SBma2	Salmón	Salmón	Poco	Granulosa	Con salientes	Onduladas	Si	5	Lento
SVpa2	Gris-blanco	Amarillo-café	Poco	Granulosa	Con salientes	Irregular	Si	5	Medio
VTsin2	Gris-café	Amarillo-café	Poco	Granulosa	Con salientes	Onduladas	No	5	Rápido
VUgu3	Amarillo-café	Amarillo-café	Poco	Granulosa	Con salientes	Irregular	Si	5	Rápido
SVsnp9	Blanco	Amarillo-café	Poco	Polvosa	Plana	Onduladas	No	6	Medio
SPugra2	Blanco-negro	Amarillo-negro	Medio	polvosa	Plano	Onduladas	No	7	Lento
SSbu2	Blanco-negro	Amarillo-negro	Medio	Polvosa	Plana	Onduladas	Si	7	Lento
SSbu3	Salmón	Salmón	Medio	Polvosa-Motosa	Con salientes	Onduladas	No	7	Lento
SVpo1	Café claro	Café claro	Medio	Polvosa	Plana	Onduladas	No	7	Medio
SVpo4	Blanco-negro	Amarillo-negro	Medio	Polvosa	Plana	Onduladas	Si	7	Medio
VTman6	Blanco-negro	Amarillo-negro	Medio	Polvosa	Plana	Onduladas	No	7	Rápido
SVpa3	Blanco-negro	Gris	Medio	Polvosa	Plana	Irregular	Si	8	Medio
SVpo7	Blanco-negro	Gris	Medio	Polvosa	Plana	Irregular	No	8	Medio
VTpo	Blanco-negro	Gris	Medio	Húmeda	Plana	Irregular	Si	8	Rápido
VUgu2	Blanco-negro	Gris	Medio	Polvosa	Plana	Irregular	Si	8	Rápido
BPca2	Negro	Negro	Poco	Húmeda	Con salientes	Irregular	Si	9	Lento
SVpa5	Negro	Negro	Poco	Húmeda	Plana	Irregular	Si	9	Medio
VRes1	Negro	Negro	Poco	Húmeda	Plana	Onduladas	Si	9	Medio
VUve3	Negro	Negro	Poco	Húmeda	Con salientes	Onduladas	Si	9	Rápido
VUve4	Negro	Negro	Poco	Húmeda	Plana	Irregular	Si	9	Rápido

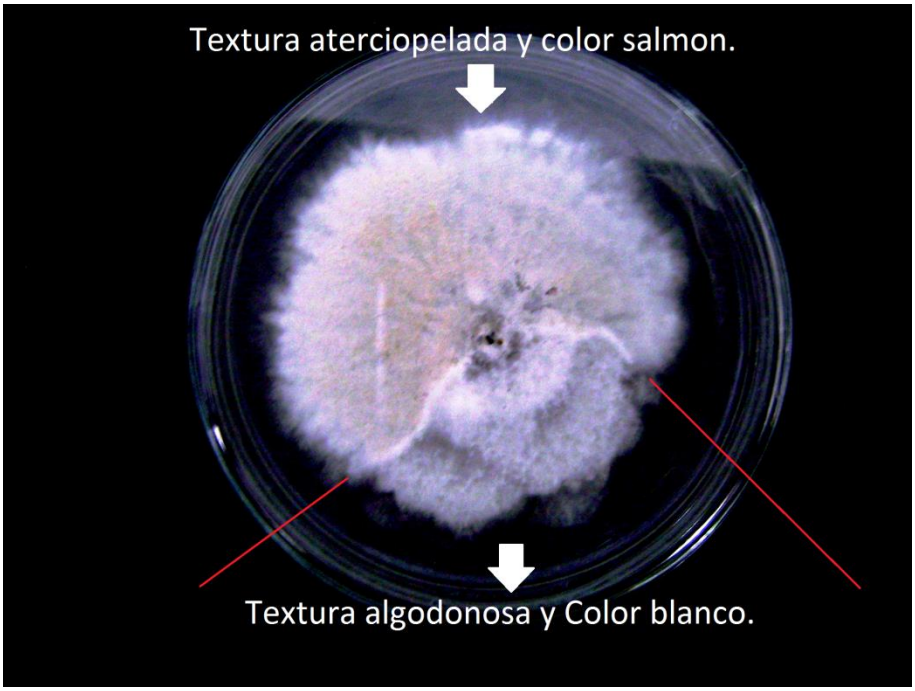


Figura 27. Aislamiento con dos morfologías diferentes en una misma caja de petri.

Jeewon y colaboradores (2007), además de Tejesvi y colaboradores (2007), compararon la morfología de los aislamientos con los filográmas de las secuencias y encontraron que las especies de *Pestalotiopsis* muestran una considerable diversidad en la morfología de la colonia, pero estos aislamientos se agruparon de acuerdo con las similitudes morfológicas de las conidias. Hu y colaboradores (2007) encontraron que los caracteres de las conidias, tales como longitud de la conidia, longitud de las células medias, ancho de conidias y el color de las células medias, son estables, sin embargo, la longitud de los apéndices apicales y basales varían.

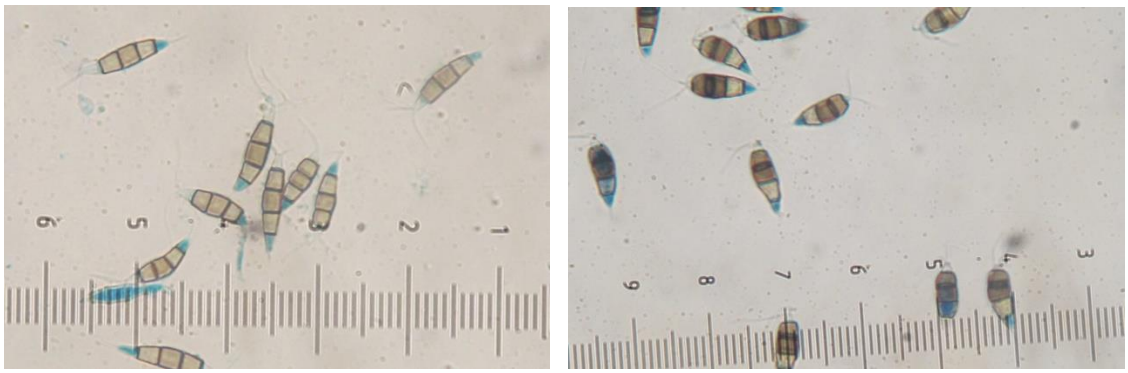
Se pudo observar que el 77% de los aislamientos de agresividad alta, tienen crecimiento rápido sobre medio de cultivo artificial, y el 21,4% son de crecimiento medio; además de esto, no se logró observar otro tipo de correlación directa entre la agresividad y la morfología ó la agresividad y la tasa de crecimiento de la colonia. El análisis de correlación entre la agresividad y la tasa de crecimiento sobre medio de cultivo fue baja debido a la no correspondencia entre estas dos variables.

5.3.2 Caracterización microscópica.

Se hizo la caracterización microscópica de 48 aislamientos, de todos los cuales, se logró obtener cuerpos fructíferos con conidias; de los restantes 34, no fue posible estimular la esporulación. Al sub-cultivar los aislamientos, estos fueron perdiendo características morfológicas, una de ellas, fue la producción de cuerpos fructíferos, a pesar de lo anterior, se puede considerar que 48 aislamientos constituyen una muestra representativa de la colección.

El valor mínimo y máximo para el largo de la conidia fue de 19,05 y 29,25 µm respectivamente; el mínimo y máximo para el ancho fue 4,40 y 10,40 µm respectivamente. El rango de los promedios fue de 21,38 y 25,74 µm para largo y 5,13 y 8,34 µm para el ancho.

El valor mínimo y máximo para los apéndices apicales fue 11,54 y 34,8 µm respectivamente, y el mínimo y máximo de los apéndices basales fue 3,00 y 6,75 µm respectivamente. En la mayoría de los aislamientos, el número de apéndices por conidia fue constante y la mayoría de los aislamientos presentaron conidias con tres apéndices apicales y uno basal.



a b

Figura 28. Coloraciones en la conidia de *Pestalotiopsis* sp. a) Conidias concoloras (VTman5); b) Conidias versicoloras (VUgu2).

Tabla 7. Caracterización microscópica de aislamientos de *Pestalotiopsis* sp.

Aislamiento	Color Células medias	Largo conidias (Prom.) (µm)	Ancho conidias (Prom.) (µm)	Rango de largo de conidias (µm)	Rango de ancho de conidias. (µm)	Largo apéndices apicales (promedio) (µm)	Largo apéndices basales (promedio) (µm)	Núm. de apéndices
VTpo	Versicolor	25.75	7.38	(22,12-28,91)	(6,02-8,37)	24.329	3.952	3
VUgu1	Versicolor	25.47	8.35	(20,90-29,25)	(6,06-10,4)	24.211	5.914	3
VUgu3	Versicolor	25.34	7.76	(23,75-27,90)	(7,02-8,68)	19.726	4.489	3
SBma2	Versicolor	25.29	7.59	(21,45-27,24)	(6,46-8,56)	20.694	4.132	3
SBac2	Versicolor	25.24	6.82	(22,66-28,19)	(6,36-7,39)	23.6	5.745	(2-3)
SBma1	Versicolor	25.12	6.83	(21,67-27,97)	(6,18-7,75)	23.098	4.9	3
BPpa2	Versicolor	24.84	6.81	(21,65-29,25)	(5,83-7,82)	28.675	6.712	(2-3)
VTman5	Concolora	24.78	5.42	(20,19-28,84)	(4,60-6,30)	15.14	4.917	3
VRes4	Versicolor	24.76	7.10	(22,12-28,15)	(6,29-7,80)	18.485	4.618	3
VrleP	Versicolor	24.50	5.94	(22,22-27,03)	(5,96-6,94)	13.939	5.879	(4-3)
SVsnp3	Versicolor	24.37	8.06	(21,81-24,37)	(7,40-9,17)	29.058	6.067	3
BTca2	Versicolor	24.32	6.85	(20,09-27,99)	(5,62-7,93)	22.287	3.005	(2-3)
SVsnp13	Versicolor	24.30	6.98	(22,04-26,81)	(5,94-8,15)	25.862	5.51	3
VTman1	Versicolor	24.27	6.39	(21,84-27,17)	(5,43-7,37)	21.821	N.D.	3
VTman3	Versicolor	24.18	6.97	(20,69-26,40)	(6,12-7,88)	18.855	4.528	3
SVpo3	Versicolor	24.14	6.96	(22,54-25,55)	(6,83-7,26)	21.886	5.061	3
VRes1	Versicolor	24.12	6.85	(21,82-28,50)	(5,80-7,39)	24.162	6.752	3
VUve1	Versicolor	24.07	7.09	(21,00-26,69)	(6,43-7,85)	20.626	4.467	3
VUve2	Versicolor	23.91	7.64	(20,22-27,16)	(6,13-9,12)	20.555	6.679	3
SVpa2	Versicolor	23.71	7.04	(20,37-27,22)	(5,92-8,15)	11.792	4.016	3
SVsnp2	Versicolor	23.70	6.77	(20,40-28,08)	(7,28-5,07)	25.194	5.74	3
SVsnp8	Versicolor	23.53	6.20	(20,40-28,08)	(5,07-7,28)	22.729	3.433	3
SVpa4	Versicolor	23.34	6.59	(20,79-26,35)	(5,60-7,49)	17.050	4.842	(2-3)
SVpa6	Versicolor	23.34	5.99	(20,75-26,17)	(5,23-6,54)	25.563	4.198	(2-3)
VRes3	Versicolor	23.29	6.30	(19,26-26,70)	(5,80-8,14)	19.188	4.825	4
SSbu3	Versicolor	23.21	6.44	(20,84-25,15)	(5,45-7,34)	21.63	3.38	3
SVpo5	Versicolor	23.04	6.97	(21,27-25,17)	(6,12-7,88)	20.263	4.53	3
SSre1	Versicolor	22.97	6.29	(20,26-25,12)	(5,60-7,49)	21.444	4.85	3
SVpa5	Versicolor	22.96	6.47	(19,29-24,87)	(5,67-7,18)	26.8	5.816	3
BTca1	Versicolor	22.95	6.82	(20,98-25,18)	(5,69-7,65)	23.925	5.962	3
SSpla	Concolora	22.92	5.13	(20,02-26,24)	(4,40-5,75)	11.541	5.692	3
BPva1	Versicolor	22.91	5.94	(20,26-27,24)	(5,22-6,53)	27.931	3.291	2
SVpa3	Versicolor	22.91	6.38	(21,23-24,68)	(5,32-7,36)	22.698	5.187	3
SPugra5	Versicolor	22.78	6.62	(20,01-26,13)	(5,64-7,64)	34.8	4.391	2
SVpo4	Versicolor	22.67	8.18	(20,68-25,58)	(7,02-9,12)	21.952	5.13	3
SSre2	Versicolor	22.60	6.66	(20,68-24,74)	(5,27-7,44)	23.943	5.11	3
SVpa8	Versicolor	22.58	6.12	(19,80-25,98)	(5,26-6,42)	30.306	6.371	2
VUve4	Versicolor	22.49	6.92	(20,67-25,22)	(6,23-7,55)	18.548	3.479	(2-3)
VUve3	Versicolor	22.39	6.52	(19,86-24,25)	(5,59-7,89)	18.843	4.077	3
SSbu2	Versicolor	22.32	6.36	(20,46-24,79)	(4,71-7,84)	21.882	4.071	3
BPca1	Versicolor	22.19	6.01	(19,65-24,50)	(5,35-6,68)	25.006	3.43	3

Aislamiento	Color Células medias	Largo conidias (Prom.) µm	Ancho conidias (Prom.) µm	Largo de conidias µm	Ancho de conidias µm	Largo apéndices apicales (promedio) µm	Largo apéndices basales (promedio) µm	Núm. de apéndices
VTsin4	Versicolor	22.13	7.08	(20,35-20,35)	(6,35-8,02)	21.778	5.863	3
VUgu2	Versicolor	21.90	6.84	(19,28-24,45)	(6,62-8,13)	24.846	5.414	3
BPca2	Versicolor	21.73	6.99	(19,45-23,49)	(6,37-8,31)	21.904	5.557	3
SPugra1	Versicolor	21.53	6.76	(19,05-23,35)	(5,98-7,59)	24.324	3.295	3
SVsnp11	Versicolor	21.47	7.64	(20,17-22,74)	(6,57-8,91)	20.163	N.D.	3
SSre4	Versicolor	21.38	6.14	(19,13-23,51)	(5,16-6,84)	19.884	4.675	3

De los aislamientos analizados, fue mayor el número de aislamientos con las células medias de la conidia versicoloras; solo se identificaron dos aislamientos con conidias concoloras (SSpla, VTman5), de los restantes, 46 aislamientos, 45 presentaron conidias versicoloras, con colores café claro u oscuro, el aislamiento VRlep, presentó conidias versicoloras con colores negro y gris (Figura 28 a y b; Tabla 7).

Jeewon y colaboradores (2003), estudiaron aislamientos provenientes de diferentes hospederos, principalmente de África, Asia e Islandia; ellos describieron aislamientos con conidias de entre 15 y 25 µm de largo promedio; adicionalmente algunas de las especies descritas por Maharachchikumbura y colaboradores (2012), presentan conidias con más de 30 µm de largo. Los aislamientos obtenidos a partir de guayaba tienen un rango más estrecho para los valores de longitud de la conidia (21,38 y 25,74 µm), lo que indica menor variación en el largo de la conidia.

El análisis estadístico solo mostró diferencias significativas entre los aislamientos VTman5 y SSpla que conforman un grupo, el aislamiento VRlep que por sí solo conforma otro grupo; todos los demás aislamientos compartieron características, por lo tanto la prueba de medias, no permitió separarlos (Anexo E). Los aislamientos VTman5 y SSpla se caracterizan por que son los que tienen en promedio las conidias más delgadas 5,42 y 5,13, respectivamente. La proporción largo/ancho es la mayor, respecto a los otros aislamientos, inclusive de VRlep que también tiene una proporción largo/ancho similar, pero con el ancho promedio de las conidias mas alto (5,94). Las conidias de los dos aislamientos concoloros se caracterizaron por tener conidias largas y delgadas (Tabla 7).

Es también destacable que los aislamientos SSpla y VTman5 tienen conidias concoloras; el aislamiento VRlep las tiene versicoloras (Tabla 7), pero a diferencia de los demás aislamientos es el único aislamiento cuyas células medias son de color gris, no café como todos los demás aislamientos incluidos en el análisis (Figura 29).

Se pudo observar que algunos aislamientos versicoloros tenían conidias de un café más claro que las otras, sin embargo no se tuvo en cuenta este carácter para separa grupos, ya que esta característica es también producto de la edad de la conidia, entre más jóvenes, más claras y también pueden ser afectadas por factores ambientales y medio de cultivo (Maharachchikumbura *et al.* 2011), mientras que el carácter de coloración de las células medias de la conidia es mucho más estable (Jeewon *et al.,* 2003).

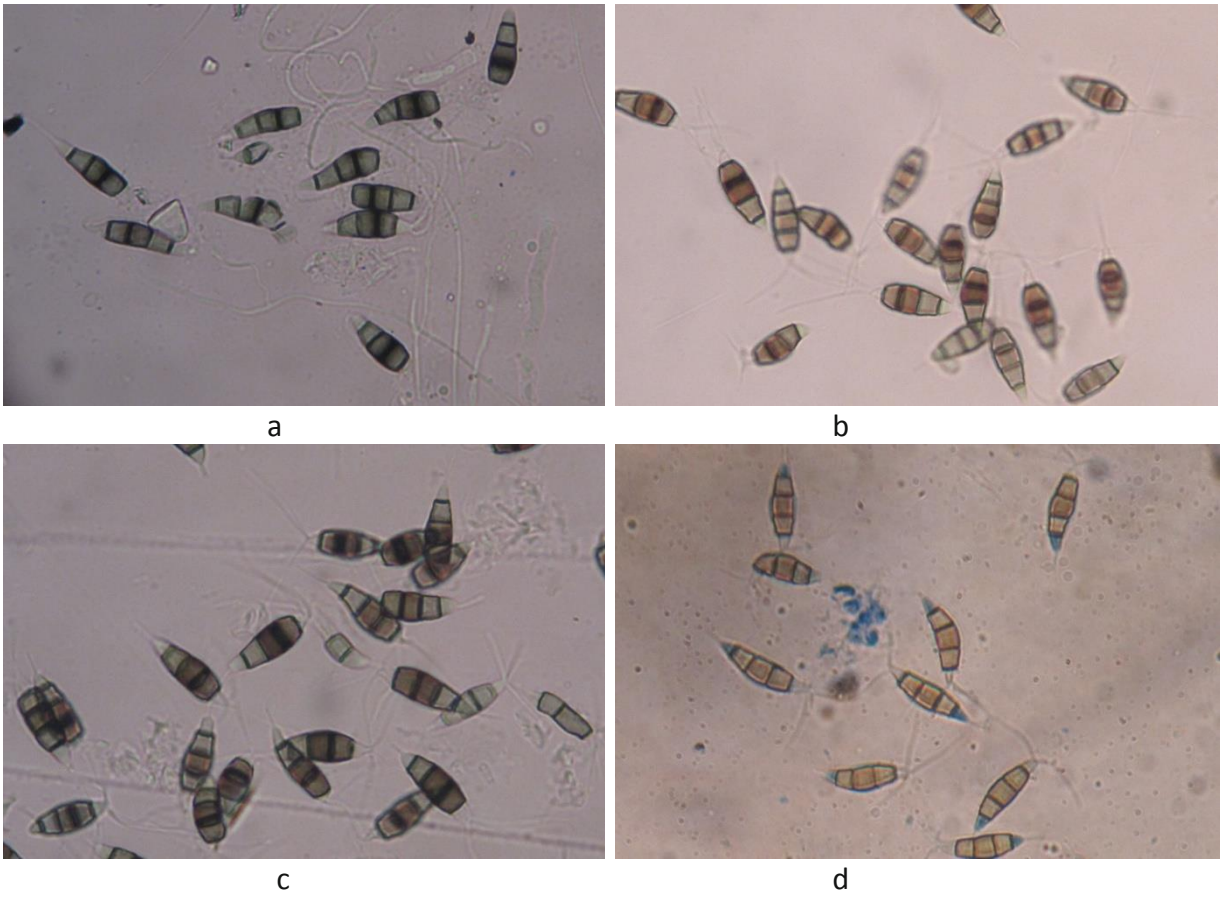


Figura 29. Coloraciones de conidias de *Pestalotiopsis* spp. a) Versicolora Gris (VRlep); b) Versicolora café claro (SVpo4); c) Versicolora café oscuro (SVsnp13); d) Concolora (VTman2).

5.4 Evaluación de variabilidad por Ap-PCR.

Se generó una matriz de 148 bandas polimórficas producto de la combinación de los cebadores CA, CGA, AG, CT y TG (Figura 30), con ésta, se hizo un análisis de agrupamiento en el software DARwin 5; el análisis de diversidad genética de las poblaciones de *Pestalotiopsis* spp. reveló que con un coeficiente DICE, a un nivel de similitud de 75% entre individuos, se generan dos grupos bien diferenciados, el grupo denominado B, notoriamente más numeroso que el grupo A. (Figura 31).

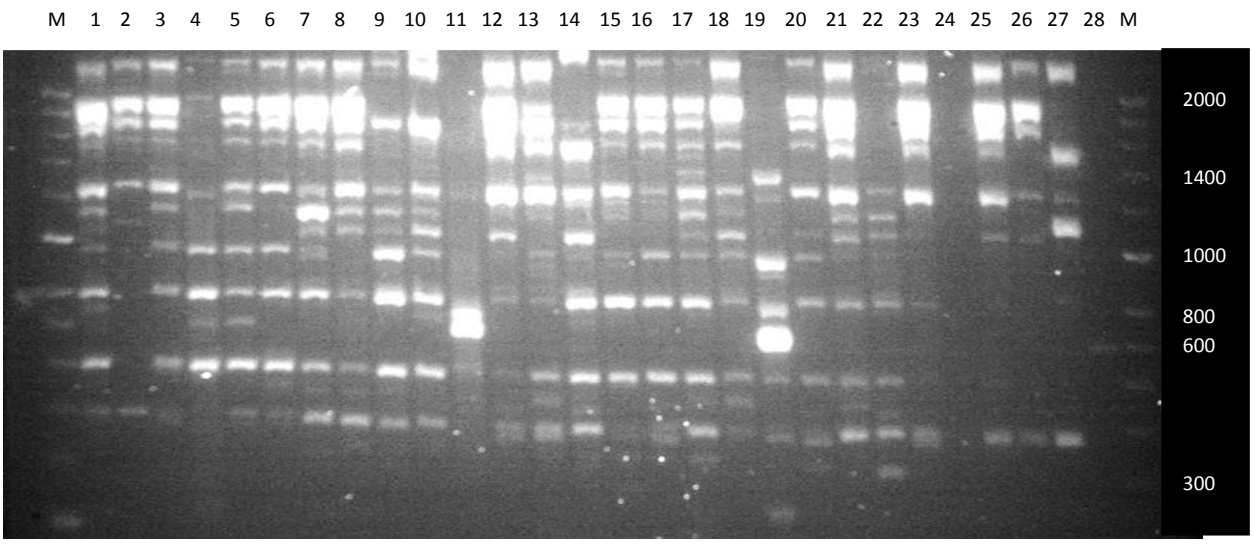


Figura 30. Perfiles electroforéticos de la amplificación de ADN de Pestalotiopsis spp. de guayaba con el cebador CGA. M: marcador de peso molecular Hyperlader II, 11 y 19 aislamiento de conidia con células medias concoloras, 24 control negativo.

En el filográma generado con los cebadores Ap-PCR, se pudo observar diferencias genéticas en el grupo A conformado por los aislamientos SSpla, SVsnp4, VTman5, VTsin2 y VTsin3, con un nivel de similitud DICE de 75%; con ese mismo nivel de similitud, todos los aislamientos del grupo B, son genéticamente iguales. (Figura 30).

El análisis de varianza molecular AMOVA resulto en una variación significativa entre los dos grupos conformados ($P<0,001$) con 17 % de variación, entre individuos la variación fue de 83 %, El grado de diferenciación genética entre poblaciones en términos de frecuencias alélicas fue de 0.172 (F_{ST}) lo cual se considera alto.

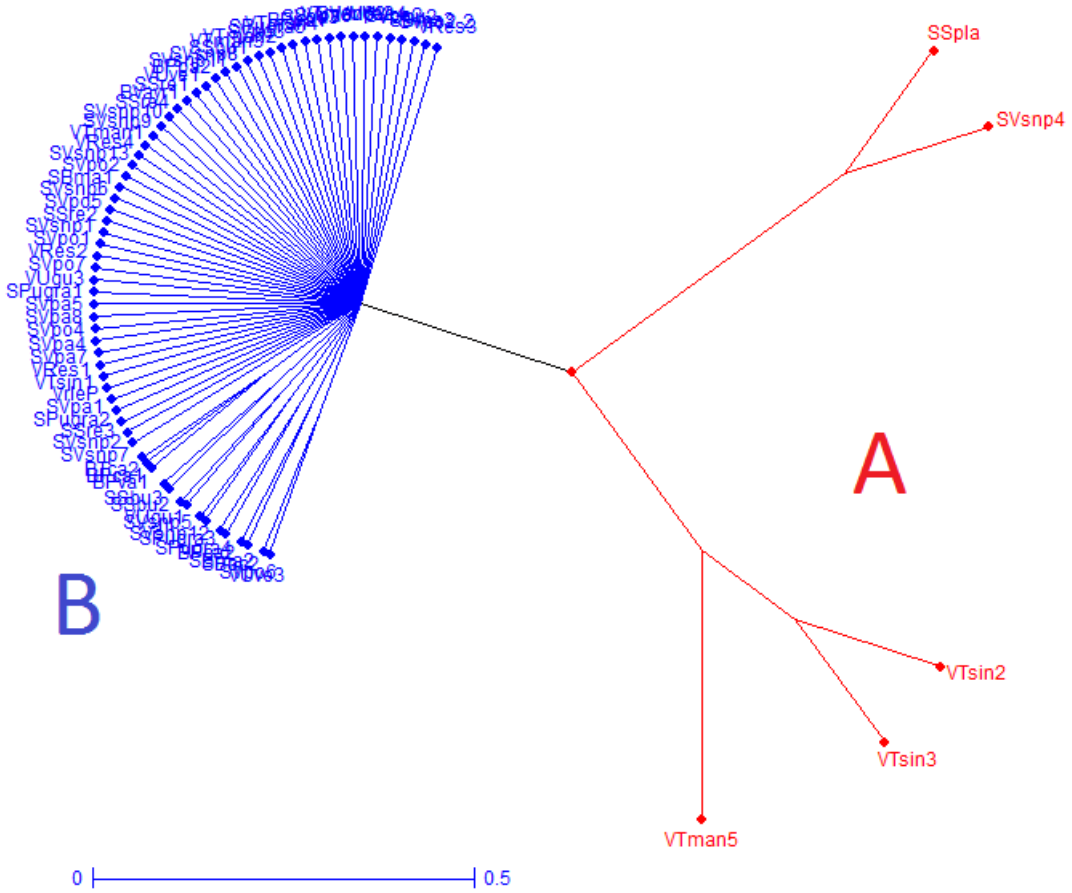


Figura 31. Filograma radial generado con el método UPGMA basado un coeficiente DICE de 75%, calculado con los datos combinados de cinco cebadores Ap-PCR de la estructura genética de los 81 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp.

Contrastando estos resultados, con los resultados de la caracterización morfológica microscópica, resulta llamativo que todos los aislamientos que esporularon y están en el grupo B, tienen conidias versicoloras (46 de 76; 59,2%) y todos los que esporularon y están en el grupo A, son concoloras (2 de 5; 40%). Estos resultados son interesantes, teniendo en cuenta que los estudios filogenéticos realizados con análisis de múltiples genes en esta especie, han mostrado que en este género las especies se agrupan de acuerdo a la morfología de la conidia, principalmente la coloración de las células medias (Maharachchikumbura *et al.* 2011 y 2012).

En un estudio similar Joshi y colaboradores (2009) usando cebadores RAPD e ISSR evaluaron la diversidad de aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. obtenidos de plantas de Té (*Camellia sinensis*) en la India, los aislamientos se agruparon de acuerdo a la región de

procedencia, en lugar de las características morfológicas, se generaron clados que contenían aislamientos concoloros y versicoloros agrupados. En nuestros resultados, no encontramos ninguna relación con la procedencia ó agresividad de los aislamientos.

En los estudios realizados por Jeewon y colaboradores (2003), Liu y colaboradores (2010), Maharachchikumbura y colaboradores (2012-2013), Zhang y colaboradores (2013), se demostró mediante análisis filogenéticos realizados con las secuencias de especies epitificadas, que los caracteres morfológicos de *Pestalotiopsis*, útiles para agrupar las especies, son los de la conidia; principalmente el color de las células medias, largo y ancho.

5.5 Análisis filogenético de genes múltiples.

En el análisis filogenético se incluyeron como referencia, 40 secuencias correspondientes a 25 especies de *Pestalotiopsis,* epitificadas y publicadas en artículos científicos, además de las secuencias de una especie muy relacionada filogéneticamente, *Seiridium* sp. para ser usado como outgroup, ya que pertenece a la misma familia de *Pestalotiopsis*.

Tabla 8. Especies epitificadas de *Pestalotiopsis* usadas en este estudio.

				GenBank		
Especie	**Aislamiento**	**Hospedero**	**Origen**	**ITS**	**β-tubulina**	***Tef-1***
P. adusta	MFLUCC10-0146	-	Thailand	JX399006	JX399037	JX399070
P. adusta *	ICMP6088	-	Fiji	JX399007	JX399038	JX399071
P. anacardiacearum *	IFRDCC 2397	*Mangifera indica*	China	KC247154	KC247155	KC247156
P. camelliae *	MFLUCC12-0277	*Camellia japonica*	China	JX399010	JX399041	JX399074
P. camelliae	MFLUCC 12-0278	*Camellia japonica*	China	JX399011	JX399042	JX399075
P. chrysea *	MFLUCC 12-0261	M. V. M.	China	JX398985	JX399020	JX399051
P. chrysea	MFLUCC 12-0262	M. V. M.	China	JX398986	JX399021	JX399052
P. clavata	MFLUCC 12-0269	M. V. M.	China	JX398990	JX399025	JX399056
P. clavata *	MFLUCC 12-0268	M. V. M.	China	JX398991	JX399026	JX399057
P. clavata	OP084	*Ornamental plants*	Thailand	KC537803	KC537817	KC537810
P. clavispora	MFLUCC 12-0280	M. V. M.	China	JX398978	JX399013	JX399044
P. clavispora	OP118	*Ornamental plants*	China	KC537808	KC537822	KC537815
P. diversiseta *	MFLUCC12-0287	M. V. M.	China	JX399009	JX399040	JX399073
P. ellipsospora *	MFLUCC 12-0283	M. V. M.	China	JX399016	JX399016	JX399047

P. ellipsospora	MFLUCC 12-0284	M. V. M.	China	JX399015	JX399015	JX399046
P. ericacearum*	IFRDCC 2439	*Rhododendron delavayi*	China	KC537807	KC537821	KC537814
P. foedans	CGMCC 3.9202	*Calliandra haematocephala*	China	JX398989	JX399024	JX399055
P. foedans	CGMCC 3.9178	*Dypsis decaryi*	China	JX398987	JX399022	JX399053
P. foedans *	CGMCC 3.9123	-	China	JX398988	JX399023	JX399054
P. furcata *	MFLUCC 12-0054	-	Thailand	JQ683724	JQ683708	JQ683740
P. gaultheria*	IFRD 411-014	*Gaultheria forrestii*	China	KC537805	KC537819	KC537812
P. inflexa *	MFLUCC 12-0270	M. V. M.	China	JX399008	JX399039	JX399072
P. intermedia *	MFLUCC 12-0259	M. V. M.	China	JX398993	JX399028	JX399059
P. jesteri	MFLUCC 12-0279	M. V. M.	China	JX399012	JX399043	JX399076
P. karstenii*	OP013	*Camellia japonica*	China	KC537806	KC537820	KC537813
P. linearis *	MFLUCC 12-0271	M. V. M.	China	JX398992	JX399027	JX399058
P. rhododendri*	OP086	*Rhododendron sinogrande*	China	KC537804	KC537818	KC537811
P. rosea *	MFLUCC12-0258	M. V. M.	China	JX399005	JX399036	JX399069
P. samarangensis *	MFLUCC 12-0233	*Syzygium samarangense*	Thailand	JQ968609	JQ968610	JQ968611
P. saprophyta *	MFLUCC 12-0282	M. V. M.	China	JX398982	JX399017	JX399048
P. theae	SC011	*Camellia sinensis*	Thailand	JQ683727	JQ683711	JQ683743
P. theae *	MFLUCC12-0055	*Camellia sinensis*	Thailand	JQ683726	JQ683710	JQ683742
P. trachicarpicola	MFLUCC12-0264	M. V. M.	China	JX399004	JX399035	JX399068
P. trachicarpicola	MFLUCC12-0263	M. V. M.	Thailand	JX399000	JX399031	JX399064
P. trachicarpicola	MFLUCC 12-0265	M. V. M.	China	JX399003	JX399034	JX399067
P. trachicarpicola	MFLUCC12-0266	M. V. M.	China	JX399002	JX399033	JX399066
P. trachicarpicola	OP143	*Podocarpus macrophyllus*	China	KC537809	KC537823	KC537816
P. trachicarpicola *	OP068	*Trachycarpus fortunei*	China	JQ845947	JQ845945	JQ845946
P. umberspora *	MFLUCC12-0285	M. V. M.	China	JX398984	JX399019	JX399050
P. unicolor	MFLUCC12-0275	M. V. M.	Thailand	JX398998	JX399029	JX399063
Seiridium sp.	SD096	*Camellia reticulate*	China	JQ683725	JQ683709	JQ683741

M. V. M. = Material Vegetal Muerto.
Seiridium sp. = outgroup.
* secuencias Ex-tipo y ex-epitipo.

Para que se entiendan mejor los resultados es importante explicar que Liu y colaboradores en el 2010, concluyeron que el gap en la región ITS ubicado entre el nucleótido 72 y el 135 (figura 32), está solo presente en las especies con conidias cuyas células medias son versicoloras y ausente en las especies cuyas células medias de la conidia son concoloras, además hay otras diferencias bien marcadas entre estos dos grupos a lo largo de las secuencias de ITS, β-tubulina y *Tef-1*, por ello en el Filograma generado está fuertemente ligado a esa característica morfológica que en el filograma están separadas por colores Azul y Rojo, versicoloras y concoloras respectivamente (Figura 33). Se tuvo que omitir del análisis a 12 aislamientos debido a que alguna de las tres secuencias (ITS, β-tubulina y *Tef-1*) no pudo ser leída o editada en los software Chromas Pro© versión 1.49 beta y Mega 5.2©.

Las secuencias editadas y alineadas de ITS, β-tubulina y *Tef-1* tuvieron una longitud total de 1962 lugares (con gaps); β-tubulina va desde el lugar 0 al 463, ITS va desde 464 hasta el 993 y *Tef-1* desde 994 hasta 1962. En el momento de la edición de las secuencias se pudieron diferenciar dos grupos versicoloro y concoloro, el primero y más numeroso con secuencias más cortas, de entre 1812 y 1824 nucleótidos sin gaps y el segundo con secuencias más largas, entre 1862 y 1891 nucleótidos sin gaps (figura 32).

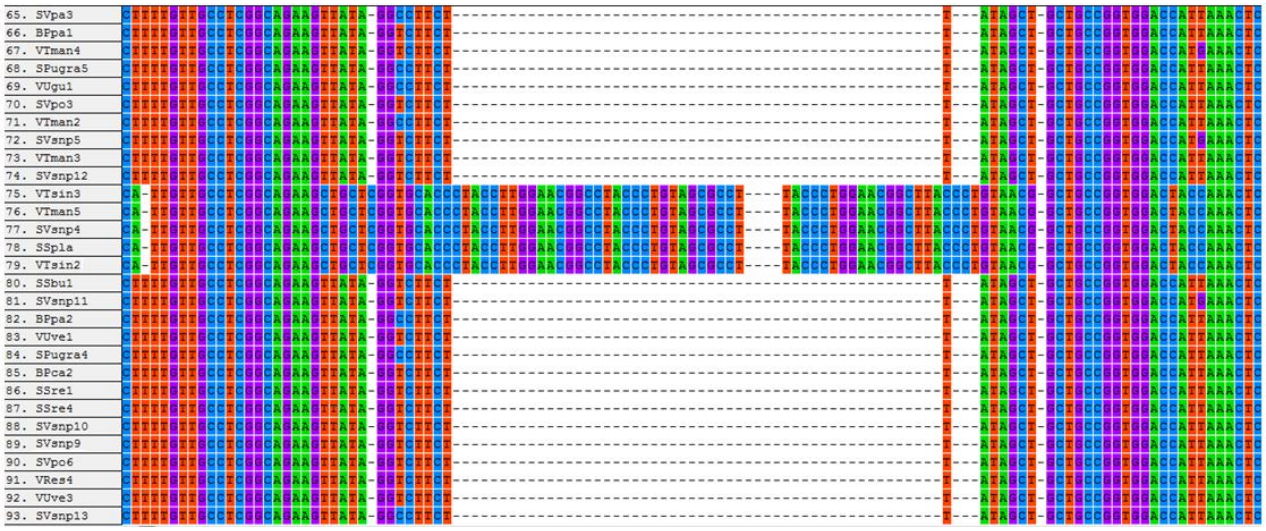


Figura 32. Gap en la región ITS ubicado entre la base 72 y la 135, Los aislamientos (SVsnp4, VTman5, VTsin3, VTsin2y SSpla) no lo tienen.

Los resultados muestran claramente que para las condiciones de este estudio, fueron más abundantes las especies de *Pestalotiopsis* de conidias versicoloras, asociadas a la guayaba; En el filograma, 65 de los aislamientos de *Pestalotiopsis* se ubicaron en el grupo de las especies con conidias versicoloras, distribuidos en 10 clados, seis de ellos están ubicados entre *P. aisatica* y *P. foedans,* uno entre *P. foedans* y *P. samaragensis*, dos entre *P. clavispora* y *P. saprophyta* y uno solo con un aislamiento por debajo de *P. saprophyta*; en el grupo de las especies con conidias concoloras se ubicaron cuatro aislamientos, tres de ellos ocupando dos clados entre *P. rosea y P. trachicarpicola* y otro (VTman5) entre *P. trachicarpicola* y *P. unicolor* (Figura 33).

El 81 % de los clados del filograma tiene una probabilidad mayor a 0.95 y otro 11, % tiene probabilidad posterior mayor a de 0.85. Las especies epitificadas de las que había más de una secuencia, quedaron bien agrupadas en un solo clado (Figura 33), ésta

conformación del filograma, concuerda plenamente con los resultados obtenidos por Maharachchikumbura *et al.* 2012, 2013, Zhang *et al.* 2013, Geng *et al.* 2013 donde se usaron las mismas especies epitificadas.

En este análisis ninguno de los aislamientos provenientes de guayaba se agrupó con alguna de las especies epitificadas; todos ellos se agruparon en clados aparte, solo se encontró similitud entre VUgu2 (clado 2) con *P. saprophyta* y VRlep (clado 4) con *P. foedans,* pero las secuencias difieren en 15 nucleótidos y 17 nucleótidos respectivamente.

En los clados 5, 7, 8 y 10 se forman sub-clados, estos sub-clados en promedio difieren en 8 a 15 nucleótidos; las diferencias entre los clados están en el rango de entre 22 y 26 nucleótidos, además de uno o más gaps; por ejemplo entre el clado 1 y 3 hay 23 nucleótidos de diferencia, además de un gap en las secuencias del clado 3 entre la posición 1145 y 1147; entre el clado 3 y 5 hay 23 nucleótidos de diferencia y dos gaps en las secuencias del clado 5, uno entre la posición 1145 y 1147 y el otro entre la posición 1166 y 1168; entre los aislamientos del clado 12 (grupo de los concoloros) y el clado 5 (grupo de los versicoloros) hay entre 208 y 233 nucleótidos diferentes, además de varios gaps, el más importante es el que está ubicado entre la posición 538 y 589 que poseen los del grupo 5 y todos los demás del grupo de los versicoloros, también resaltan los gaps en el clado 12 y que son comunes en las especies concoloras y ausentes en las especies versicoloras, estos están ubicados entre las posiciones 96 y 98, en la posición 505, entre 1138 y 1145, en la posición 1199, entre 1189 y 1199, entre 1291 y 1292, y el último entre 1478 y 1479.

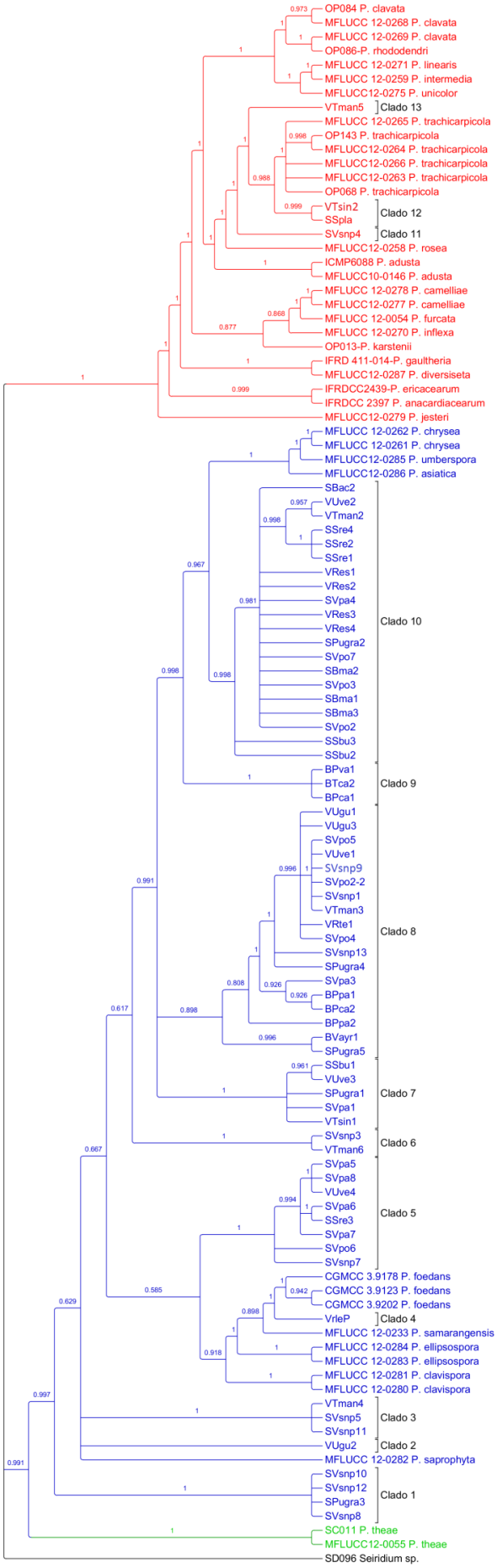


Figura 33. Filograma consenso generado con el software Mr. Bayes, usando la combinación de las secuencias ITS, β-tubulina y *Tef-1* de 70 aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. obtenidos a partir de guayaba y secuencias de 22 especies epitificadas, *Seiridium sp.* fue usado como outgroup.

Correlacionando los clados conformados con la agresividad de los aislamientos, no se encontró ningún tipo de relación; al contrastarla con la procedencia de los aislamientos se encontró que de los clados que están compuestos por más de un solo aislamiento, el clado 1, está compuesto únicamente por aislamientos provenientes de Santander y el clado 9 por aislamientos de Boyacá; todos los demás clados están mezclados con aislamientos de dos ó los tres departamentos (Figura 33).

Al contrastar los resultados, con la caracterización morfológica de las conidias, se observó que los aislamientos de guayaba que esporularon y tienen conidias concoloras, se agruparon con las especies epitificadas de conidias concoloras; de igual manera, los aislamientos con conidias versicoloras se agruparon con las especies epitificadas de conidias versicoloras; esto confirma también para los aislamientos de guayaba, que usando los cebadores ITS, β-tubulina y *Tef-1*, la característica de coloración de las células medias de la conidia, representa una importante variación genética, eso fue reportado inicialmente por Jeewon y colaboradores (2003) y luego confirmado por Liu y colaboradores (2010) y Maharachchikumbura y colaboradores (2012, 2013) (Figura 33).

Además de lo anterior, se logró confirmar que los cebadores Ap-PCR que se usaron para evaluar la diversidad, permitieron separar los aislamientos en grupos existentes en este género.

El análisis mostró una variabilidad genética importante en los aislamientos de *Pestalotiopsis*, teniendo en cuenta que los 69 aislamientos se agruparon en 13 clados y en algunos de esos clados, se formaron sub-clados. La posibilidad de encontrar más de una especie causando el clavo en guayaba ya se había demostrado en el estudio realizado por Keith y colaboradores (2006) donde encontraron, 5 especies de *Pestalotiopsis* (*P. microspora, P. clavispora, P disseminata, P. neglecta* y *Pestalotiopsis* sp. GJ-1) a partir de 23 aislamientos colectados en diferentes variedades de guayaba en Hawaii.

Para poder conocer realmente el número de especies encontradas en este estudio es necesario que un taxónomo experto en el género clasifique los aislamientos, ya que para la clasificación actual se valen de caracteres morfológicos más profundos que los estudiados en este trabajo de tesis.

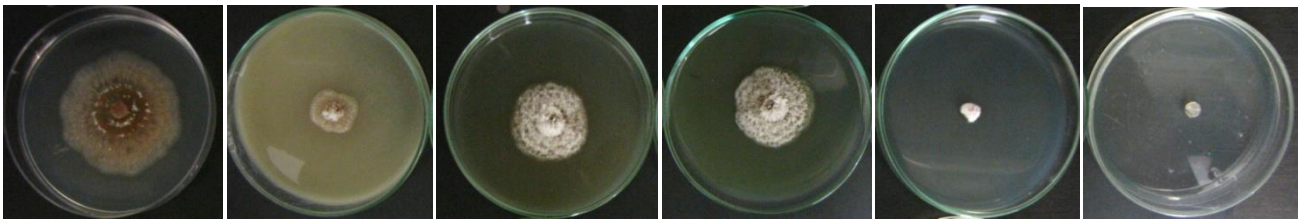
5.6 **Pruebas de inhibición de crecimiento.**

Las pruebas de inhibición de crecimiento se realizaron inicialmente probando varios extractos reportados en artículos científicos con actividad antifúngica (Katooli *et al.,* 2011; Baños *et al.,* 2004; Parada, 2005); se evaluaron los extractos de Eucalipto: *Eucaliptus grandis y E. globulus*, Menta :*Mentha aquatica*, Swinglea: *Swinglea glutinosa*, ajo: (*Allium sativum*) y Fique: *Furcraea andina* a concentraciones de 10, 20 y hasta 50% para probar si mostraban algún tipo inhibición de crecimiento contra *Pestalotiopsis* sp.. Los extractos se prepararon según las metodologías descritas en: Salazar y Betancourth (2009), Baños y otros (2004), se realizaron modificaciones recomendadas por técnicos y científicos de CIAT y UNAL Palmira; para los extractos acuosos se aumentaron las dosis hasta 50% (50 g de tejido vegetal por cada 100 ml de agua) y los aceites hasta 20%, al no mostrar un porcentaje de control se descartaron.

Eucalipto, Ajo y Menta no mostraron inhibición de crecimiento contra *Pestalotiopsis* sp. con extractos acuosos, los extractos oleosos se descartaron por la dificultad de crear un medio de cultivo sólido y apto para pruebas de inhibición con concentraciones por encima del 5% (Datos no mostrados). Los extractos de Fique y Swinglea fueron seleccionados porque mostraron inhibición incluso a bajas concentraciones, en extractos acuosos y soportaron esterilización en autoclave, lo que facilitó el trabajo de preparación.

Los resultados mostraron que a concentraciones de 2% el extracto de fique inhibe entre 93 y 100% el crecimiento de las especies de *Pestalotiopsis* seleccionadas para el ensayo, el extracto de fique al 5% inhibió el 100% del crecimiento de todos los aislamientos durante los 6 días evaluados, mostrando mejores resultados que el fungicida comercial (Figura 34).

VTman5



A B C D E F

VUgu2

A B C D E F

Figura 34. Pruebas de inhibición de crecimiento. Aislamiento; VTman5 (arriba), VUgu2 (abajo). A) Testigo; B) Fungicida comercial; C) Swinglea 2%; D) Swinglea 5%; E) Fique 2%; F) Fique 5%.

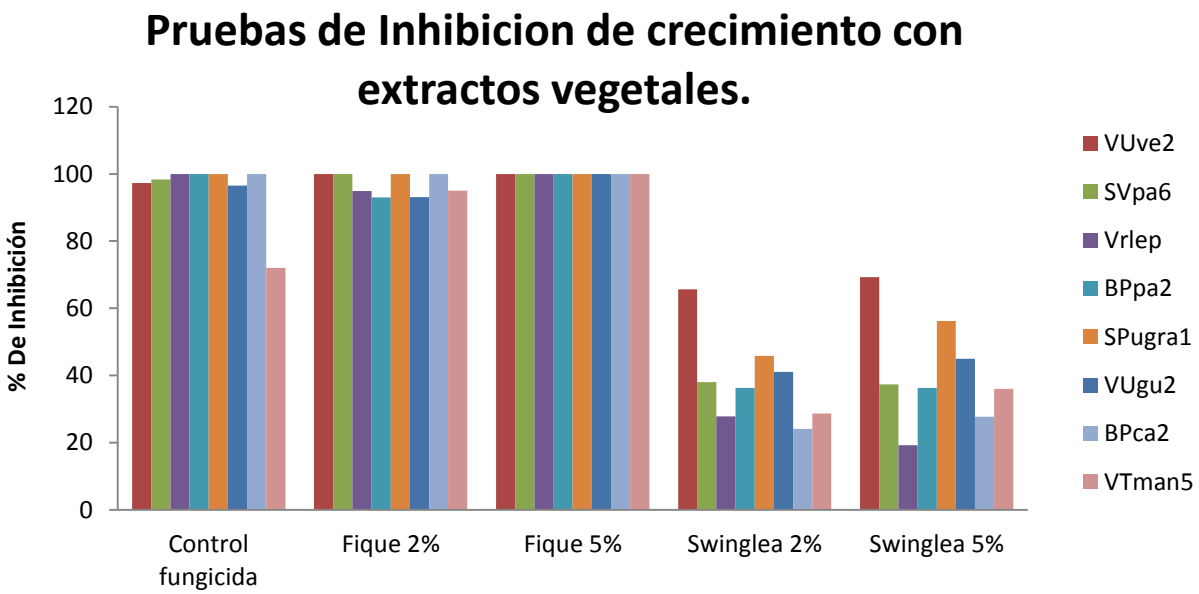


Figura 35. Inhibición del crecimiento de aislamientos de *Pestalotiopsis* spp. con extractos de Fique y Swinglea.

El extracto de Fique al 2 y 5% mostró mayor porcentaje de inhibición de crecimiento para el aislamiento VTman5 comparado con el fungicida comercial; el extracto de Fique inhibió el crecimiento el 95 y 100% a las concentraciones de 2 y 5% respectivamente, mientras que el fungicida comercial solo inhibió un 72% del crecimiento del mismo aislamiento (Figura 35).

El extracto de Swinglea al 2% inhibió el crecimiento de *Pestalotiopsis* entre un 28 y 66% y al 5% inhibió entre 19 y 69%. El extracto mostró mayor inhibición frente al aislamiento VUgu2 y la inhibición más baja con VRlep. Las dos concentraciones del extracto de Swinglea evaluadas, mostraron un comportamiento similar frente a casi todos los aislamientos (Figura 35).

El análisis estadístico mostró dos grupos el grupo A, conformado por el extracto de fique en sus dos concentraciones y el fungicida comercial; el grupo B conformado por el extracto de swinglea en sus dos concentraciones. Los tratamientos del grupo A fueron los que mejor inhibieron el crecimiento de los aislamientos de *Pestalotiopsis* sp.; los del grupo B, inhibieron en menor porcentaje el crecimiento de *Pestalotiopsis* sp. (Tabla 9).

Tabla 9. Prueba de rango múltiple para pruebas de inhibición del crecimiento de los aislamientos.

Duncan Agrupamiento	Media	N	Tratamiento
A	100	24	Fique5%
A	97	24	Fique2%
A	95.4	24	Fungicida
B	40.8	24	Swinglea5%
B	38.3	24	swinglea2%
C	0	24	Testigo

Prueba de rango múltiple de Duncan α= 0.05

El aislamiento VTman5 fue el único que logró disminuir el porcentaje de control del fungicida comercial a menos de 75% con los demás aislamientos su control estuvo por encima del 97%; el crecimiento del aislamiento VUve2 fue inhibido en mayor porcentaje con todos los tratamientos, comparado con los otros 7 aislamientos (Tabla 10, Anexo G).

Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los aislamientos con extractos de Fique y Swinglea.

	Testigo	Control fungicida	Fique 2%	Fique 5%	Swinglea 2%	Swinglea 5%
VUve2	0	97	100	100	66	69
SVpa6	0	98	100	100	38	37
Vrlep	0	100	95	100	28	19
BPpa2	0	100	93	100	36	36
SPugra1	0	100	100	100	46	56
VUgu2	0	97	93	100	41	45
BPca2	0	100	100	100	24	28
VTman5	0	72	95	100	29	36

Álvarez y colaboradores (2011) determinaron que el fique contiene saponinas, fitoesteroles y alcaloides, a los que ya otros autores han señalado como inhibidores de la actividad bacteriana y fúngica; la acción antifúngica de los alcaloides presentes en el extracto de fique podría deberse a la presencia de nitrógeno en su estructura como amina o amida infiriendo en el desarrollo del patógeno a evaluar (Fuentes *et al* 1998). Así mismo, en estudios de sensibilidad de *P. Infestans* utilizando saponinas, se encontró cierta inhibición del crecimiento micelial, aludiendo esta respuesta a la desactivación de la síntesis de varias enzimas a nivel de la célula y del metabolismo del oomycete (Preciado y Rangel, 2006, citado por Álvarez *et al.* 2011); Rojas 2008, también encontró una fuerte inhibición de crecimiento del extracto de fique sobre el crecimiento de varias especies de *Colletotrichum*.

6. Conclusiones.

Las especies de *Pestalotiopsis* spp. identificadas en este estudio poseen amplia variabilidad. Patogénica, genética y Morfológica; además de amplia dispersión en Colombia.

A diferencia de los aislamientos epitificados astáticos, se encontró mayor abundancia de especies versicoloras que concoloras.

La coloración de las células medias de la conidia es un carácter confiable para separar los principales grupos del género *Pestalotiopsis*.

Las especies asociadas a la enfermedad en guayaba en los departamentos en los que se hizo el estudio es grande, teniendo en cuenta la conformación de 13 clados en el análisis filogenético.

Los cebadores Ap-PCR usados permiten separar entre los dos grandes grupos existentes en el género, concoloros y versicoloros.

El extracto de fique al 5% mostro una alta efectividad en la inhibición del crecimiento de *Pestalotiopsis* spp. en condiciones In-Vitro.

7. Bibliografía

- Álvarez D. A., Salazar E. G., Hurtado M. A., Delgado D. M., Arango B. O. (2011) Sensibilidad in vitro de *Phytophthora infestans* al extracto de fique (*Furcraea gigantea* Vent.) y fungicidas sistémicos. Rev.Bio.Agro vol.9 no.2.

- Baños P. E., Zabaleta E., Colinas M. T., Luna I. y Gutiérrez J. G. (2004). Control biológico de *Colletotrichum gloesporioides* (PENZ. (PENZ. y SACC.)) en papaya Maradol roja (*Carica papaya* L.) y fisiología poscosecha de frutos infectados. Revista Mexicana de Fitopatología. 22(02) pp 198-205.

- Barnett H.L. and B.B. Hunter. (1998) Illustrated Genera of imperfect fungi. Fourth Edition. APS PRESS. St. Paul, Minnesota . USA. 218 pp.

- Begum, S., Hassan, S.I., Siddiqui, B.S., Shaheen, F., Ghayur, M.N., Gilani, A.H., 2002. Triterpenoids from the leaves of *Psidium guajava*. Phytochemistry 61, 399–403.

- Buriticá, P. 1999. Directorio de patógenos y enfermedades de las plantas de importancia económica en Colombia. Bogotá. 329 p. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín e Instituto Colombiano Agropecuario- ICA.

- De Notaris G (1839) Micromycetes italiei Dec II. Mere R Acad SciTorino II 3:80‑81

- Farfán P. D., Insuasty O. y Casierra F. (2006) Distribución espacio temporal y daño ocasionado por *Pestalotia* spp. en frutos de guayaba. Revista Corpoica, 7(2), 89-98.

- Fuertes, C., Alcarraz, M. y Vidalon, M. (1998) Flavonoides y alcaloides de *Lupinus ballianus* c.p. Smith con actividad antibacteriana y antifúngica. Ciencia e Investigación: Vol. 1 no. 2.

- Geng K., Zhang B., Song Y., Hyde K. D., Kang J. & Wang Y., (2013) A new species of *Pestalotiopsis* from leaf spots of *Licuala grandis* from Hainan, China. Phytotaxa 88 (3): 49–54.

- Guba EF (1961) Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia*. Harvard University Press, Cambridge.

- Hopkins KE, McQuilken MP (2000) Characteristics of *Pestalotiopsis* associated with hardy ornamental plants in the UK. Eur J Plant Pathol 106:77‑85

- Hu H. L., Jeewon R., Zhou D. Q., Zhou TX, Hyde K. D. (2007) Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and Ribes spp.: evidence from rDNA and β-tubulin gene phylogenies. Fungal Divers 24:1–22.

- Insuasty O., Monroy R., Díaz A. y Jorge B. (2006) Manejo fitosanitario del cultivo de la guayaba (*Psidium guajava* L.) en Santander. Corpoica e ICA 40 p

- Jeewon R., Liew E. C., Simpson J. A., Hodgkiss J. and Hyde K. D. (2003) . Phylogenetic significance of morphological characters in the taxonomy of *Pestalotiopsis* species. Molecular Phylogenetics and Evolution 27 372–383.

- Joshi S., Sanjay R., Baby U. I. and Mandal A. K. (2009) Molecular characterization of *Pestalotiopsis* spp. associated with tea (*Camellia sinensis*) in southern India using RAPD and ISSR markers. Indian journal of biotechnology, Vol 8, pp 377-383.

- Keith L. M., Velasquez M. E., and Zee F. T. (2006) Identification and Characterization of *Pestalotiopsis* spp. Causing Scab Disease of Guava, *Psidium guajava*, in Hawaii. Plant Dis. 90:16-23.

- Katooli K., Maghsodlo R. and Razavi S. E.. (2011) Evaluation of eucalyptus essential oil against some plant pathogenic fungi. Journal of Plant Breeding and Crop Science Vol. 3(2), pp. 41-43.

- Liu A. R., Chen S. C., Wu S. Y., Xu T., Guo L. D., Jeewon R., Wei J. G. (2010) Cultural studies coupled with DNA based sequence analyses and its implication on pigmentation as a phylogenetic marker in *Pestalotiopsis* taxonomy. Mol Phylogenet Evol 57:528–535.

- Maharachchikumbura S. N., Guo L. D., Chukeatirote E., Bahkali A. H. and Hyde K. D. (2011*)* *Pestalotiopsis*—morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity 50:167–187.

- Maharachchikumbura S. N., L. D., Chukeatirote E., Bahkali A. H & Wu W. P., Sun X., Crous P. W., Bhat D. J., McKenzie E. H. C., Bahkali A.H., Hyde K. D., (2012) A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species. Fungal Diversity, DOI 10.1007/s13225-012-0198-1.

- Maharachchikumbura S. N., Zhang Y., Wang Y. & Hyde K. D. (2013) *Pestalotiopsis anacardiacearum* sp. nov. (*Amphisphaeriaceae*) has an intricate relationship with *Penicillaria jocosatrix*, the mango tip borer. Phytotaxa 99 (2).

- Morera R. y Blanco H. (2009) Microorganismos asociados a frutos embolsados de guayaba taiwanesa variedad Tai Kuo1. Agronomía Mesoamericana 20(2):339-349.

- Morra C. S., Flores M. D. F., Ferreiraa A., Kuster M. L., Carvalhoc C. R., Clarindob W. R. (2012) Assessment of genetic diversity in *Psidium guajava* L. using different approaches. Scientia Horticulturae 148, 223‑229.

- Pachanawan A., Phumkhachorn P., Rattanachaikunsopon P. (2008) Potential of *Psidium guajava* Supplemented Fish Diets in Controlling Aeromonas hydrophila Infection in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal Bioscience And Bioengeenering. Vol. 106, No. 5, 419–424.

- Pandey R. R. (1988) Effect of Foliar Applications of Fungicides on the Phyllopiane Mycoflora and Fungal Pathogens of Guava. J. Phytopathology 123, 52—62

- Parada E. R. (2005). Evaluación de sustancias convencionales (Fungicidas químicos) y no convencionales (Extractos vegetales) para el control del agente causal de la peca del fruto en guayaba *Pestalotia versicolor* speg. en el municipio de Vélez (Santander). Trabajo de grado para optar el título de Biólogo, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia - UPTC. Tunja, Boyacá, 58.

- Perez R. M., Mitchell S. and Vargas R. (2008) *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. Journal of Ethnopharmacology 117 1–27.

- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. Molecular Biology and Evolution 25: 1253-1256.

- Pommer C.V., Murakami K.R.N. 2009. Breeding Guava (*Psidium guajava* L.), pp. 83-120. In: S.M. Jain y P.M. Priyadarshan (eds.). Breeding Plantario Tree Crops: Tropical Species. Springer Science Business Media. Vol 1.

- Prapagdee B., Tharasaithong L., Nanthaphot R. and Paisitwiroj C (2012). Efficacy of Crude Extract of Antifungal Compounds Produced from *Bacillus subtilis* on Prevention of Anthracnose Disease in *Dendrobium* Orchid. Environment Asia 5(1) (2012) 32-38.

- Rai, M. K., P. Asthana, et al. (2009). "Biotechnological advances in guava (*Psidium guajava* L.): recent developments and prospects for further research." Trees 24 (1): 1-12.

- Rehner SA, Samuels GJ (1994) Taxonomy and phylogeny of *Gliocladium* analysed from nuclear large subunit ribosomal DNA sequences. Mycol Res 98:625‑634.

- Rodríguez G. y Rangel C. (2005) Estudio del sistema agroalimentario localizado, SIAL, de la concentración de fábricas de bocadillo de guayaba en las provincias de Vélez y Ricaute en Colombia. CORPOICA, Barbosa 60 p.

- Rojas E. T. (2008) Identificación de estrategias de manejo de la antracnosis (*Glomerella cingulata* (STONEM.)) SPAULD & SCHRENK. del guanbano (*Annona muricata* L.) Tesis de maestría. Universidad de Caldas.

- Strobel, G.A. (2002). Rainforest endophytes and bioactive products. Critical Reviews in Biotechnology 22: 315-333.

- Tejesvi MV, Kini KR, Prakash HS, Subbiah V, Shetty HS (2007) Genetic diversity and antifungal activity of species of *Pestalotiopsis* isolated as endophytes from medicinal plants. Fungal Divers 24:37‑54.

- Xu J, Ebada SS, Proksch P (2010) *Pestalotiopsis* a highly creative genus: chemistry and bioactivity of secondary metabolites. Fungal Divers 44(1):15–31

- White T. J., Bruns T., Lee s., Tailor J. (1990) Amplification and direct secuensing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. (eds. M.A. Innis, D.H. Gelfand, J.J. Snisky and J.J. White) Academic Press, San Diego: 315-322.

- Watanabe K, Parbery DG, Kobayashi T, Doi Y (2000) Conidial adhesion and germination of *Pestalotiopsis neglecta*. Mycol Res 104(8):962‑968

- Zhang Y. M., Maharachchikumbura S. N., Tian Q. & Hyde K. D. (2013) *Pestalotiopsis* species on ornamental plants in Yunnan Province, China. Published online on june 10 in Sydowia.

- http://www.agronet.gov.co/agronetweb1/Estad%C3%ADsticas.aspx.

Anexo A. Listado de aislamientos de Pestalotiopsis spp. con datos de pasaporte.

DEPARTAMENTO	MUNICIPIO	VEREDA	FINCA	VARIEDAD	TEJIDO	FECHA DE COLECTA	FECHA DE PROCESA MIENTO	CODIGO
Boyacá	Pauna	Tune y Guamal	La Cabaña	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	BPca1
Boyacá	Pauna	Tune y Guamal	La Cabaña	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	BPca2
Boyacá	Pauna	Tune y Guamal	El Paraíso	Regional roja	Fruto	06-jul-12	10-jul-12	BPpa1
Boyacá	Pauna	Tune y Guamal	El Paraíso	Regional roja	Fruto	06-jul-12	10-jul-12	BPpa2
Boyacá	Pauna	Onda y Volcán	Valladolid	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	BPva1
Boyacá	Tununguá	Santa Rosa	Cangrejo	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	BTca1
Boyacá	Tununguá	Santa Rosa	Cangrejo	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	BTca2
Boyacá	Pauna	Tune y Guamal	La Aurora	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	BVayr1
Boyacá	Pauna	Tune y Guamal	La Aurora	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	BVayr2
Santander	Barbosa	Palma Baja	Agua Clara	Regional roja	Hoja	27-feb-12	03-mar-12	SBac1
Santander	Barbosa	Palma Baja	Agua Clara	Regional roja	Hoja	27-feb-12	03-mar-12	SBac2
Santander	Barbosa	Canoas	Mariela	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	SBma1
Santander	Barbosa	Canoas	Mariela	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	SBma2
Santander	Barbosa	Canoas	Mariela	Regional roja	Fruto	27-feb-12	03-mar-12	SBma3
Santander	Puente Nacional	Peñitas	La Gracia	Regional roja	Fruto	22-jun-12	26-jun-12	SPugra1
Santander	Puente Nacional	Peñitas	La Gracia	Regional roja	Fruto	22-jun-12	26-jun-12	SPugra2
Santander	Puente Nacional	Peñitas	La Gracia	Regional roja	Fruto	22-jun-12	26-jun-12	SPugra3
Santander	Puente Nacional	Peñitas	La Gracia	Regional roja	Fruto	22-jun-12	26-jun-12	SPugra4
Santander	Puente Nacional	Peñitas	La Gracia	Regional roja	Fruto	22-jun-12	26-jun-12	SPugra5
Santander	San Benito	Guanomo	Buenavista	Regional roja	Fruto	22-feb-12	02-ene-00	SSbu1
Santander	San Benito	Guanomo	Buenavista	Regional roja	Fruto	22-feb-12	02-ene-00	SSbu2
Santander	San Benito	Guanomo	Buenavista	Regional roja	Fruto	22-feb-12	02-ene-00	SSbu3
Santander	San Benito	Junco	El Placer	Regional roja	Fruto	22-feb-12	02-mar-12	SSpla
Santander	San Benito	Centro-Guanomo	El Recuerdo	Regional roja	Hoja	23-feb-12	03-ene-00	SSre1
Santander	San Benito	Centro-Guanomo	El Recuerdo	Regional roja	Hoja	22-feb-12	02-mar-12	SSre2
Santander	San Benito	Centro-Guanomo	El Recuerdo	Regional roja	Hoja	22-feb-12	02-mar-12	SSre3
Santander	San Benito	Centro-Guanomo	El Recuerdo	Regional roja	Hoja	22-feb-12	02-mar-12	SSre4
Santander	San Benito	Centro-Guanomo	El Recuerdo	Regional roja	Fruto	22-feb-12	02-mar-12	SSre5
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Hoja	20-jun-12	26-jun-12	SVpa1
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVpa2
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVpa3
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVpa4
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVpa5
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVpa6
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVpa7
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Paraíso	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVpa8
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Pomarrosal	Regional roja	Fruto	21-jun-12	26-jun-12	SVpo1
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Pomarrosal	Regional roja	Fruto	21-jun-12	26-jun-12	SVpo2
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Pomarrosal	Regional roja	Fruto	21-jun-12	26-jun-12	SVpo3
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Pomarrosal	Regional roja	Fruto	21-jun-12	26-jun-12	SVpo4
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Pomarrosal	Regional roja	Hoja	21-jun-12	26-jun-12	SVpo5

Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Pomarrosal	Regional roja	Fruto	23-jun-12	26-jun-12	SVpo6
Santander	Vélez	Aco y Peña Blanca	El Pomarrosal	Regional roja	Hoja	23-jun-12	26-jun-12	SVpo7
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp1
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Hoja	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp10
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp11
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp12
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp13
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Hoja	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp2
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp3
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp4
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Hoja	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp5
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp6
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp7
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Hoja	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp8
Santander	Vélez	San Pablo	San Pedro	Regional roja	Fruto	20-jun-12	26-jun-12	SVsnp9
Valle Del Cauca	Roldanillo	Remolino	Haz de Oro	Manzana	Fruto	06-jul-12	10-jul-12	VRes1
Valle Del Cauca	Roldanillo	Remolino	Haz de Oro	Manzana	Fruto	06-jul-12	10-jul-12	VRes2
Valle Del Cauca	Roldanillo	Remolino	Haz de Oro	Manzana	Fruto	06-jul-12	10-jul-12	VRes3
Valle Del Cauca	Roldanillo	Remolino	Haz de Oro	Manzana	Fruto	06-jul-12	10-jul-12	VRes4
Valle Del Cauca	Roldanillo	Remolino	La Esperanza	Pera	Fruto	26-ene-12	30-ene-12	VRleP
Valle Del Cauca	Roldanillo	Isugu	El Tesoro	Pera	Hoja	06-jul-12	10-jul-12	VRte1
Valle Del Cauca	Toro	Bohío	Los Mangos	Pera	Fruto	05-jul-12	10-jul-12	VTman1
Valle Del Cauca	Toro	Bohío	Los Mangos	Pera	Fruto	05-jul-12	10-jul-12	VTman2
Valle Del Cauca	Toro	Bohío	Los Mangos	Pera	Hoja	05-jul-12	10-jul-12	VTman3
Valle Del Cauca	Toro	Bohío	Los Mangos	Pera	Hoja	05-jul-12	10-jul-12	VTman4
Valle Del Cauca	Toro	Bohío	Los Mangos	Pera	Fruto	05-jul-12	10-jul-12	VTman5
Valle Del Cauca	Toro	Bohío	Los Mangos	Pera	Hoja	05-jul-12	10-jul-12	VTman6
Valle Del Cauca	Roldanillo	Puerto Quintero	El Porvenir	Pera	Fruto	27-ene-12	30-ene-12	VTpo
Valle Del Cauca	Toro	La Cayetana	Sinaí	Pera	Hoja	05-jul-12	26-jun-12	VTsin1
Valle Del Cauca	Toro	La Cayetana	Sinaí	Pera	Hoja	05-jul-12	26-jun-12	VTsin2
Valle Del Cauca	Toro	La Cayetana	Sinaí	Pera	Hoja	05-jul-12	26-jun-12	VTsin3
Valle Del Cauca	La Unión	San Rafael	La Guyana	Pera	Fruto	26-ene-12	28-ene-12	VUgu1
Valle Del Cauca	La Unión	San Rafael	La Guyana	Pera	Fruto	27-ene-12	28-ene-12	VUgu2
Valle Del Cauca	La Unión	San Rafael	La Guyana	Pera	Fruto	25-ene-12	28-ene-12	VUgu3
Valle Del Cauca	La Unión	San Rafael	El Guayabo	Pera	Fruto	25-ene-12	28-ene-12	VUgy
Valle Del Cauca	La Unión	Veraguas / El Guayabo	Veraguas	Pera	Fruto	23-ene-12	01-feb-12	VUve1
Valle Del Cauca	La Unión	Veraguas / El Guayabo	Veraguas	Coronilla	Fruto	24-ene-12	28-ene-12	VUve2
Valle Del Cauca	La Unión	Veraguas / El Guayabo	Veraguas	Pera	Fruto	24-ene-12	28-ene-12	VUve3
Valle Del Cauca	La Unión	Veraguas / El Guayabo	Veraguas	Pera	Fruto	26-ene-12	28-ene-12	VUve4

Anexo B. Prueba de medias de Agresividad asociando ABCDL y DL (ABCDL/DL).

The SAS System
The GLM Procedure
Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test for rablc

Means with the same letter are not significantly different.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	155
Error Mean Square	0.415427
Harmonic Mean of Cell Sizes	3.019868

													REGWQ Grouping	**Mean**	**N**	**Aisl**
									A					9.9516	3	SVpo5
		B							A					8.6915	3	VRes2
		B							A		C			8.4631	3	SVpa1
		B		D					A		C			8.1472	3	BVayr1
E		B		D					A		C			8.0694	3	VRte1
E		B		D					A		C			8.0652	3	VTman2
E		B		D					F		C			7.9454	3	VTman3
E		B		D					F		C		G	7.8982	3	VTman1
E		B		D					F	H	C		G	7.7904	3	SSbu1
E		B		D					F	H	C		G	7.7756	3	SVpo3
E		B		D		I			F	H	C		G	7.6655	3	SPugra5
E		B	J	D		I			F	H	C		G	7.4388	3	SVsnp6
E		B	J	D		I			F	H	C		G	7.4029	3	SVsnp12
E	K	B	J	D		I			F	H	C		G	7.3191	3	SVsnp7
E	K	B	J	D		I			F	H	C		G	7.3148	3	SVsnp10
E	K	B	J	D		I			F	H	C		G	6.9792	3	SVpo7
E	K	B	J	D		I			F	H	C		G	6.9563	3	SPugra1
E	K	B	J	D		I			F	H	C		G	6.9036	3	SBac2
E	K	M	J	D		I			F	H	C		G	6.5445	3	SSre5
E	K	M	J	D		I			F	H	C		G	N	6.3839	3	SVsnp8
E	K	M	J	D		I			F	H	O		G	N	6.3204	3	SVpo2-2
E	K	M	J	D		I			F	H	O		G	N	6.3072	3	SVsnp3
E	K	M	J	D		I			F	H	O		G	N	6.2878	3	VUve1
E	K	M	J	D		I			F	H	O		G	N	6.2743	3	SVsnp13
E	K	M	J	D		I			F	H	O		G	N	6.2161	3	BPca2
E	K	M	J	D		I			F	H	O		G	N	6.1941	3	VRes1
E	K	M	J	D		I			F	H	O	P	G	N	6.0909	3	SVsnp2
E	K	M	J	D		I			F	H	Q	O	P	G	N	6.0537	3	VTman5

E	K	M	J	D	I	F	H	Q	O	P	G	N	6.0410	3	SBma1
E	K	M	J	D	I	F	H	Q	O	P	G	N	6.0372	3	SSpla
E	K	M	J	R	I	F	H	Q	O	P	G	N	5.9768	3	SVpa3
E	K	M	J	R	I	F	H	Q	O	P	G	N	5.9624	3	SSre1
E	K	M	J	R	I	F	H	Q	O	P	G	N	5.9553	3	SVpo2
	K	M	J	R	I	F	H	Q	O	P	G	N	5.8675	3	SVpa7
	K	M	J	R	I		H	Q	O	P	G	N	5.7993	3	VUve3
	K	M	J	R	I		H	Q	O	P		N	5.7202	3	BTca2
	K	M	J	R	I		H	Q	O	P		N	5.7117	3	SSre2
	K	M	J	R	I		H	Q	O	P		N	5.7106	3	VRes3
	K	M	J	R	I		H	Q	O	P		N	5.6650	3	BPva1
	K	M	J	R	I		H	Q	O	P		N	5.6417	3	VUgu1
	K	M	J	R	I			Q	O	P		N	5.5927	3	VUgy
	K	M	J	R		S		Q	O	P		N	5.4939	3	VTsin3
	K	M	J	R		S		Q	O	P		N	5.4870	3	SVpo1
T	K	M	J	R		S		Q	O	P		N	5.4448	3	BPca1
T	K	M	J	R		S		Q	O	P		N	5.4314	3	SPugra2
T	K	M	J	R		S		Q	O	P		N	5.3030	3	SSre3
T	K	M		R		S		Q	O	P		N	5.2248	3	BPpa2
T	K	M		R		S		Q	O	P		N	5.2010	3	VRes4
T		M		R		S		Q	O	P	U	N	5.0617	3	SVsnp1
T		M		R		S	V	Q	O	P	U	N	4.9905	3	SVpa4
T		M		R		S	V	Q	O	P	U	N	4.9869	3	VTman6
T		M		R		S	V	Q	O	P	U	N	4.8967	3	SBma2
T		M		R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.8114	3	VUve2
T		M		R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.8050	3	SBma3
T		M	X	R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.6331	3	VTsin1
T		M	X	R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.5645	3	SVpa5
T		M	X	R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.5428	3	VTsin2
T		M	X	R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.5252	3	SVpo6
T		M	X	R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.4840	3	SSre4
T			X	R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.3290	3	SVsnp4
T			X	R	W	S	V	Q	O	P	U	N	4.3136	3	SBac1
T			X	R	W	S	V	Q	O	P	U		4.1678	3	SVpa6
T			X	R	W	S	V	Q	O	P	U		4.1439	3	BPpa1
T			X	R	W	S	V	Q		P	U		3.9706	3	BTca1
T		Y	X	R	W	S	V	Q			U		3.8959	3	VUve4
T		Y	X	R	W	S	V				U		3.8098	3	SVpo4
T		Y	X		W	S	V				U		3.4382	3	VUgu2
T		Y	X		W	S	V				U		3.4328	3	VrleP
T		Y	X		W	S	V				U		3.3830	3	SVsnp9
T		Y	X		W		V				U		3.3269	3	Vtpo
		Y	X		W		V				U		2.9479	3	SPugra3
		Y	X		W		V						2.9244	3	SSbu2
		Y	X		W								2.7364	3	SSbu3
		Y	X										2.6217	3	SVsnp11
		Y	X										2.5856	3	SVsnp5
		Y											1.8811	3	SVpa8

Anexo C. Coeficiente de correlación entre ABCDL y DL.

The SAS System

The CORR Procedure

2 Variables: ablc dl

Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
ablc	231	34.16218	19.84295	7891	2.65465	109.35910
dl	231	3.56084	0.97677	822.55500	1.30000	6.10000

Pearson Correlation Coefficients, N = 231
Prob > |r| under H0: Rho=0

	ablc	dl
ablc	1.00000	0.89024 <.0001
dl	0.89024 <.0001	1.00000

Anexo D. Separación de medias de tasa de crecimiento de Pestalotiopsis en medio de cultivo.

The SAS System
The GLM Procedure
Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test for TDC

Means with the same letter are not significantly different.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	160
Error Mean Square	0.24501

REGWQ Grouping									Means	N	Aisl
						A			16.8833	3	SSbu1
		B				A			16.6667	3	SVsnp8
		B				A			16.6667	3	VTman1
		B				A		C	16.4667	3	VUve3
		B		D		A		C	15.6167	3	SVsnp3
		B		D		A		C	15.5500	3	SVpa1
E		B		D		A		C	15.3833	3	BVayr1
E		B		D		F		C	15.3333	3	VTman2
E		B		D		F		C	G	15.3000	3	VTman3
E		H		D		F		C	G	15.0833	3	SBma1
E		H		D		F		C	G	15.0833	3	SPugra2
E		H		D		F		C	G	14.9667	3	SVpo3
E		H		D		F		C	G	14.9500	3	SVsnp11
E		H		D		F		I	G	14.8833	3	VUve2
E		H		D		F		I	G	14.8500	3	SBac2
E		H		D		F		I	G	14.8500	3	VRes2
E		H		D		F		I	G	14.8000	3	SPugra1
E		H		D		F	J	I	G	14.7167	3	SVpo7
E		H		D		F	J	I	G	14.7167	3	SVpa4
E		H		D		F	J	I	G	14.6333	3	SPugra5
E		H		D	K	F	J	I	G	14.4500	3	BPpa2
E		H		D	K	F	J	I	G	14.4333	3	SVpo5
E		H		D	K	F	J	I	G	14.4333	3	VTsin3
E		H	L	D	K	F	J	I	G	14.1333	3	VRte1
E	M	H	L	D	K	F	J	I	G	14.0500	3	SSbu2
E	M	H	L	D	K	F	J	I	G	14.0500	3	SSre5
E	M	H	L	N	K	F	J	I	G	13.8000	3	SVsnp12
	M	H	L	N	K	F	J	I	G	13.7333	3	SVpa3

	M	H	L	N	K		J	I	G	13.6833	3	SVsnp7
	M	H	L	N	K		J	I	G	13.6833	3	SVsnp2
	M	H	L	N	K	O	J	I		13.6333	3	SVsnp1
	M	H	L	N	K	O	J	I		13.6333	3	BPva1
	M	H	L	N	K	O	J	I		13.5333	3	VTman5
	M	H	L	N	K	O	J	I		13.5333	3	VRes4
	M	P	L	N	K	O	J	I		13.2500	3	BTca2
	M	P	L	N	K	O	J	I		13.2500	3	SVpo2
	M	P	L	N	K	O	J			13.1667	3	VUgy
	M	P	L	N	K	O	J	Q		13.1000	3	VTsin2
	M	P	L	N	K	O	J	Q		13.1000	3	SVsnp9
R	M	P	L	N	K	O		Q		12.9333	3	SVpa8
R	M	P	L	N		O		Q	S	12.7500	3	VUve1
R	M	P	L	N		O	T	Q	S	12.7000	3	BPca2
R	M	P	L	N		O	T	Q	S	12.6833	3	SSre3
R	M	P	L	N		O	T	Q	S	12.6667	3	SSre2
R	M	P	L	N		O	T	Q	S	12.6667	3	SSbu3
R	M	P	L	N		O	T	Q	S	12.6333	3	VUgu1
R	M	P	L	N	U	O	T	Q	S	12.5000	3	SVpo1
R	M	P	L	N	U	O	T	Q	S	12.5000	3	SVsnp13
R	M	P		N	U	O	T	Q	S	12.4833	3	VTman6
R		P	V	N	U	O	T	Q	S	12.2500	3	SVsnp6
R		P	V	N	U	O	T	Q	S	12.2500	3	SVpo6
R		P	V	N	U	O	T	Q	S	12.2167	3	VTsin1
R		P	V	N	U	O	T	Q	S	12.1667	3	SVpa7
R		P	V	W	U	O	T	Q	S	12.0000	3	SVsnp5
R		P	V	W	U		T	Q	S	11.8000	3	BPca1
R		P	V	W	U		T	Q	S	11.8000	3	SVpa6
R		P	V	W	U		T	Q	S	11.6833	3	SBac1
R		P	V	W	U		T	Q	S	11.6333	3	SSpla
R		P	V	W	U		T	Q	S	11.6333	3	SBma3
R			V	W	U		T	Q	S	11.5167	3	VRes1
R			V	W	U		T	Q	S	11.4667	3	VUve4
R			V	W	U		T		S	11.4500	3	SVpa5
			V	W	U		T		S	11.2667	3	SPugra4
			V	W	U	X	T			11.1000	3	VUgu2
			V	W	U	X				10.9833	3	SPugra3
			V	W	U	X				10.9833	3	SVpo4
			V	W	U	X				10.9667	3	BTca1
			V	W		X				10.8333	3	VRes3
			V	W		X				10.8333	3	VrleP
				W		X				10.4500	3	SVsnp4
		Y				X				9.7167	3	BPpa1

Anexo E. Prueba de medias Relación Largo Ancho (Largo/Ancho) de las conidias de *Pestalotiopsis* spp.

Relación largo ancho de conidias
Promedios Vs varianza - variable: ancho data:a
The GLM Procedure
Ryan-Einot-Gabriel-Welsch Multiple Range Test for L A

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	855
Error Mean Square	0.101783
Harmonic Mean of Cell Sizes	19.99782

REGWQ Grouping						Mean	N	Aisl
			A			4.5879	20	VTman5
			A			4.4103	20	SSpla
			B			4.1565	20	VRlep
			C			3.8711	20	BPva1
			C			3.8705	20	SVpa6
			C			3.8549	20	SVpa8
			C			3.8357	20	SVsnp8
			C			3.8097	20	VTman1
	D		C			3.7425	20	SSre4
	D		C			3.7411	20	SVpa3
	D		C	E		3.7190	20	Sbac2
	D		C	E		3.7047	20	SBma1
	D		C	E		3.6981	20	SSre1
	D		C	E		3.6897	20	BPca1
	D		F	E		3.5915	20	BPpa2
	D	G	F	E		3.5787	20	VTpo
	D	G	F	E		3.5717	20	SVpa4
	D	G	F	E		3.5632	20	BTca2
	D	G	F	E		3.5581	20	SSbu2
	H	G	F	E		3.5276	20	Vres1
	H	G	F	E		3.5233	20	SVpa5
	H	G	F	I		3.4909	20	Svsnp2
	H	G	F	I		3.4751	20	Vres4
J	H	G	F	I		3.4542	20	SPugra5
J	H	G	F	I	K	3.4216	20	SVsnp13
J	H	G	F	I	K	3.4043	20	VUve3

J	H	G	F	I	K	3.4013	20	VUve1
J	H	G	F	I	K	3.3969	20	SVpa2
J	H	G	L	I	K	3.3928	20	Svpo3
J	H	M	L	I	K	3.3550	20	BTca1
J	H	M	L	I	K	3.3453	20	SSre2
J	H	M	L	I	K	3.3407	20	VTman3
J	N	M	L	I	K	3.3126	20	VUgu3
J	N	M	L	I	K	3.3019	20	SVpo5
J	N	M	L	I	K	3.2954	20	SBma2
J	N	M	L		K	3.2708	20	Vres3
	N	M	L	O	K	3.2513	20	VUve4
	N	M	L	O		3.1963	20	SPugra1
	N	M		O		3.1868	20	VUgu2
	N			O		3.1340	20	VTsin3
	N			O		3.1323	20	VUve2
	N			O		3.1276	20	BPca2
			P	O		3.0606	20	SVsnp3
	Q		P			2.9269	20	VUgu1
	Q					2.8585	20	SVsnp11
	Q					2.8418	20	SVpo4

Anexo F. Datos de agrupamiento de análisis de diversidad con marcadores Ap-PCR con el método UPGMA en el software DARwin5.

Tree construction
Dissimilarity file: menos 40A+.dis
Tree file : menos 40a+.arb
Method: UPGMA
Threshold equality % = 0
Dissimilarity min value = 0.227272727272727
Dissimilarity max value = 1
75 selected units on 75
Selected unit list:

Number	Unit	Num	Ais
1	1		VRes3
2	2		SVpo2-2
3	3		SBma3
4	4		VUgu2
5	5		SVpa2
6	6		VUve4
7	7		BVayr2
8	8		BTca2
9	9		VUve2
10	10		SSbu3
11	11		SVsnp4
12	12		SVsnp3
13	13		VTman6
14	14		SVpa6
15	15		SVpa3
16	16		BPpa1
17	17		VTman4
18	18		SPugra5
19	19		VUgu1
20	20		SVpo3
21	21		VTman2
22	22		SVsnp5
23	23		VTman3
24	24		SVsnp12
25	25		VTsin3
26	26		SSbu1
27	27		SVsnp8
28	28		SPugra3
29	29		SVsnp11
30	30		BPpa2
31	31		VTman5
32	32		VUve1
33	33		SPugra4
34	34		BPca2
35	35		SSre1
36	36		BVayr1
37	37		SSre4
38	38		SVsnp10
39	39		SVsnp9
40	40		VTsin2
41	41		SBma2
42	42		VTman1
43	43		SBac2
44	44		SVpo6
45	45		VRes4
46	46		VUve3
47	47		SVsnp13
48	48		SVpo2
49	49		SBma1
50	50		SVsnp6
51	51		BPca1
52	52		SVpo5

53	53	SSre2
54	54	SVsnp1
55	55	SVpo1
56	56	VRes2
57	57	SVpo7
58	58	VUgu3
59	59	SPugra1
60	60	SVpa5
61	61	SVpa8
62	62	SVpo4
63	63	SVpa4
64	64	SSbu2
65	65	SVpa7
66	66	VRes1
67	67	BPva1
68	68	VTsin1
69	69	VrleP
70	70	SSpla
71	71	SVpa1
72	72	SPugra2
73	73	SSre3
74	74	SVsnp2
75	75	SVsnp7

Iteration: 1	Current number of elements: 75	Grouping level =0.227	Next level = 0.25	
Node: 76	grouping: 52 54			
Iteration: 2	Current number of elements: 74	Grouping level =0.25	Next level = 0.254	
Node: 77	grouping: 8 67			
Iteration: 3	Current number of elements: 73	Grouping level =0.254	Next level = 0.267	
Node: 78	grouping: 11 70			
Iteration: 4	Current number of elements: 72	Grouping level =0.267	Next level = 0.272	
Node: 79	grouping: 77 51			
Iteration: 5	Current number of elements: 71	Grouping level =0.272	Next level = 0.277	
Node: 80	grouping: 44 46			
Iteration: 6	Current number of elements: 70	Grouping level =0.277	Next level = 0.333	
Node: 81	grouping: 56 57			
Iteration: 7	Current number of elements: 69	Grouping level =0.333	Next level = 0.346	
Node: 82	grouping: 10 64			
Iteration: 8	Current number of elements: 68	Grouping level =0.346	Next level = 0.361	
Node: 83	grouping: 75 73			
Iteration: 9	Current number of elements: 67	Grouping level =0.333	Next level = 0.371	
Node: 84	grouping: 41 43			
Iteration: 10	Current number of elements: 66	Grouping level =0.367	Next level = 0.371	
Node: 85	grouping: 81 68	58		
Iteration: 11	Current number of elements: 64	Grouping level =0.371	Next level = 0.375	
Node: 86	grouping: 19 22			
Iteration: 12	Current number of elements: 63	Grouping level =0.375	Next level = 0.377	
Node: 87	grouping: 25 40			
Iteration: 13	Current number of elements: 62	Grouping level =0.377	Next level = 0.38	
Node: 88	grouping: 33 34			
Iteration: 14	Current number of elements: 61	Grouping level =0.38	Next level = 0.384	
Node: 89	grouping: 60 61			
Iteration: 15	Current number of elements: 60	Grouping level =0.384	Next level = 0.387	
Node: 90	grouping: 72 76			
Iteration: 16	Current number of elements: 59	Grouping level =0.396	Next level = 0.4	
Node: 91	grouping: 24 28			

Iteration: 17	Current number of elements: 58			Grouping level =0.4	Next level = 0.404
Node: 92	grouping:	20	21		
Iteration: 18	Current number of elements: 57			Grouping level =0.404	Next level = 0.415
Node: 93	grouping:	18	45		
Iteration: 19	Current number of elements: 56			Grouping level =0.415	Next level = 0.419
Node: 94	grouping:	91	27		
Iteration: 20	Current number of elements: 55			Grouping level =0.419	Next level = 0.428
Node: 95	grouping:	65	63		
Iteration: 21	Current number of elements: 54			Grouping level =0.428	Next level = 0.433
Node: 96	grouping:	35	47		
Iteration: 22	Current number of elements: 53			Grouping level =0.433	Next level = 0.434
Node: 97	grouping:	39	74		
Iteration: 23	Current number of elements: 52			Grouping level =0.434	Next level = 0.441
Node: 98	grouping:	23	26		
Node: 99	grouping:	37	48		
Iteration: 24	Current number of elements: 50			Grouping level =0.441	Next level = 0.444
Node: 100	grouping:	69	90		
Iteration: 25	Current number of elements: 49			Grouping level =0.444	Next level = 0.46
Node: 101	grouping:	15	16		
Iteration: 26	Current number of elements: 48			Grouping level =0.46	Next level = 0.461
Node: 102	grouping:	100	85		
Iteration: 27	Current number of elements: 47			Grouping level =0.461	Next level = 0.478
Node: 103	grouping:	29	36		
Iteration: 28	Current number of elements: 46			Grouping level =0.478	Next level = 0.479
Node: 104	grouping:	12	13		
Iteration: 29	Current number of elements: 45			Grouping level =0.479	Next level = 0.479
Node: 105	grouping:	79	95		
Iteration: 30	Current number of elements: 44			Grouping level =0.479	Next level = 0.491
Node: 106	grouping:	17	86		
Iteration: 31	Current number of elements: 43			Grouping level =0.491	Next level = 0.493
Node: 107	grouping:	88	38		
Iteration: 32	Current number of elements: 42			Grouping level =0.5	Next level = 0.505
Node: 108	grouping:	2	101		
Node: 109	grouping:	59	103		
Iteration: 33	Current number of elements: 40			Grouping level =0.505	Next level = 0.508
Node: 110	grouping:	99	97		
Iteration: 34	Current number of elements: 39			Grouping level =0.508	Next level = 0.516
Node: 111	grouping:	107	96		
Iteration: 35	Current number of elements: 38			Grouping level =0.516	Next level = 0.52
Node: 112	grouping:	87	31		
Iteration: 36	Current number of elements: 37			Grouping level =0.52	Next level = 0.52
Node: 113	grouping:	9	83		
Iteration: 37	Current number of elements: 36			Grouping level =0.525	Next level = 0.527
Node: 114	grouping:	102	89		
Iteration: 38	Current number of elements: 35			Grouping level =0.533	Next level = 0.533
Node: 115	grouping:	98	30		
Iteration: 39	Current number of elements: 34			Grouping level =0.533	Next level = 0.548
Node: 116	grouping:	110	109		
Iteration: 40	Current number of elements: 33			Grouping level =0.548	Next level = 0.556

Node: 117 grouping: 49 84

Iteration: 41 Current number of elements: 32 Grouping level =0.556 Next level = 0.556
Node: 118 grouping: 105 113

Iteration: 42 Current number of elements: 31 Grouping level =0.556 Next level = 0.556
Node: 119 grouping: 108 53

Iteration: 43 Current number of elements: 30 Grouping level =0.556 Next level = 0.559
Node: 120 grouping: 3 93

Iteration: 44 Current number of elements: 29 Grouping level =0.56 Next level = 0.563
Node: 121 grouping: 71 55

Iteration: 45 Current number of elements: 28 Grouping level =0.563 Next level = 0.563
Node: 122 grouping: 32 115

Iteration: 46 Current number of elements: 27 Grouping level =0.563 Next level = 0.564
Node: 123 grouping: 111 92

Iteration: 47 Current number of elements: 26 Grouping level =0.564 Next level = 0.565
Node: 124 grouping: 1 4

Iteration: 48 Current number of elements: 25 Grouping level =0.565 Next level = 0.569
Node: 125 grouping: 123 80

Iteration: 49 Current number of elements: 24 Grouping level =0.569 Next level = 0.576
Node: 126 grouping: 14 114

Iteration: 50 Current number of elements: 23 Grouping level =0.576 Next level = 0.58
Node: 127 grouping: 118 62

Iteration: 51 Current number of elements: 22 Grouping level =0.58 Next level = 0.582
Node: 128 grouping: 119 82

Iteration: 52 Current number of elements: 21 Grouping level =0.585 Next level = 0.586
Node: 129 grouping: 121 126

Iteration: 53 Current number of elements: 20 Grouping level =0.586 Next level = 0.594
Node: 130 grouping: 120 116

Iteration: 54 Current number of elements: 19 Grouping level =0.601 Next level = 0.603
Node: 131 grouping: 129 66

Iteration: 55 Current number of elements: 18 Grouping level =0.603 Next level = 0.604
Node: 132 grouping: 94 125

Iteration: 56 Current number of elements: 17 Grouping level =0.604 Next level = 0.607
Node: 133 grouping: 128 106

Iteration: 57 Current number of elements: 16 Grouping level =0.607 Next level = 0.61
Node: 134 grouping: 127 131

Iteration: 58 Current number of elements: 15 Grouping level =0.61 Next level = 0.613
Node: 135 grouping: 130 122

Iteration: 59 Current number of elements: 14 Grouping level =0.621 Next level = 0.625
Node: 136 grouping: 135 132

Iteration: 60 Current number of elements: 13 Grouping level =0.631 Next level = 0.64
Node: 137 grouping: 133 134

Iteration: 61 Current number of elements: 12 Grouping level =0.644 Next level = 0.646
Node: 138 grouping: 124 137

Iteration: 62 Current number of elements: 11 Grouping level =0.65 Next level = 0.657
Node: 139 grouping: 136 117

Iteration: 63 Current number of elements: 10 Grouping level =0.664 Next level = 0.684
Node: 140 grouping: 138 139

Iteration: 64 Current number of elements: 9 Grouping level =0.684 Next level = 0.703

Node: 141 grouping: 5 6

Iteration: 65 Current number of elements: 8 Grouping level =0.703 Next level = 0.706
Node: 142 grouping: 50 42

Iteration: 66 Current number of elements: 7 Grouping level =0.706 Next level = 0.73
Node: 143 grouping: 140 104

Iteration: 67 Current number of elements: 6 Grouping level =0.73 Next level = 0.732
Node: 144 grouping: 7 141

Iteration: 68 Current number of elements: 5 Grouping level =0.732 Next level = 0.79
Node: 145 grouping: 112 78

Iteration: 69 Current number of elements: 4 Grouping level =0.79 Next level = 0.801
Node: 146 grouping: 143 144

Iteration: 70 Current number of elements: 3 Grouping level =0.803 Next level = 0.846
Node: 147 grouping: 146 142

Last group
Node 148 grouping: 145 147

Edges and lengths

1	--	124	:	0.282051282051282
2	--	108	:	0.25
3	--	120	:	0.278388278388279
4	--	124	:	0.282051282051282
5	--	141	:	0.342105263157895
6	--	141	:	0.342105263157895
7	--	144	:	0.365151515151515
8	--	77	:	0.125
9	--	113	:	0.260081391046985
10	--	82	:	0.166666666666666
11	--	78	:	0.127450980392157
12	--	104	:	0.239130434782609
13	--	104	:	0.239130434782609
14	--	126	:	0.284500615572405
15	--	101	:	0.222222222222222
16	--	101	:	0.222222222222222
17	--	106	:	0.23992673992674
18	--	93	:	0.202127659574468
19	--	86	:	0.185714285714285
20	--	92	:	0.2
21	--	92	:	0.2
22	--	86	:	0.185714285714285
23	--	98	:	0.217391304347826
24	--	91	:	0.19811320754717
25	--	87	:	0.1875
26	--	98	:	0.217391304347826
27	--	94	:	0.207828282828283
28	--	91	:	0.19811320754717
29	--	103	:	0.230769230769231
30	--	115	:	0.266522988505747
31	--	112	:	0.25801282051282
32	--	122	:	0.28176607343274
33	--	88	:	0.188888888888889
34	--	88	:	0.188888888888889
35	--	96	:	0.214285714285714
36	--	103	:	0.230769230769231
37	--	99	:	0.217391304347826
38	--	107	:	0.245798319327731
39	--	97	:	0.216981132075472
40	--	87	:	0.1875
41	--	84	:	0.180851063829787
42	--	142	:	0.351851851851852
43	--	84	:	0.180851063829787
44	--	80	:	0.136363636363636
45	--	93	:	0.202127659574468
46	--	80	:	0.136363636363636
47	--	96	:	0.214285714285714
48	--	99	:	0.217391304347826

49	--	117	:	0.274283071230342
50	--	142	:	0.351851851851852
51	--	79	:	0.133780332056194
52	--	76	:	0.113636363636363
53	--	119	:	0.278144299668298
54	--	76	:	0.113636363636363
55	--	121	:	0.280487804878049
56	--	81	:	0.138888888888889
57	--	81	:	0.138888888888889
58	--	85	:	0.183760683760684
59	--	109	:	0.25
60	--	89	:	0.19047619047619
61	--	89	:	0.19047619047619
62	--	127	:	0.288254714028638
63	--	95	:	0.209677419354838
64	--	82	:	0.166666666666666
65	--	95	:	0.209677419354838
66	--	131	:	0.300777218376433
67	--	77	:	0.125
68	--	85	:	0.183760683760684
69	--	100	:	0.22068356054387
70	--	78	:	0.127450980392157
71	--	121	:	0.280487804878049
72	--	90	:	0.192295839753467
73	--	83	:	0.173076923076923
74	--	97	:	0.216981132075472
75	--	83	:	0.173076923076923
76	--	90	:	7.86594761171033E-02
77	--	79	:	0.008780332056194
78	--	145	:	0.238776613302773
79	--	105	:	0.106062659274562
80	--	125	:	0.1463371477707
81	--	85	:	4.48717948717947E-02
82	--	128	:	0.12337780853399
83	--	113	:	8.70044679700618E-02
84	--	117	:	9.34320074005552E-02
85	--	102	:	4.62735004282035E-02
86	--	106	:	5.42124542124545E-02
87	--	112	:	7.05128205128205E-02
88	--	107	:	0.056909430438842
89	--	114	:	0.072497659963066
90	--	100	:	2.83877207904031E-02
91	--	94	:	9.71507528111276E-03
92	--	123	:	8.19074696151524E-02
93	--	120	:	7.62606188138105E-02
94	--	132	:	9.40793409102373E-02
95	--	105	:	0.030165571975917
96	--	111	:	3.97845530122475E-02
97	--	110	:	3.57714345068824E-02
98	--	115	:	0.049131684157921
99	--	110	:	3.53612622345279E-02
100	--	102	:	9.35062364501732E-03
101	--	108	:	0.027777777777778
102	--	114	:	3.29396662503693E-02
103	--	109	:	0.019230769230769
104	--	143	:	0.113916949073958
105	--	118	:	3.81863503777526E-02
106	--	133	:	0.062546896889972
107	--	111	:	8.27194797023101E-03
108	--	119	:	2.81442996682977E-02
109	--	116	:	1.69985643312807E-02
110	--	116	:	1.42459977489268E-02
111	--	123	:	2.78372023171904E-02
112	--	145	:	0.108214773182109
113	--	118	:	1.79479506615234E-02
114	--	126	:	2.15267651331489E-02
115	--	122	:	0.015243084926993
116	--	130	:	2.64285613442769E-02
117	--	139	:	5.08372208729879E-02
118	--	127	:	0.01022537232013
119	--	128	:	1.19001755323587E-02
120	--	130	:	1.50388472872791E-02

121	--	129	:	1.24367699259905E-02
122	--	135	:	2.36755739490089E-02
123	--	125	:	7.93314519184574E-04
124	--	138	:	4.02093967156006E-02
125	--	132	:	1.92068396041831E-02
126	--	129	:	8.42395923163408E-03
127	--	134	:	1.53652706075008E-02
128	--	133	:	1.24291616160556E-02
129	--	131	:	7.85264357239374E-03
130	--	135	:	1.20145217061914E-02
131	--	134	:	2.8427662597057E-03
132	--	136	:	9.02595235778259E-03
133	--	137	:	1.32409078395122E-02
134	--	137	:	1.20945600200853E-02
135	--	136	:	5.49192871455367E-03
136	--	139	:	1.41867160070275E-02
137	--	138	:	6.54613411065841E-03
138	--	140	:	9.82540970880763E-03
139	--	140	:	6.96579637236011E-03
140	--	143	:	2.09612953808765E-02
141	--	144	:	2.30462519936205E-02
142	--	147	:	4.98605928514557E-02
143	--	146	:	4.22346601308795E-02
144	--	146	:	3.01305288359311E-02
145	--	148	:	5.80197371919791E-02
146	--	147	:	6.4304007158616E-03
147	--	148	:	2.25348861836011E-02

Edge length sum = 19.1928455430484

Anexo G. Separación de medias para pruebas de inhibición de crecimiento usando extractos vegetales.

Procedimiento ANOVA
Prueba del rango múltiple de Duncan para INHIB

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	138
Error de cuadrado medio	84.87621

Número de medias	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
Rango crítico	**5.259**	**5.535**	**5.719**	**5.854**	**5.959**

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Duncan Agrupamiento	**Media**	**N**	**Trata**
A	100	24	FIQ5%
A	97	24	FIQ2%
A	95.4	24	FUNG
B	40.8	24	SW5%
B	38.3	24	SW2%
C	0	24	TEST