

# “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”



## UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

### CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

#### TESIS DE GRADO

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS  
FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria vesca*) EN EL  
SECTOR DE SALACHE BARBAPAMBA, CANTÓN SALCEDO,  
COTOPAXI 2015”**

**Tesis de grado presentada como requisito previo a la obtención del Título de  
Ingeniero Agrónomo.**

**AUTOR:**

**Miguel Angel Tomalo Guanoluisa**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**Ing. Mg. Karina Marín**

**COTOPAXI**

**2015**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA**

Yo, **MIGUEL ÁNGEL TOMALO GUANOLUISA**, con cédula de ciudadanía N° 050277941-6, libre y voluntariamente declaro que la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE FRESA (*Fragaria vesca*) EN EL SECTOR DE SALACHE BARBAPAMBA, CANTON SALCEDO, COTOPAXI 2015.”**, es original, auténtica y personal. En virtud, declaro que el contenido será de mi sola responsabilidad legal y académica.

---

Miguel Angel Tomalo Guanoluisa

C.I. 0502779416

## **AVAL DE DIRECTOR DE TESIS**

Cumpliendo con lo estipulado en el capítulo V Art. 12, literal f del Reglamento del Curso Profesional de la Universidad Técnica de Cotopaxi, en calidad de Directora del Tema de Tesis: **“Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) en el sector de Salache Barbapamba Cantón Salcedo, Cotopaxi - 2015”**, debo confirmar que el presente trabajo de investigación fue desarrollado de acuerdo con los planteamientos requeridos.

En virtud de lo antes expuesto, considero que se encuentra habilitado para presentarse al acto de Defensa de Tesis, la cual se encuentra abierta para posteriores investigaciones.

---

Ing. Mg. Karina Marín

## **AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

En calidad de miembros de Tribunal de la Tesis Titulada: “**Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) en el sector de Salache Barbapamba Cantón Salcedo, Cotopaxi - 2015**”, de autoría del egresado Miguel Angel Tomalo Guanoluisa, CERTIFICAMOS que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones al presente documento.

### **Aprobado por:**

Ing. Mg. Karina Marín

**DIRECTORA DE TESIS**

---

Ing. Mg. Guadalupe López

**PRESIDENTA**

---

Ing. Agr. Santiago Jiménez

**OPOSITOR**

---

Ing. Agr. Fabián Troya

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

## DEDICATORIA

Esta tesis la dedico a mis padres como son Ángel y Florcita, a todos mis hermanos, hermanas en especial a Paulina y Anita por brindarme su cariñosa y sincera confianza; a toda mi familia que me dio su apoyo incondicional y a Dios por bendecirme con la fuerza de voluntad inagotable para continuar siempre adelante.

Como también a todos mis amigos que me alentaron y animaron a continuar en mi meta sin desmayar, de igual manera a aquellos que pensaron que no lo lograría porque la verdad me llenaron de aliento y orgullo para demostrarles lo contrario.

A mis compañeros amigos, que me acompañaron en este duro camino con quienes compartí muchos momentos inolvidables.

Por ultimo a las personas que llegaron a mi vida, Luisa, Lizeth, Katherin quienes fueron mi verdadera inspiración para llegar a estudiar en la Universidad y ser un profesional.

*Gracias por todo los quiero mucho...*

MIGUEL TOMALO

## **AGRADECIMIENTO**

Primero agradezco a Dios por toda las bendiciones que he recibido en el momento indicado y por estar a mi lado en cada paso que doy, lo cual me ayudado a salir adelante de toda las adversidades de la vida.

A la Universidad Técnica De Cotopaxi, en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica, quien me ha dado la oportunidad de poder formarme en este proceso de enseñanza - aprendizaje mediante la trasmisión de conocimientos, destrezas y sabiduría necesaria para poder defender con optimismo en la vida profesional.

A los docentes de la Unidad Académica de Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales “CAREN”, por su tiempo, dedicación, y compromiso de sembrar la semilla del conocimiento.

Mi eterno y sincero agradecimiento la Ing. Mg. Karina Marín Directora de Tesis por su invaluable dirección en el desarrollo de este trabajo de investigación por compartir sus conocimientos, como también a todas las personas, amigos que me apoyaron y confiaron en mí para culminar este trabajo de investigación.

Muchas Gracias...  
MIGUEL TOMALO

# ÍNDICE DE CONTENIDO

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	i
AVAL DE DIRECTOR DE TESIS .....	ii
AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL .....	iii
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE IMÁGENES .....	viii
TABLA DE GRÁFICOS .....	viii
RESUMEN.....	ix
ABSTRACT .....	x
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN .....	4
OBJETIVOS.....	6
PREGUNTA DIRECTRIZ.....	7
CAPÍTULO I.....	8
1 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA .....	8
1.1. El cultivo de fresa.....	8
1.2. Clasificación taxonómica.....	9
1.3.1. Moho gris ( <i>Botrytis cinerea</i> ) .....	9
CAPITULO II .....	17
2. MATERIALES Y MÉTODO .....	17
2.1. Materiales .....	17
2.1.1 Institucionales.....	17

2.1.2. Recursos Humanos .....	17
2.1.3. Material De Campo .....	18
2.1.4. Recursos tecnológicos .....	18
2.2. Diseño metodológico.....	20
2.2.1. Investigación descriptiva.....	20
2.3. Método.....	20
2.3.1. Métodos lógicos .....	21
2.3.2. Técnica .....	21
2.4. Delimitación del lugar de recolección.....	22
2.4.1. Ubicación Política .....	22
2.4.2. Ubicación Geográfica .....	22
2.5. Diagnóstico del cultivo.....	23
2.5.1. Toma de muestras.....	23
2.5.2. Procedimientos en la toma de muestra .....	23
2.6. Preparación del medio de cultivo PDA .....	24
2.6.1. Aislamiento directo.....	24
2.6.2. Inoculación en PDA .....	25
2.6.3. Incubación .....	25
2.6.4. Caracterización .....	26
2.6.5. Descripción .....	26
<b>CAPITULO III.....</b>	<b>28</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>28</b>
3.1. Determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en el cultivo de fresa ( <i>Fragaria vesca</i> ).....	28
3.2. Signos y síntomas .....	29



3.3. Caracterización de macro y micro estructuras de Botrytis ( <i>Botrytis cinerea</i> ).....	30
<b>3.3.1. Macro estructura .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.2. Micro estructuras.....</b>	<b>31</b>
3.4. Ciclo de vida.....	36
3.5. Elaboración de una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo Botrytis ( <i>Botrytis cinerea</i> ) como se presenta en el campo. ....	38
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>RECOMENDACIONES: .....</b>	<b>41</b>
<b>GLOSARIO .....</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA: .....</b>	<b>44</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Clasificación taxonómica de la fresa .....	9
<b>Tabla 2:</b> Rangos de temperatura para el desarrollo de la enfermedad .....	10
<b>Tabla 3:</b> Clasificación taxonómica de la botrytis en fresa. ....	11
<b>Tabla 4:</b> Condiciones edafoclimáticos .....	22

## ÍNDICE DE IMÁGENES

<b>Imagen 1:</b> Cultivo de fresa ( <i>Fragaria vesca</i> ).....	28
<b>Imagen 2:</b> Signos y síntomas de Botrytis en racimo floral y fruto de fresa .....	30
<b>Imagen 3:</b> Evolución del micelio en el medio de cultivo PDA Botrytis ( <i>Botrytis cinerea</i> ).....	31
<b>Imagen 4 :</b> Observación de micelio Botrytis ( <i>Botrytis cinerea</i> ). ....	32
<b>Imagen 5:</b> Observación de conidióforos de Botrytis ( <i>Botrytis cinerea</i> ).....	33
<b>Imagen 6:</b> Observación de conidios de Botrytis ( <i>Botrytis cinerea</i> ). ....	34
<b>Imagen 7:</b> Dimensiones de las microestructuras de Botrytis ( <i>Botrytis cinerea</i> ). ....	35

## TABLA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Ciclo de vida de botrytis .....	37
--	----

## RESUMEN

La presente investigación consiste en desarrollar la “**caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) en el sector de Salache Barbapamba Cantón Salcedo Provincia de Cotopaxi 2015**”, con las coordenadas latitud: 1° 3' 0" S, longitud: 78° 35' 0" W y una altitud: 2480 msnm, el objetivo es caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno de mayor impacto en producción de fresa (*Fragaria vesca*), mediante la identificación de signos y síntomas en campo, para caracterizar macro y microestructuras, describir el ciclo de vida y elaborar una guía didáctica.

La investigación se basó en la observación directa, para identificar los signos y síntomas del hongo, se capturan imágenes macroestructurales, para la caracterización morfológica se utilizó un microscopio Trinocular CX31 con adaptación para cámara infinity 1, se capturan imágenes microestructurales como son: (micelio, conidióforos, conidios), utilizando lentes de 20x y 40x. Mediante la visita y bibliografías consultadas se identifica el hongo fitopatógeno de mayor impacto en fresa (*Fragaria vesca*), que es *Botrytis (Botrytis cinerea)*, los signos y síntomas son: manchas irregulares color café, frutos cubiertos por un micelio de color gris. En el laboratorio se observó macroestructuras como micelio aéreo algodonoso blanquecino y finalmente color café. Las microestructuras identificadas son: micelio con 19.83  $\mu\text{m}$  tabicadas y alargadas, conidióforos con 24  $\mu\text{m}$  con conidios en sus extremos y los conidios con 5.7  $\mu\text{m}$  de forma esféricas. El hongo se desarrolló en una temperatura de 23.5 °C y su ciclo de vida se cumplió a los 6 días de haber realizado el cultivo. Con toda esta información se desarrolló una guía didáctica.

Se recomienda que la presente investigación se use y sirva como base para determinar los factores que influyen en la producción agrícola (control del patógeno en sus diferentes estadios, microclima, humedad, nutrición) para garantizar una agricultura de precisión.

## ABSTRACT

This research is to develop the "morphological characterization of plant pathogenic fungi in the cultivation of strawberry (*Fragaria vesca*) in the field of Salache Barbapamba Salcedo Canton province of Cotopaxi 2015" with the latitude coordinates: 1 ° 3 '0 "S, longitude 78 ° 35 '0 "W and altitude: 2480 meters above sea level, the goal is to characterize the plant pathogenic fungus morphologically greatest impact on production of strawberry (*Fragaria vesca*), by identifying signs and symptoms in the field, to characterize macro and microstructures describe the life cycle and develop a tutorial.

The research was based on direct observation, to identify the signs and symptoms of the fungus, macro-images are captured, for the morphological characterization Trinocular microscope CX31 with adaptation to infinity chamber 1 was used as microstructural images are captured: (mycelium, conidiophores, conidia) using 20x and 40x lenses. By visiting and bibliographies consulted the phytopathogenic fungus greatest impact on strawberry (*Fragaria vesca*), which is Botrytis (*Botrytis cinerea*), identifies the signs and symptoms include irregular brown spots, fruits covered by a gray mycelium. In the laboratory macrostructures as cottony-white aerial mycelium and finally brown it was observed. The microstructures are identified: 19.83 septate mycelium elongated .mu.m, 24 .mu.m conidiophores with conidia at their ends and conidia with 5.7 .mu.m spherical shape. The fungus was grown in a temperature of 23.5 ° C and its life cycle is completed after 6 days of making the crop. With all this information a teaching guide was developed.

It is recommended that this research be used and serve as a basis for determining the factors that influence agricultural production (control of the pathogen in different stages, microclimate, humidity, nutrition) to ensure precision agriculture.

# INTRODUCCIÓN

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son los causantes de enfermedades de pre y poscosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo estos responsables de pérdidas económicas cuantiosas; el daño que ocasiona no solo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. (AGRIOS, 2005).

La producción mundial de fresa ronda los 3,6 millones de toneladas, y el principal productor es Estados Unidos, seguido de España que el año pasado produjo 264.000 toneladas, de las que el 96% corresponden a la producción de fresa andaluza, y de ello, el 97% procede de Huelva, mientras que el volumen de facturación supera los 300 millones de euros. Con respecto a la exportación, España se sitúa a la cabeza, sobre todo en producción en fresco, destinando en torno al 25% de ella a los mercados europeos y alrededor del 10% a otros mercados internacionales. (AGRO, 2013).

Para 2007, Ecuador produjo 30 000 toneladas mensuales de fruta. Pero desde el 2008, hasta la fecha, hubo un descenso de la producción por los cambios climáticos. En los últimos meses de 2009 causó escasez en el mercado, por la falta de maduración oportuna. Sin embargo, empieza a normalizarse. El inconveniente es que en el país no hay plantaciones extensivas para la exportación. Los agricultores siembran en terrenos de 1 000 metros a una hectárea. (AGRIOS, 2005).

En Pichincha la zona de mayor producción de fresas está en el valle noroccidental de Quito. Aunque no hay datos estadísticos se cree que la zona produce entre 5 mil a 6 mil cajas diarias de frutilla. Yaruquí, Pifo, Tababela,

Checa, Quinche, Ascázubi son algunas de las parroquias más productivas de fresa en el país. El cultivo tiene un 20% de incremento anual. (AGRIOS, 2005).

De la misma manera una amplia gama de hongos han sido caracterizados como causantes del deterioro patológico en la fresa entre los más comunes se pueden mencionar:

**Mildiu**, del pie del fresal (*Phytophthora cactorum* L. C. Schroet). Enfermedad vascular que se manifiesta por el colapsamiento de las plantas jóvenes. El corazón de la planta aparece con una necrosis marrón. **Verticilosis** del fresal (*Verticilium albo-atrum* Reinke et Berth). Enfermedad vascular que se manifiesta por marchitamiento marginal e internervial de las mismas. **Otras enfermedades de pie** (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytium*, etc.). Pueden ocasionar daños de diversa consideración en las raíces. **Oídio** (*Sphaeroteca* ssp.). En el periodo de crecimiento puede atacar produciendo folíolos doblados en torno al nervio central y recubiertos de un polvillo blanco en el envés de la hoja. **Podredumbre gris** de los frutos (*Botrytis cinerea*). En algunos casos esta enfermedad es capaz de atacar hasta el 95% de frutos después de 48 horas de cosechados. (ANGELFIRE, 2001).

Los patógenos más importantes que causan elevadas pérdidas de frutas y hortalizas son normalmente bacterias y hongos, sin embargo, con mayor frecuencia son especies de hongos las causantes del deterioro patológico de frutas, hojas, tallos, y productos subterráneos (raíces, tubérculos, cornos, etc.). Algunas fuentes estiman que dichas pérdidas son del orden de 5-25% en países desarrollados y 20-50% en países en desarrollo. (FHIA, 2007).

La gran mayoría de estas infestaciones son tratadas y eliminadas durante la pre-cosecha, sin embargo existen enfermedades que son de gran importancia en la post-cosecha y que no tienen un tratamiento químico para su erradicación y pueden causar grandes pérdidas. La más común es el moho gris *Botrytis cinerea*

ya que este microorganismo posee la habilidad de crecer a bajas temperaturas que son empleadas en el almacenamiento de la fruta. (CSC; CMCC, 2003).

La infección por este organismo, al igual que otros, se da en las primeras etapas de cultivo donde puede reducir el valor de la cosecha en un 40% si no se usan métodos químicos de control y las pérdidas pueden ser hasta del 60% si la enfermedad es severa lo cual representaría el 100% en pérdida económica. Sin embargo, puede suceder que los síntomas no se presenten hasta la cosecha y almacenamiento, donde la contaminación puede esparcirse rápidamente representando pérdidas totales del producto. Los únicos métodos para controlar esta enfermedad son preventivos e incluyen la remoción de fruta descompuesta, enfriamiento inmediatamente después de la cosecha y mantenimiento de las condiciones de almacenamiento adecuadas, tanto en temperatura como en composición de gases atmosféricos. (CSC; CMCC, 2003).

## JUSTIFICACIÓN

Actualmente el cultivo mundial de la fresa ha manifestado un importante crecimiento continuo sobre el mercado hortofrutícola, grandes inversiones se registran en particular en EE.UU., Alemania, Turquía y España, que ha consolidado la nómina de segundo productor mundial, con una oferta que supera el umbral de las 300.000 T de fresas producidas. (ZIPMEC, 2013).

El cultivo de fresa en Ecuador es de 1200 hectáreas concentradas en seis provincias en su mayor extensión en la provincia de Pichincha con 400 ha, también en constante crecimiento en las provincias de Tungurahua 250 ha, entre Imbabura, Chimborazo, Cotopaxi y zona del Austro 550 ha siendo uno de las alternativas importantes de la economía en dichas provincias, su producción va a los mercados de Quito, Cuenca, Guayaquil y otras provincias de la Costa. (ZAMBRANO, 2015).

En el Ecuador se cultivan en zonas que tienen entre 1 300 y 3 000 metros sobre el nivel del mar, en una hectárea de cultivo ingresan 100 000 plantas trasplantando 10 plantas por metro cuadrado de terreno. Y con temperaturas que bordean los 15 y 17 grados en el mercado de Ambato, un kilo de frutilla de primera se vende en USD 1,70; la de segunda en 1,40 y la de tercera (pequeña) calidad en USD 1,10. (AGRO, 2013).

Existe un problema que afecta gravemente a los productores, comerciales y consumidores por el mal manejo en poscosecha, cuando las frutas no tienen una manipulación adecuada en la recolección, clasificación y almacenamiento, su calidad disminuye por causa de enfermedades especialmente por botrytis y no son muy apreciables para el mercado. En los países desarrollados se estima que las pérdidas en poscosecha de las frutas alcanzan el 5% al 25% de la producción total, mientras en países en vías de desarrollo van del 25% al 50% y en algunos casos superan estos valores. (PROEXANT, 1993).

La presente investigación consiste en “Identificar hongos fitopatógenos en el cultivo de la fresa, en el Sector Salache Barbapamba del Cantón Salcedo”, con el que se pretende brindar una base de información que servirá al agricultor para tomar decisiones adecuadas y tener una guía para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos, la cual permitirá reducir también los costos de producción, mejorar la calidad del producto, incrementar su producción e ingresos económicos a nivel familiar como productor agrícola. (AGRO, 2013).



# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*), Sector Salache Barbapamba, Cantón Salcedo. Cotopaxi. 2015.

## OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo de fresa (*Fragaria vesca*).
- Identificar signos y síntomas del hongo fitopatógeno de la fresa (*Fragaria vesca*) en campo.
- Caracterizar macro y microestructuras del patógeno.
- Describir el ciclo de vida del patógeno en condiciones de laboratorio.
- Elaborar una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo en estudio.

## **PREGUNTA DIRECTRIZ**

- ¿Se podrá caracterizar morfológicamente macro, micro estructuras y ciclo de vida del hongo fitopatógeno fresa (*Fragaria vesca*), en condiciones de laboratorio?

# CAPÍTULO I

## 1 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 1.1. El cultivo de fresa

La fresa tiene gran cantidad de especies. Antes del descubrimiento de América, en Europa se cultivaban principalmente las especies (*Fragaria vesca*) fragaria alpina, de tamaño pequeño pero de excelente calidad organoléptica. Con el descubrimiento de América se encontraron dos nuevas especies de mayor tamaño una en Chile, fragaria chiloensis y otra en Estados Unidos fragaria virginiana, que por su tamaño se le llamo fresones fueron llevadas a Europa e hibridizadas actualmente estas fresas grandes o fresones dominan el mercado y son producto de una serie de cruces. (CORPOICA, 2002).

Históricamente la fresa ya estaba presente sobre las mesas de la antigua Roma: este fruto en efecto solía comparecer coincidiendo con las fiestas en honor de Adonis, a la muerte del cuál, como cuenta la leyenda, Venus lloró copiosas lágrimas, que llegadas a la tierra se transformaron en pequeños corazones rojos las perfumadas fresas. (CORPOICA, 2002).

Según otras leyendas populares más recientes, pero que se pierden de todas formas con el paso del tiempo, la fresa tendría que proteger del mordisco de víboras y serpientes: para evitar el peligroso veneno de estos animales se dice que hay que recoger las hojas de la planta el día de San Giovanni. (CORPOICA, 2002).

Entonces quién hubiera recogido las hojas el 24 de junio, las hubiera puesto secar al sol y luego las hubiera entrelazado para hacer de ellas como un cinturón, habrían sido protegidos por eventuales mordiscos, a menudo letales, de víboras y serpientes. Lógicamente se trata de creencias populares relacionadas a la tradición campesina italiana, pero estas leyendas siempre hacen la fresa aún más excelente entre todos los frutos que tenemos sobre nuestra mesa. (ZIPMEC, 2013).

## 1.2. Clasificación taxonómica

**Tabla 1: Clasificación taxonómica de la fresa**

Reino:	Plantae
Clase:	Dicotiledónea
Familia:	<i>Rosaceas</i>
Género:	<i>Rubus</i>
Nombre científico:	<i>Fragaria vesca</i>
Nombre común:	<i>Fresa</i>

Fuente: (ALVAREZ, 2013).

## 1.3. Enfermedades en el cultivo

### 1.3.1. *Moho gris (Botrytis cinerea)*

Es la enfermedad más destructiva de los frutos de fresa en todo el mundo. Los síntomas aparecen durante el proceso de maduración o en frutos ya maduros. La principal característica son las masas de micelio, conidióforos y conidias de color gris sobre la superficie de los frutos. Alta humedad y temperaturas de 10 – 25 grados centígrados son favorables para el desarrollo del hongo. (TOLEDO & AGUIRRE, 1999).

El hongo sobrevive en el suelo como micelio en residuos vegetales y como esclerocios. Consecuentemente, la diseminación vía suelo y residuos de plantas infectadas es muy efectiva. Las condiciones favorables para la infección, crecimiento y esporulación del hongo son la humedad alta y las temperaturas bajas (18 a 23°C). También causa severos daños a frutos que se almacenan a temperaturas de 0 a 10°C si se les mantiene por períodos largos. (REVIBEROAMMICOL, 2000).

**Organismo causal:** (*Botrytis cinérea*) pertenece al fílum fungal Deuteromycota, lo cual se conoce de vez en cuando como el grupo de hongos imperfectos y estos reproducen por esporos asexuales, también conocidos como conidias. El estado de *Botrytis* que reproduce sexualmente no se ha encontrado en fresa ni en la mora (o frambuesa). El micelio joven de este hongo es septado, con ramas, y básicamente sin color. Cuando este hongo se cultive en agar de dextrosa de papa (un substrato común para cultivar hongos y conocido por su acrónimo PDA en inglés), (*Botrytis cinérea*) es primeramente blanco y después torna gris en cuanto se formen los esporos. Las estructuras que producen los esporos son ramificados, hasta 5 mm de alto, y un color gris ligero a oscuro. Aun con magnificación baja del microscopio, uno sí puede ver los ramos de esporos muy parecidos a los racimos de uva.

**Tabla 2: Rangos de temperatura para el desarrollo de la enfermedad**

Formación de esclerocios 11 a 15°C
Germinación 17 a 23°C
Esporulación 15 a 20°C (óptimo 18°C)
Germinación de esporas 20°C

**Fuente:** (KERSSIES, 1994).

**Síntomas en la fruta:** La podrición proveniente de *Botrytis cinerea* es fácil de distinguir de las otras podriciones de fruta que ocurrirán en las fresas y moras. Generalmente, podrición de *Botrytis* empezará como una mancha de color marrón ligero a gris (véase a la tercera foto abajo) sin ningún margen distinto alrededor del área afectada. Esta mancha mantiene una textura firme en cuanto crezca y una fruta aun completamente cubierta de *Botrytis* mantendrá su forma original sin deshacerse. Después de unas días y si las condiciones lo favorecen, quiere decir temperaturas entre 59°- 77°F (15°- 25°C), un crecimiento gris a marrón constando de millones de esporos aparecerá en la superficie de fruta infectada.

**Tabla 3: Clasificación taxonómica de la botrytis en fresa.**

Fase sexual	Fase asexual
Reino: Fungí	Reino: Fungí
División: Ascomycota	División: Ascomycota
Clase: Ascomycetes filamentosos	Clase: Ascomycetes filamentosos
Género: Botryotinia	Subclase: Deuteromycetes
Especie: fuckeliana	Género: Botrytis
	Especie: cinerea

**Fuente:** (AGRIOS G. , 1997).

#### 1.4. Hongos fitopatógenos

Manifiesta que los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos eucarióticos, esporógenos, sin clorofila. Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentoso que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que tienen quitina, celulosa, o ambos componentes. (AGRIOS, 2005).

### *1.4.1. Características generales*

Los hongos son organismos carentes de clorofila que se reproducen mediante esporas. Son por lo general filamentosos y multicelulares, con núcleos que se observan con facilidad. Los filamentos constituyen el cuerpo (soma) de los hongos que se alargan mediante un crecimiento especial y un pequeño fragmento de ellos puede reproducirse un nuevo individuo. (HERRERA & MAYEA, 1994).

Las estructuras reproductivas se diferencian de las somáticas y sobre la base de sus características se clasifican los hongos. Las estructuras somáticas de los diversos hongos son muy similares y pocos pueden ser identificados cuando no se presentan las estructuras reproductivas. (HERRERA & MAYEA, 1994).

### *1.4.2. Estructuras somáticas*

El talo de los hongos consiste típicamente en filamentos microscópicos ramificados hacia todas partes y que se extienden sobre o dentro del sustrato que se utiliza como alimento. Estos filamentos se denominan hifas. El conjunto de hifas constituyen el micelio de los hongos. (HERRERA & MAYEA, 1994)

Las hifas pueden ser septadas o sin septos (lisas o cenocíticas) este último tipo de hifa es característico de los hongos inferiores y cuando envejecen pueden formarse septos en varios lugares. Los septos varían en su estructura y pueden ser simples o complejos. (HERRERA & MAYEA, 1994).

El micelio en algunos hongos forma gruesos cordones denominado rizomorfos que semejan raíces, son resistentes a condiciones adversas y permanecen en estado de letargo hasta que se presentan condiciones favorables. En algunos casos, los rizomorfos pueden alcanzar grandes longitudes. (HERRERA & MAYEA, 1994).

### ***1.4.3. Hongos como patógenos en las plantas***

El efecto nocivo de los hongos se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados, o producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales. Algunos hongos, conocidos como biótrofos, pueden crecer y multiplicarse manteniéndose durante todo su ciclo de vida en la planta huésped, viviendo y obteniendo nutrientes sin causar la muerte. Otros son necrótrofos, en una parte de su ciclo vital requieren una planta huésped pudiendo crecer sobre tejido muerto o producir la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto. Muchas infecciones empiezan con una fase biotrófica que se convierte más tarde en necrotrófica. Algunos hongos son simbioses facultativos, creciendo tanto libres como asociados a plantas, y otros son simbioses obligados, creciendo sólo si están asociados a planta. (AGRIOS, 2005).

### ***1.4.4. Identificación de hongos***

Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas. Mediante la técnica de cámara húmeda y/o aislamiento es posible inducir la aparición de estas estructuras producidas y el uso de claves taxonómicas son necesarios para determinar el género y la especie del hongo patógeno. Para la identificación de los hongos es necesario el reconocimiento de las estructuras vegetativas y reproductivas. En cuanto a estructuras vegetativas se debe analizar. (CALZADA, 2002).

Plasmodio: se refiere al cuerpo o soma vegetativo de algunos hongos inferiores, el cual está constituido por una masa multinucleadas, sin pared celular. Son escasos los hongos fitopatógenos que poseen soma vegetativo de tipo plasmodial. (CALZADA, 2002).



Micelio: la mayoría de los hongos poseen cuerpos filamentosos provistos de pared celular. A los filamentos que constituyen el cuerpo o soma vegetativo se les denomina hifas. Al conjunto de hifas se le denomina micelio. Cuando las hifas no presentan septas, el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando las presenta el micelio se dice que es tabicado. (CALZADA, 2002).

## **1.5. Signos y síntomas de hongos patógenos en la planta**

Los síntomas que producen los hongos en sus hospedantes son de tipo local o general y pueden aparecer por separado en hospedantes distintos, en un mismo hospedante aparecer uno después de otro en un mismo en un mismo hospedante. En general, los hongos producen una necrosis local o general o la muerte de los tejidos vegetales que infectan, hipertrofia e hipoplasia o atrofia de plantas completas o de sus órganos, e hiperplasia o crecimiento excesivo de ellas o de algunos de sus órganos. (AGRIOS, 1999).

En muchas enfermedades, el patógeno se desarrolla, o produce varias estructuras, sobre la superficie de su hospedante. Estas estructuras, que incluyen al micelio, esporóforos, cuerpos fructíferos y esporas, se les denomina signos y difieren de los síntomas, los cuales solo se refieren a la apariencia que toman las plantas o sus tejidos cuando han sido infectados. (AGRIOS, 1999).

### ***1.5.1. Medios de cultivos usados en el aislamiento de hongos***

Muchos de los hongos fitopatógenos pueden cultivarse en medios de cultivos artificiales. La mayoría de los hongos crecen en medios de cultivos de alto contenido de carbohidratos con un pH que fluctúa entre 5 y 6 ya que la exigencia de las diferentes especie varían considerablemente. (L C. , 2002)

AGAR PAPA DEXTROSA (PDA). Es un medio útil para valorar el aspecto morfológico y la coloración de la colonia. Su alto contenido de carbohidratos condiciona un mayor crecimiento, el detrimento de la esporulación que suele retrasarse hasta un mes, las colonias pueden ser atípicas. (ECHANDI, 2001).

Este medio de cultivo se puede preparar con papas naturales o con el producto comercial deshidratado. Para preparar este medio de cultivo es a partir de papas naturales se procede de la siguiente manera se lavan de 200 a 300 gramos de papas no es necesarios pelarlas, rebanarlas y hervirás hasta que estén suaves y exprimirlas a través de tres capas de materia delgada. Reciba el filtrado en un matraz añada 20 gr de dextrosa y 20 gr de agar afore a un litro.

Esterilice los medios 20 minutos a 15 libras de presión. Cuando el medio este casi frio (40°C) viértalo en las cajas Petri Los conidios formados en PDA no son consistentes en tamaño y forma además de que son menos confiables para utilizarse con fines de investigación.

Sin embargo la morfología de la colonia pigmentación del medio y rango de crecimiento. La mayoría de especies de *Fusarium* en pida son consistentes si el medio es preparado de una manera consistente, y las cepas provienen de un inculo estándar y han sido incubadas bajos condiciones estándar. (ECHANDI, 2001).

Estas características son utilizadas por lo regular como criterio secundario para la identificación. En el cultivo de PDA es utilizado por varios investigadores para el aislamiento de especie *Fusarium* presentes. Se utiliza para recuperación de hongos provenientes de las plantas entonces se debe reducir la concentración de papa dextrosa entre un 50 a 75% para inhibir el crecimiento de bacterias. (ECHANDI, 2001).

## **1.6. Hongos inferiores y pseudohongos.**

Los hongos inferiores se caracterizan por poseer micelio cenocítico. Según su reproducción sexual estos hongos pueden pertenecer:

### ***1.6.1. Hongos superiores***

- Estructuras representativas de la clase Ascomycetes: La clase ascomycetes se caracteriza por poseer micelio tabicado y producir esporas de origen sexual denominadas Ascosporas. Estas ascosporas se producen dentro de sacos llamados ascas. Las ascas pueden encontrarse en forma libre o contenida en cuerpos fructíferos. Los cuerpos fructíferos pueden ser de dos tipos: Apotecios y Cleistotecios.(KENADA,2004)

## CAPITULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODO

#### 2.1. Materiales

##### *2.1.1 Institucionales*

- Universidad Técnica de Cotopaxi.
- Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.
- Carrera de Ingeniería Agronómica.
- Laboratorio de Microbiología.

##### *2.1.2. Recursos Humanos*

- **Autor:** Miguel Ángel Tomalo Guanoluisa
- **Directora de tesis:** Ing. Karina Marín
- **Miembros del tribunal:**
  - Ing. Mg. Guadalupe López
  - Ing. Santiago Jiménez
  - Ing. Fabián Troya

### **2.1.3. Material De Campo**

- Cámara
- Fundas de papel “sobres de carta”
- Fundas de plástico “ziplop”
- GPS
- Muestra de la planta o parte enferma de la fresa (*Botrytis cinerea.*)
- Tijera

### **2.1.4. Recursos tecnológicos**

- Autoclave semiautomática 2540-23 litros
- Balanza digital.
- Cámara de crecimiento o incubadora IN110
- Cámara de flujo laminar aura mini con base
- Cámara científica infinity 1-2 CB
- Cocineta eléctrica
- Destilador de agua waterwise 9000
- Desecador 250 mm con tapa
- Estufa eléctrica
- Microscopio Trinocular CX31 con adaptación para cámara INFINITY 1
- Refrigeradora R1-425 QUARZOINDURAMA
- Termómetro digital

- **Material De Laboratorio**

- Asa de siembra
- Bisturí
- Botellón de agua y soporte Cajas Petri
- Cajas separadoras “almacenamos las muestras terminadas”
- Cinta adhesiva transparente de 1,5 cm de ancho

- Cintas para etiquetar
- Cintas para medir el pH
- Cofia
- Cubreobjetos
- Cuchara de pastico pequeñas
- Cucharas de cocina
- Encendedor
  
- Erlenmeyer de 500 ml
- Goteros de plástico
- Guantes desechables
- Mascarillas descartables
- Material didáctico
- Mechas para mechero
- Mechero de alcohol
- Olla
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Parafilm de laboratorio
- Pinzas
- Portaobjetos
- Protectores para calzado
- Taburetes
- Tamiz
- Tijera
- Varilla de agitación.
- Vaso de precipitación de 40 -100-800 ml.
  
- **Reactivos**
  - Agar
  - Agua destilada
  - Alcohol antiséptico 72°G.L

## **2.2. Diseño metodológico**

En esta investigación se caracterizó morfológicamente: los signos y síntomas, macro y micro estructuras y ciclo de vida del hongo fitopatógeno *Botrytis (Botrytis cinera)*, en base a imágenes captadas con el microscopio Trinocular OLYMPUS CX31 acoplado con una cámara INFINITY; de esta manera se corroboró con la descripción de la bibliografía encontrada.

### **2.2.1. Investigación descriptiva**

La metodología descriptiva puntualiza como se ocasionaron los fenómenos que se investigaron, también se ocupó la descripción de datos y características de una población.

La investigación es descriptiva, porque para su desarrollo se detalló minuciosamente todo el proceso de investigación, además se recopiló información de las características morfológicas e identificó a los hongos fitopatógenos. Además de describir los resultados fueron procesados, analizados, discutidos y establecidos de cómo se ocasionaron los fenómenos, y así se evaluaron aspectos relevantes de la investigación.

## **2.3. Método**

La presente investigación se basó en un diseño no experimental, pues no se realizó manipulación de ninguna variable, es decir no se cambió la realidad del cultivo de café en el sector Salache Barbapamba, cantón Salcedo, provincia de Cotopaxi por el contrario lo que se realizó con la investigación es mejorarla, gracias a la “Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos”.

### 2.3.1. Métodos lógicos

- **Método descriptivo analítico:** Se utilizó este método en la investigación porque se describió y analizó detalladamente en campo como en laboratorio al hongo fitopatógeno botrytis (*Botrytis cinerea*).
- **Método deductivo:** Para el avance de la investigación se empleó este método porque permitió recopilar información de las características morfológicas que presentan el hongo, permitiendo de esta manera identificar a (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*).
- **Método comparativo:** Este método se utilizó con la finalidad de comparar el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, aislado en el laboratorio con la bibliografía citada.

### 2.3.2. Técnica

- **Observación:** Consistió en observar en campo y laboratorio, los sucesos de manera directa con el propósito de obtener información de primera mano del fenómeno que se investigó.  
También la observación permitió conocer la realidad en la que se desarrolla el hongo, además se observó los signos y síntomas que se presentaron en el cultivo. Como instrumento se utilizó un cuaderno de campo y una cámara fotográfica SONY, con el fin de apuntar todos los sucesos observados en el cultivo, y en el laboratorio se utilizó un microscopio Trinocular de marca OLYMPUS CX31 acoplada con una cámara INFINITY y la ayuda de un computador portátil.



## 2.4. Delimitación del lugar de recolección

Se recolecto las muestras en el sector de Salache Barbapamba el mismo que se encuentra ubicado en la parte norte del cantón Salcedo esta limita: al norte con el norte con el Rio Salache, al sur con Salache San José, al este con el rio Cutuchi y al oeste con Salache Barbapamba.

### 2.4.1. Ubicación Política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Salcedo
- **Parroquia:** San Miguel
- **Sector:** Salache Barbapamba

### 2.4.2. Ubicación Geográfica

- **Latitud:** 1° 3' 0" S.
- **Longitud:** 78° 35' 0" W.
- **Altitud:** 2480 msnm.

**Tabla 4:** Condiciones edafoclimáticos.

CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICOS	
Temperatura anual media (°C)	10-15
Humedad Relativa (%)	70%
Precipitación anual (mm)	250-500

**Fuente:** Elaboración propia basada en (GAD COTOPAXI, 2015).

## 2.5. Diagnóstico del cultivo

Al realizar el diagnóstico se siguió la secuencia propuesta por (STREETS, 1972).

- **Identificar a planta hospedante.** de fresa (*Fragaria vesca*)
- **Síntomas en campo:** utilice información propia y del agricultor.
- **Condiciones de cultivo:** El tipo de suelo que presenta en el cultivo es franco arenoso, prácticas de riego, fertilización y aplicación de plaguicidas.
- **Síntomas en detalle:** Se observó un ablandamiento del fruto con manchas de color oscuro y un moho grisáceo.
- **Observación en aumento bajo:** la observación la realice con una lupa en campo de alto aumento en el campo y un estereoscopio en laboratorio de la superficie de las lesiones o tejidos muertos; esto permitirá observar la presencia de esporas, cuerpos fructíferos de los hongos.

### 2.5.1. Toma de muestras

El método utilizado para esta actividad fue por cuotas, en la cual se fijó un número de individuos que reunieron unas determinadas condiciones.

### 2.5.2. Procedimientos en la toma de muestra

Se extrajo partes de plantas afectadas “hojas” con una tijera, en cada corte se procedió a esterilizar los materiales con alcohol y las muestras vegetales se envasaron en bolsas de papel para que el exceso de humedad sea absorbido por el papel, posteriormente se procedió a colocar en una funda ziplop con su respectiva

codificación y se trasladó inmediatamente al laboratorio para proceder con el trabajo en el mismo.

## **2.6. Preparación del medio de cultivo PDA**

- 1.** Lavar y cortar en pequeñas partes, y pesar 350 gramos de papas
- 2.** Colocar la muestra en una olla con 875ml de agua desmineralizada para la cocción en una estufa eléctrica.
- 3.** Retirar la olla de la estufa, y tamizar el contenido; medir la cantidad de agua que sobro y se añade la cantidad de agua que se perdió en la cocción.
- 4.** Pesar el agar, la levadura y la glucosa en papel filtro en una balanza digital.
- 5.** Diluir la levadura y la glucosa en 80ml de agua desmineralizada (caliente), en un vaso de precipitación de 100ml con la ayuda de una varilla de agitación.
- 6.** Colocar el vaso de precipitación de 1000ml a baño María y agregamos 30gr de agar y la solución disuelta en 80ml de glucosa y levadura.
- 7.** Mezclar con una varilla de agitación hasta obtener una solución homogénea.
- 8.** La solución obtenida se verterá en dos matraces de 500ml equitativamente, después y tapar los matraces con papel absorbente en forma de corcho y papel aluminio.
- 9.** Colocar los matraces en el autoclave para su esterilización por un lapso de una hora a 121°C.
- 10.** Enfriar la solución y colocar en cajas petri, hasta cubrir la base de las mismas.

### ***2.6.1. Aislamiento directo.***

Se observó a través del microscopio una muestra enferma; para verificar si se encontraba fructificaciones, micelio, etc., para esto se procedió a tomar una

muestra de este material con una aza de cultivo esterilizada “flameada con un mechero de alcohol”, para finalizar se coloca directamente sobre el medio de cultivo solidificado.

- ***Partes vegetales en medio de cultivo.***

Se procedió a tomar porciones de tejido enfermo para desinfectarlos en una solución 2:1 de alcohol a 75°G.L, se lavó dos veces con agua desmineralizada y se eliminó los excesos de la misma, y al final se coloca en el interior de una caja de petri estéril con PDA.

- ***Purificación***

Consistió en realizar cortes de las puntas de micelio del borde de la colonia en crecimiento con la ayuda de un bisturí estéril. Esta pequeña porción del hongo y agar se depositó en otras cajas con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtuvo cultivos puros.

### ***2.6.2. Inoculación en PDA***

Se procedió a tomar porciones de tejido enfermo para desinfectarlos en una solución 2:1 de alcohol a 75°G.L, se lavó dos veces con agua desmineralizada y se eliminó los excesos de la misma, y al final se coloca en el interior de una caja de petri estéril con PDA.

### ***2.6.3. Incubación***

La incubación se la realizó a 23,5 °C en una incubadora IN110, por el lapso de 15 días según el desarrollo del micelio del hongo.

#### **2.6.4. Caracterización**

- **Observación microscópica**
- **Técnica de cinta pegante:** Se procedió a realizar un doblado de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostendrá con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después se adicionó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se pegó la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 4x, 10x, 20x y 100x.
- **Montaje por disección:** Con un aza estéril (o bisturí), se tomó una pequeña muestra del hongo y se ubicó sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada, con la misma aza se extendió el micelio, después se puso el cubreobjetos para observarlo en el microscopio con aumentos de 4x, 10x, 20x y 100x.

#### **2.6.5. Descripción**

Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos: para esto se utilizó el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de bibliografía.

De las cepas aisladas se hizo observaciones macroscópicas tales como: forma de la colonia del hongo, color característico del medio de cultivo, halo de crecimiento de cada una de las colonias.

Luego se procedió a realizar placas fijas de cada una de las cepas aisladas para posteriormente observar las estructuras microscópicas tales como: forma del conidiosporo, esporangiosporos, forma y tamaño de las esporas o conidios.

Para realizar las placas fijas se procedió de la siguiente manera:

- Preparación de cajas petri con las cepas de hongos aislados, una en cada caja petri.
- Utilización de cinta masking transparente de seis centímetros de largo y se fija en el cuerpo fructífero, tomando directamente de la caja petri, donde se encuentran las cepas puras.
- Observación en microscopio con objetivos adecuados y toma de fotografías microscópicas de las diferentes estructuras.
- Creación de un archivo con fotografías tomadas de las cepas para luego realizar los postulados de koch y cumplir con el cuarto ítem.
- Elaboración de un cuadro comparativo con los hongos re-aislados, para ver si eran el mismo hongo que se inoculó.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*)

Mediante la observación directa en el lote de cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) y con la ayuda de una entrevista directa a los pequeños agricultores del sector me permitió determinar el hongo fitopatógeno que causaba un mayor impacto económico era botrytis (*Botrytis cinerea*) en el sector de Salache Barbapamba Cantón Salcedo,



A) *Cultivo.*

*Imagen 1: Cultivo de fresa (Fragaria vesca).*

*Fuente: Directa.*

*Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.*

### 3.2. Signos y síntomas

Uno de los signos más frecuentes de *Botrytis* es la presencia de micelio blanco, grisáceo o parduzco en los tejidos colonizados, ataca al follaje y a las frutas las mismas que se deshidratan desarrollando micelio, también producen pudriciones internas húmedas con poco micelio. (UNCANT, 2012).

Un síntoma particularmente sorprendente en los frutos es el denominado "mancha fantasma". En realidad, se trata de ataques de *Botrytis* abortados. Alrededor de un punto central muy pequeño y necrótico se observa un tenue anillo de 5 a 10 mm de diámetro, blanquecino sobre el fruto verde y amarillo en el fruto maduro. La calidad gustativa del fruto no sufre, pero si la presentación.

Los síntomas varían en la planta, las partes de la planta atacada y las condiciones de crecimiento, cuando hay mucha humedad se puede ver un entretejido fino gris (micelio), generalmente, en ese "tejido" se forma una estructura denominada conidióforo que contiene esporas, la planta infectada liberan las esporas de la enfermedad en forma de nubes cuando por alguna razón se mueven. (UNCANT, 2012).

En el momento de realizar un monitoreo el cultivo los síntomas provenientes de *Botrytis* (*Botrytis cinerea*) es fácil de distinguir debido a que empieza como una mancha de color marrón ligero a gris, sin ningún margen distinto alrededor del área afectada. Esta mancha mantiene una textura firme en cuanto crezca y una fruta aun completamente cubierta de *Botrytis* mantendrá su forma original sin deshacerse. Después de unos días y si las condiciones lo favorecen, quiere decir temperaturas entre (15°- 25°C), un crecimiento gris a marrón constando de millones de esporos aparecerá en la superficie de fruta infectada coincidiendo de esta manera con la bibliografía de. (UNCANT, 2012).





A) Fruto con *Botrytis*.

*Imagen 2: Signos y síntomas de Botrytis en el fruto de fresa.*

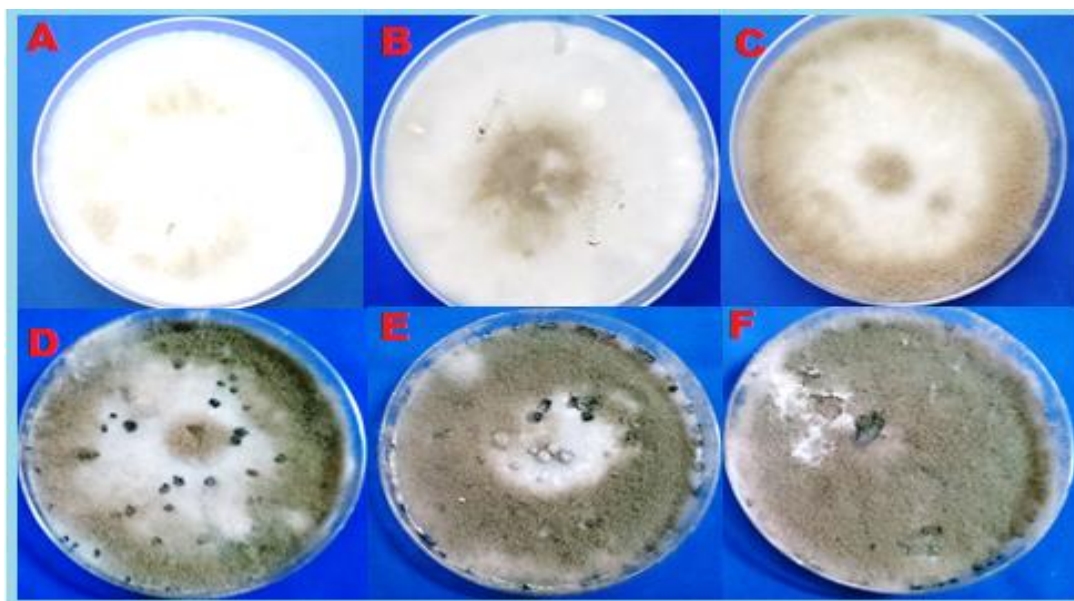
*Fuente: Directa.*

*Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.*

### **3.3. Caracterización de macro y micro estructuras de *Botrytis* (*Botrytis cinerea*)**

#### **3.3.1. Macro estructura**

En el medio de cultivo PDA en sus primeras fases de desarrollo del hongo fitopatógeno se pudo observar cómo crecen y desarrollan colonias algodonosas, blancas a grises, también pardas grisáceas y la presencia de micelio filamentososo de un color blanco grisáceo, conforme transcurría los días presento unos conidios de apariencia cristalina, transcurrido los 15 días desde la siembra empieza a formar hifas de color pardo irregular denominado esclerocio.



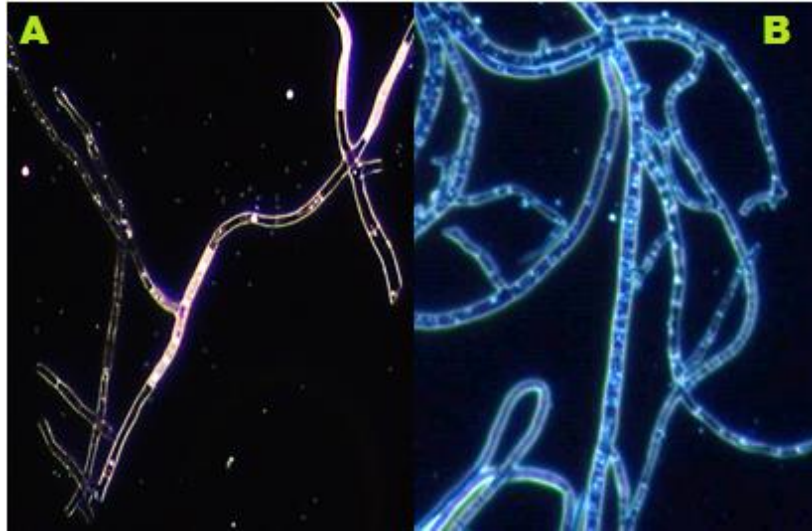
A) Primera, B) Tercer, C) Quinto, D) Séptimo, E) Noveno, F) Décimo primer día.

*Imagen 3: Evolución del micelio en el medio de cultivo PDA Botrytis (Botrytis cinerea). Fuente: Directa.*

*Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.*

### 3.3.2. Micro estructuras

Se observaron la microestructuras con el microscopio OLYMPUS, incorporada con una cámara INFINITY con el aumento de 20 x su fase asexual está representada por conidióforos largos delgados, ramificados y conidios en esterigmas.



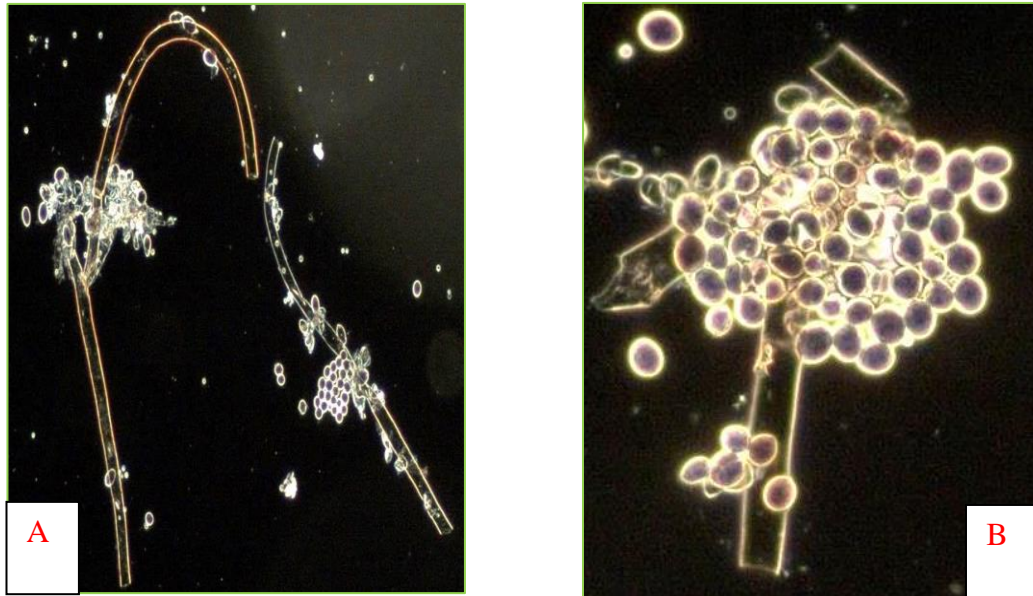
*A) Aumento con lente de 20X, B) Aumento con lente a 40X.*

**Imagen 4 : Observación de micelio *Botrytis (Botrytis cinerea)*.**

**Fuente: Directa.**

**Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.**

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos que se multiplican vegetativamente mediante división citoplasmática, siendo común que tenga lugar una división nuclear sin que se haya producido división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas con un elevado y variable número de núcleos, las mismas que se pueden observar en la imagen número 4 de tal forma coincidiendo con esta cita bibliográfica. (MOHSIN, 1990).



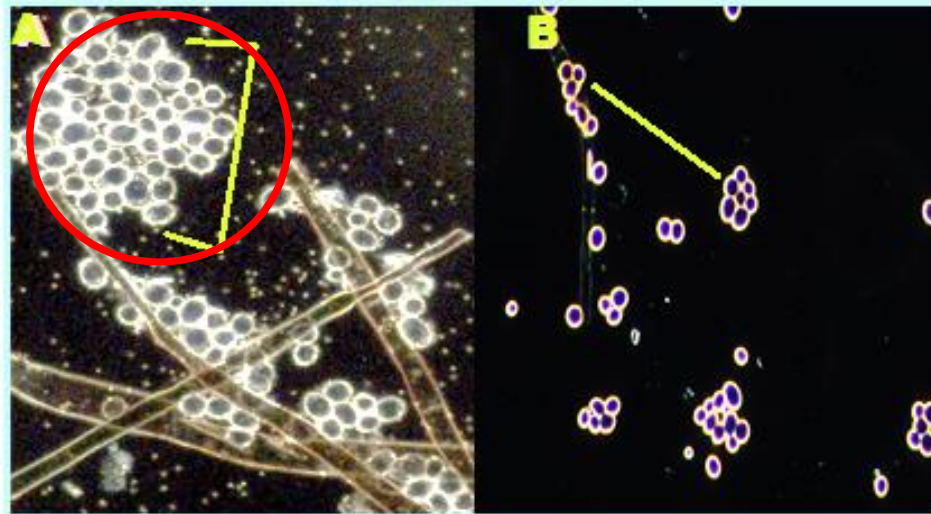
A) Conidióforo, B) Macroconidióforo.

**Imagen 5: Observación de conidióforos de *Botrytis (Botrytis cinerea)*.**

**Fuente: Directa.**

**Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.**

Los conidióforos o macro conidióforos se originan principalmente de la masa hifal, aunque también pueden hacer lo a partir de los esclerocios. Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias. Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de ésta, se disponen los conidios o macroconidios los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal, de manera que al separarse de éste se queda una herida en la región de unión. De tal manera que se puede observar en la imagen numero 5 los conidióforos de esta forma coincide lo manifestado por este autor. (MOHSIN, 1990).



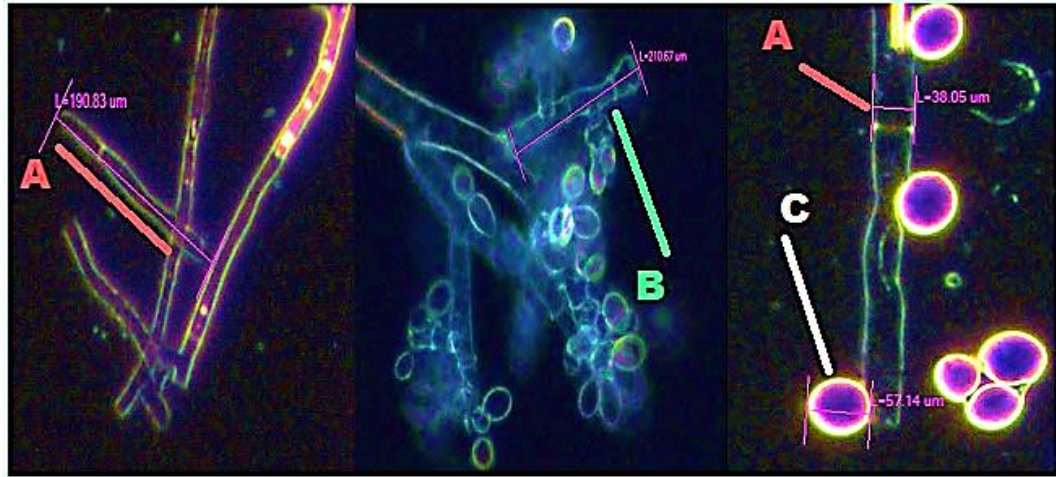
A) Conidios estructurados en racimo, B) Conidios en dispersión.

*Imagen 6: Observación de conidios de Botrytis (Botrytis cinerea).*

*Fuente: Directa.*

*Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.*

Los conidios se forman a partir de la gemación de células formadoras de conidios, las cuales se sitúan en las vesículas globosas. Los conidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *Botrytis cinerea*. Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo. Los conidios tiene una forma cilíndrica están en forma de racimos de uva posteriormente se dispersan como se puede observar en la imagen número 6 de tal manera coincide con lo mencionado por este autor. (ELAD, Y & STEWART, A, 2004).



A) Micelio:  $L=19.83$  micras, B) Conidióforos:  $L=24.0$  micras, C) Conidios:  $L= 5.714$  micras.

**Imagen 7: Dimensiones de las microestructuras de Botrytis (Botrytis cinerea).**






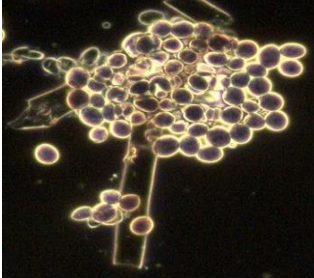

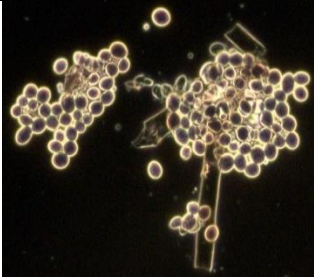
**Fuente: Directa.**

**Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.**

De la misma manera podemos observar las diferentes dimensiones y amplitudes de micelio, conidióforos segmentados y conidios en el microscopio y sus respectivas mediciones. Esto se pudo desarrollar con el programa infinity el desarrollo del ciclo de vida del hongo fitopatógeno Botrytis (*Botrytis cinerea*) como se puede observar en la presente imagen número 7.

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos que se multiplican vegetativamente mediante división citoplasmática, tiene un dimensión entre 15- 20 micras. El conidióforos se originan principalmente de la masa hifal, aunque también pueden hacer lo a partir de los esclerocios. Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias tiene una dimensión entre 22 – 26. Los conidios son estructuras ovaladas, globosas o elípticas, separadas del pedicelo por un septo transversal y sus dimensiones oscilan entre 5-8.4 micras de sección transversal y las 8.8-11 micras de longitudinal. (MOHSIN, 1990).

### 3.4. Ciclo de vida

Actividad	Tiempo y Temperatura	Imagen del hongo	Observación en microscopio	Aumento
Inoculación del hongo	10 minutos/23.5 °C			20x
Presencia de hongo infectado	2 días/23.5 °C			20x
Presencia de conidióforos	6 días			40x
Presencia de conidios	11 días			40x

*Fuente: Directa*

*Elaborado por: TOMALO, Miguel, 2015.*

Después de haber desarrollado el trabajo de caracterización morfológica en el laboratorio para poder identificar y estructurar su ciclo de vida del hongo fitopatógeno *Botrytis* (*Botrytis cinerea*) coincide con lo detallado en la tabla número 5 al momento de realizar una comparación entre el gráfico 1 del ciclo de vida citada bibliográficamente son similares con las diferentes microestructuras tales como las hifas, micelio, conidióforos y conidios de botrytis.

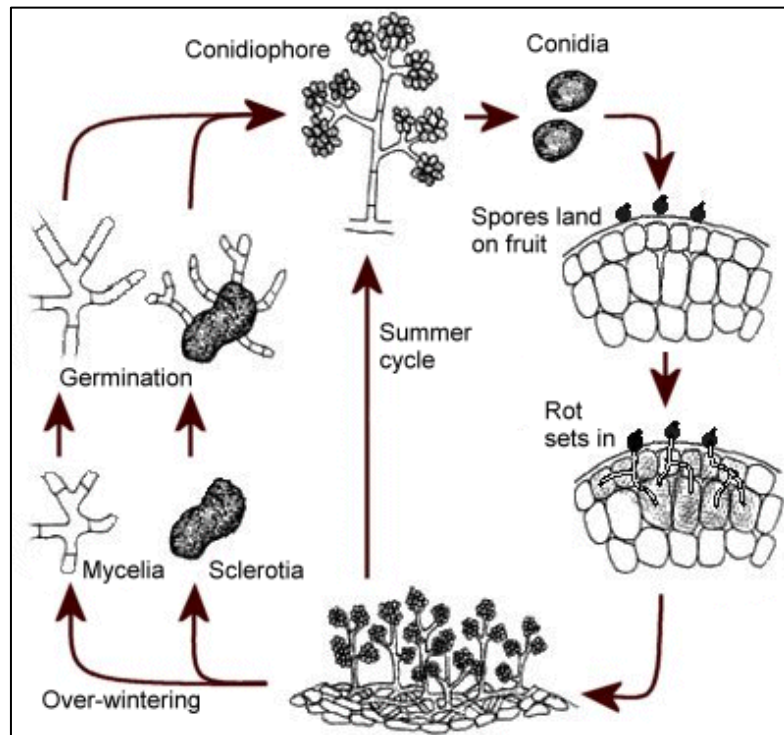


Gráfico 1: Ciclo de vida de botrytis  
FUENTE: (AGRIOS, 1988)



**3.5. Elaboración de una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo Botrytis (*Botrytis cinerea*) como se presenta en el campo.**

La guía didáctica se encuentra en el Anexo 1

## CONCLUSIONES

1. Mediante la visita y las bibliografías consultadas se pudo identificar que el hongo fitopatógeno de mayor impacto económico en el cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) en el sector de Salache Barbapamba es *Botrytis (Botrytis cinerea)* conocido también como moho gris.
2. Mediante la observación directa realizada en campo se pudo constatar que los signos y síntomas característicos del hongo botrytis (*Botrytis cinerea*) son: moho gris, manchas irregulares, difusas, firmes e inicialmente de color amarillento o marrón claro, las cuales ocurren en cualquier parte del fruto, pero especialmente en aquellas que está en contacto con el suelo u otros frutos enfermos, en estados avanzados los frutos son cubiertos por un micelio de color gris de apariencia filamentosa. Presentando similares características que han mencionado las citas bibliográficas mencionadas anteriormente.
3. En la siembra realizada en el laboratorio mediante el uso de cultivo PDA papa destroxa se observó las macroestructuras del hongo (*Botrytis cinerea*) micelio aéreo algodonoso de color blanquecino a los primeros días de haber realizado la siembra y en su etapa final se tomó un color café oscuro. Las microestructuras identificadas en el hongo son: micelio con 19.83 micras tabicadas y alargadas, conidióforos con 24 micras de forma ramificadas en forma de uvas con conidios en sus extremos y los conidios con 5.7 micras de forma esféricas.
4. En la investigación en el laboratorio se pudo observar que el hongo desarrolla normalmente en una temperatura de 23.5 grados centígrados y su ciclo de vida se cumplió a los 6 días de haber realizado el cultivo.

5. Con toda esta información valiosa obtenida durante el trabajo de investigación me permitió desarrollar una guía didáctica para dar a conocer las macro microestructuras y el ciclo de vida a los agricultores del cultivo de fresa (*Fragaria vesca*) con la cual se desarrollan futuras investigaciones.

## RECOMENDACIONES:

1. Para apreciar de mejor manera las características de las macro estructuras de *Botrytis* (*Botrytis cinerea*) se recomienda coger la muestra en campo, llevar al laboratorio, preparar PDA, desinfectar en la autoclave semiautomática 2540-23 litros a 100°C, sembrar en las cajas petri y poner en la incubadora IN10 a 23.5°C se debe revisar cada 24 horas para poder identificar el estadio de las macro estructuras en la cámara de flujo para de esta manera evitar contaminaciones de la muestras.
2. Para la identificación de las micro estructuras del hongo *Botrytis* (*Botrytis cinerea*) se recomienda utilizar el Microscopio Trinocular CX31 con adaptación para cámara INFINITY 1 con diferentes graduaciones (4X); (10X); (20X); (40X) y (100X) para obtener un mejor resultado.
3. Para evitar contaminación en el laboratorio durante la reproducción de los hongos es necesario utilizar materiales y vestimentas esterilizadas, también se debe utilizar una gota de azul de metileno ya que el agua destilada produce burbujas y no permite observar de forma adecuada el hongo en el microscopio.
4. Se recomienda que la presente investigación se use y sirva como base para determinar los factores que influyen en la producción agrícola (control del patógeno en sus diferentes estadios, microclima, humedad, nutrición) para garantizar una agricultura de precisión.

## GLOSARIO

**Aislamiento.-** Consiste en la separación de un patógeno a partir de un hospedante y su cultivo en un medio nutritivo.

**Agar.-** Es una sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de las algas marinas, se utiliza para reparar medios de cultivo nutritivos en los que se estudia y se cultiva microorganismos.

**Cepa.-** Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro, aislados, grupo de aislados, similares, una raza.

**Conidio.-** Espora asexual de un hongo formada a un extremo de un conidióforo.

**Conidióforos.-** En ciertos hongos es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios.

**Cuerpo fructífero.-** Estructura compleja de los hongos que está formado por esporas.

**Espora.-** Una espora es una célula reproductiva producida por las plantas (hongos, musgos, helechos) y por algunos protozoarios y bacterias. La espora a menudo se desarrolla completamente después de un estado de latencia o hibernación.

**Esterilización.-** Eliminación o muerte de todos los microorganismos que contiene un objeto o sustancia, y que se encuentran acondicionados de tal forma que no pueden contaminarse nuevamente.

**Fitopatógeno.-** Es un microorganismo que causa enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular causado por la secreción de enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, por la absorción de nutrientes.

**Hongo.-** Los hongos son un grupo de seres vivos diferentes de las plantas y de los animales, razón por la cual se clasifican en un reino aparte llamado Fungi.

**Hifas.-** Son elementos filamentosos cilíndricos característicos de la mayoría de los hongos que conforman su estructura vegetativa. Están constituidos por una fila de células alargadas envueltas por la pared celular que, reunidas, forman el micelio.

**Hospedante.-** Planta que es invadida por un parásito y de la cual obtiene sus nutrientes.

**Medio de cultivo.-** Es un medio de cultivo nutritivo preparado donde se cultivan microorganismos o células vegetales.

**Micelio.-** Es la masa de hifas que constituye el cuerpo vegetativo de un hongo.

**Purificación.-** Aislamiento y concentración de partículas virales en forma pura, libre de los componentes celulares.

**Septado.-** Que tiene tabiques o septos.

**Septo.-** Paredes transversales de las hifas o esporas.

**Signos.-** Son patógenos, partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

**Síntomas.-** Reacciones o alteraciones internas o externas que sufre una planta como resultado de una enfermedad o factor ambiental y que lleva al desarrollo de síntomas.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. AGRIOS. (1988). *Ciclo de vida de botrytis cinerea*.
2. AGRIOS, G. (1997). *Clasificación taxonomica de la botrytis cinerea*.
3. AGRIOS, G. (1999). *Fitopatología*. Mexico: LIMUSA.
4. AGRIOS, G. (2005). *Fitopatología*. Mexico: LIMUSA.
5. AGRIOS, G. (2005). *Plant Pathology*. Nueva York: Academic Press.
6. AGRO, R. E. (2013). Agricultores le apuestan al cultivo de fresa. *REVISTA EL AGRO*.
7. ALVAREZ, L. C. (2013). Clasificación taxonomica de la fresa .
8. ANGELFIRE. (3 de Noviembre de 2001). Producción de fresa. *Ingeniería agrícola*.
9. CALZADA, B. (2002). *Frutales nativos*. Lima, Perú: El Estudiante.
10. CIAMPI. (2002). Introducción a la patología vegetal. *Universidad Austral de Chile*, pg 232.
11. CORPOICA. (2002). Definición del cultivo de fresa.
12. CSC; CMCC. (2003). California strawberry commission (CSC) y The California Minor Crops Council (CMCC). 2003. *Apest management strategic plant for strawberry production*.
13. ECHANDI. (2001). Fusarium laboratory guide to identification of the major species.
14. ELAD, Y & STEWART, A. (2004). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer.
15. FHIA. (2007). *Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias*. Obtenido de <http://fhia.org.hn/downloads/fhiainfdic2007.pdf>
16. GAD COTOPAXI. (2015). Condiciones edafoclimaticas de Salcedo.

17. HERRERA, L., & MAYEA, S. (1994). *Fitopatología General*. La Habana, Cuba: Felix Varela
18. KENADA.(2004). Fitopatologia general. Universidad Catolica Agropecuaria del Topico Seco, unid 5.
19. KERSSIES, A. (1994). *Epidiologia de la botrytis cinerea*.
20. L,C. (2002). Medios de cultivos usados.
21. MOHSIN, G. (1990). *Le cycle sexue in vitro de Botryotinia fuckeliana* .
22. REVIBEREOMMICOL. (2000). Factores de patogenicidad de botrytis cinerea.
23. PROEXANT, .(1993). Problemas fitosanitarios en poscosecha de fresa.
24. TOLEDO, M., & AGUIRRE, V. (1999). Moho Gris (Botrytis cinerea) Enfermedad a combatir en cultivo y almacenamiento de la fresa.
25. UNCANT, E. (2012). *Signos y sintomas de la botrytis en el cultivo de fresa*.
26. ZAMBRANO, A. (18 de Mayo de 2015). Agricultores le apuestan al cultivo de fresa en Ecuador. *Encontexto*.
27. ZIPMEC. (2013). Fresas - historia, produccion y comercio. *Encontrado en: [www.zipmec.eu/Fresas-historia-produccion-comercio.html](http://www.zipmec.eu/Fresas-historia-produccion-comercio.html)*.



## ANEXO 1



Universidad  
Técnica de  
Cotopaxi

UNIDAD ACADÉMICA DE RECURSOS AGROPECUARIOS Y RECURSOS  
NATURALES

**GUÍA  
DIDÁCTICA**

**“CARACTERIZACIÓN  
MORFOLÓGICA DEL  
HONGO  
FITOPATÓGENO  
BOTRYTIS (*Botrytis  
cinerea*)”**

## DEDICATORIA

-  
-

La presente guía didáctica realizada la dedico especialmente a mí querida institución como es la Universidad Técnica De Cotopaxi y a la Unidad Académica De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales, Carrera De Ingeniería Agronómica por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios, y a todos los docentes que fueron parte

# ÍNDICE

DEDICATORIA	2
INTRODUCCIÓN	4
RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL LABORATORIO	5
TOMA DE MUESTRA	6
MATERIALES Y REACTIVOS	7
PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PDA	7
TIPOS DE AISLAMIENTOS	8
PURIFICACIÓN	9
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA	9
SIGNOS Y SÍNTOMAS	10
MACRO Y MICRO ESTRUCTURAS	10
CICLO DE VIDA DE ( <i>Botrytis cinerea</i> ), EN CONDICIONES DE LABORATORIO	11
BIBLIOGRAFÍA	12

## INTRODUCCIÓN

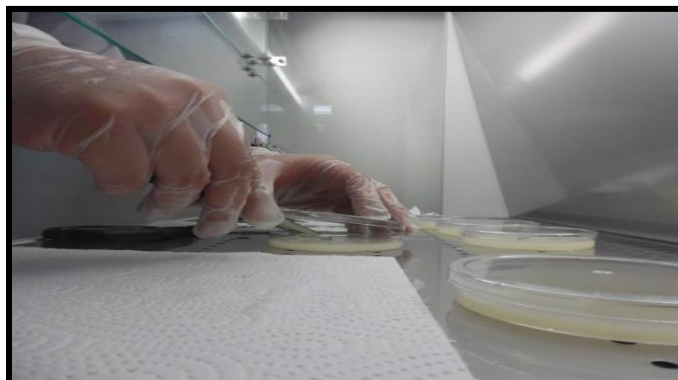
Este trabajo de investigación se realiza debido a que en Ecuador el cultivo de Fresa se retoma, porque es una fruta rentable y con una gran demanda en el mercado, el 60% de las plantaciones crece a cielo abierto y las otras, bajo invernadero. Pichincha tiene una producción nacional del 50% de superficie. Luego en Tungurahua con el 20 % y el resto se reparten entre Chimborazo, Cotopaxi y parte de Imbabura. Azuay.

Los problemas fitosanitarios en las áreas de producción de fresa en el Ecuador más frecuentes y de mayor importancia, son: *Botrytis cinerea*, *Oidium fragariae*, *Phytophthora fragaria*, *Verticillium alboatrum*, *Mycosphaerella fragarie*.

La *Botrytis (Botrytis cinerea)* es una de las principales limitantes de la producción en el cultivo de fresa que se manifiesta como un recubrimiento algodonoso que desvaloriza comercialmente el fruto. Las plantas se muestran más débiles, con bajo rendimiento y frutas de menor calidad debido a una mayor incidencia de la enfermedad. En algunos casos esta enfermedad es capaz de atacar hasta el 95% de frutos después de 48 horas de cosechados.

## OBJETIVO

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno *Botrytis (Botrytis cinerea)* en condiciones de laboratorio.



## RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL LABORATORIO

- No ingresar con bebidas o alimentos.
- Ingresar con mandil, guantes, cofias y protectores de calzado.
- Tener el lugar trabajo en orden y limpio antes, durante y al finalizar la práctica.
- Tener cuidado con los materiales y equipos del laboratorio.
- Seguir los pasos indicados para realizar el medio de cultivo para no desperdiciar reactivos y a su vez realizar un pesaje correcto con la balanza.
- Revisar antes de encender el microscopio, que la luz del condensador este apagado para evitar algún tipo de daño.



### **TOMA DE MUESTRAS**

El método utilizado para esta actividad puede ser por cuotas, en la cual se fija un número de individuos que reunieron unas determinadas condiciones.

### **PROCEDIMIENTOS EN LA TOMA DE MUESTRAS**

Se extrae partes de plantas afectadas con una tijera, en cada corte se esteriliza los materiales con alcohol, las muestras vegetales se envasan en bolsas de papel para que el exceso de humedad sea absorbido por el papel, posteriormente se procede a colocar en una funda ziploc con su respectiva codificación y se traslada inmediatamente al laboratorio.

## MATERIALES Y REACTIVO

### Reactivos.

- 3,5 gr de levadura
- 30 gr de Agar
- 35 gr de glucosa “azúcar”
- 350 gr de papa
- 955 ml de agua desmineralizada

### Materiales

- 1 balanza digital
- 1 cocina eléctrica
- 1 cuchara de cocina
- 1 cuchillo

- 1 olla
- 1 tamiz
- 1 varilla de agitación
- \* 1 vaso de precipitación de 1000ml
- \* 2 matraces de 500ml
- \* 2 vasos de precipitación de 100ml
- \* 40 cajas petri
- \* 7 papel filtro
- \* Papel absorbente
- \* Papel aluminio
- \* Auto clave
- \* Cámara de flujo laminar

## PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA

1. Lavar y cortar en pequeñas partes, y pesar 350 gramos de papas
2. Colocar la muestra en una olla con 875ml de agua desmineralizada para la cocción en una estufa eléctrica.
3. Retirar la olla de la estufa, y tamizar el contenido; medir la cantidad de agua que sobro y se añade la cantidad de agua que se perdió en la cocción.
4. Pesar el agar, la levadura y la glucosa en papel filtro en una balanza digital.
5. Diluir la levadura y la glucosa en 80ml de agua desmineralizada (caliente), en un vaso de precipitación de 100ml con la ayuda de una varilla



6. Colocar el vaso de precipitación de 1000ml a baño María y agregamos 30gr de agar y la solución disuelta en 80ml de glucosa y levadura.

7. Mezclar con una varilla de agitación hasta obtener una solución homogénea.

8. La solución obtenida se verterá en dos matraces de 500ml equitativamente, después y tapar los matraces con papel absorbente en forma de corcho y papel aluminio.

9. Colocar los matraces en el autoclave para su esterilización por un lapso de una hora a 121°C.

10. Enfriar la solución y colocar en cajas petri, hasta cubrir la base de las mismas.



## TIPOS DE AISLAMIENTOS

### **Aislamiento directo.**

Para esto se toma una muestra de este material con una aza de cultivo esterilizada “flameada con un mechero de alcohol”, para finalizar se coloca directamente sobre el medio de cultivo solidificado de PDA.



### **Partes vegetales en PDA.**

Se procede a tomar porciones de tejido enfermo para desinfectarlos en una solución 2:1 de alcohol a 75°G.L, se lava dos veces con agua desmineralizada y se elimina los excesos de la misma, y colocar en el medio de cultivo PDA.





## PURIFICACIÓN

Consiste en realizar cortes de las puntas de micelio del borde de la colonia en crecimiento con la ayuda de un bisturí estéril. Esta pequeña porción del hongo y agar se deposita en otras cajas con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtiene cultivos puros.



## INCUBACIÓN

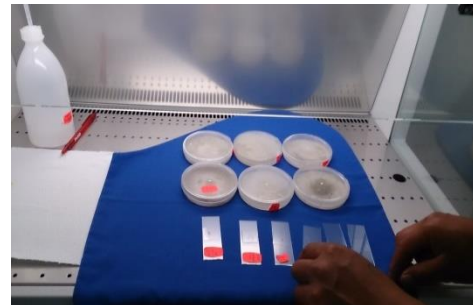
La incubación se la realiza a 23,5 °C en una incubadora IN110, por el lapso de 15 días según el desarrollo del micelio del hongo.



## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

### OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

**Montaje por disección:** Con un aza estéril o bisturí, se toma una muestra del hongo y se ubica sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada, con la misma aza se extiende el micelio, después se coloca el cubreobjetos los mismos que tienen que llevar una etiqueta para evitar confusiones, para finalizar se observa en el microscopio con aumentos de 4x, 10x, 20x y 100x.



## SIGNOS Y SÍNTOMAS:

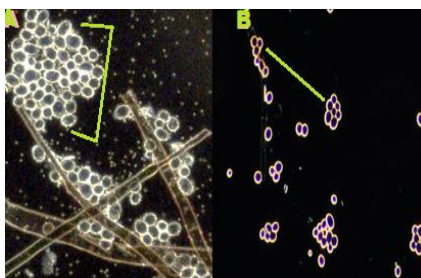
Los síntomas del moho gris fueron manchas irregulares, difusas, firmes e inicialmente de color amarillento o marrón claro, las cuales ocurren en cualquier parte del fruto, pero especialmente en aquellas que están en contacto con el suelo u otros frutos enfermos. En estados avanzados los frutos son cubiertos por un micelio de color gris de apariencia filamentosa,

Los frutos con pudrición blanda, presentan una decoloración marrón claro, seguida de un ablandamiento del tejido y una segregación acuosa. Luego, fueron cubiertos por un micelio blanco algodonoso, en donde se destacan puntuaciones negras correspondientes a los esporangios del patógeno.



## MICRO ESTRUCTURAS:

Las micro estructuras de las muestras infectadas por *Botrytis (Botrytis cinerea)* con la ayuda de un microscopio óptico OLYMPUS CX31 el cual estaba incorporado con una cámara INFINITY1-2CB las mismas que se observan con un aumento de 20X, el micelio de *Botrytis cinerea*, consiste de hifas desarrolladas e irregulares, septadas y ramificadas, de distinto grosor formando micelio en la misma aparecen los conidióforos formado por un racimo de conidios de color blanquecino y una dispersión de conidios semicirculares de distintos tamaños.



## MACRO ESTRUCTURAS:

El hongo en el medio de cultivo PDA, en sus primeros estadios presento un micelio de color blanco, con el transcurso del tiempo todo el medio de cultivo estaba invadido por el hongo con formas anilladas irregulares, continuas y de textura algodonosa, en la revisión final se identificó un anillo irregular con pústulas de color café.

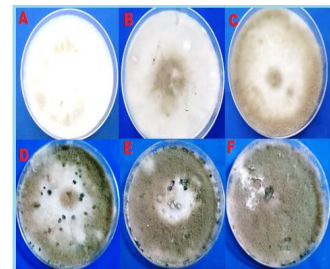





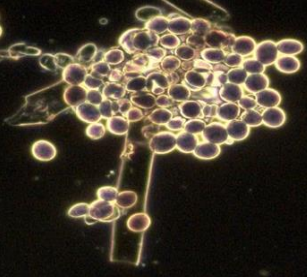

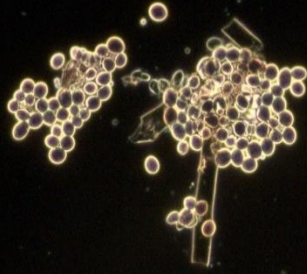


Tabla. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* en condiciones de laboratorio.

Actividad	Tiempo y Temperatura	Imagen del hongo	Observación en microscopio	Aumento
Inoculación del hongo	10 minutos / 23.5 °C			20x
Presencia de hongo infectado	2 días / 23.5 °C			20x
Presencia de conidióforos	6 días			40x
Presencia de conidios	11 días			40x

El patógeno *Botrytis cinerea* produce gran cantidad de micelio gris y varios conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan a un racimo de uvas. El hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego éstos son diseminados por el viento. El hongo a menudo produce esclerocios irregulares, planos, duros y de color negro. Algunas especies producen a veces una fase perfecta de Sclerotinia, en la que las ascosporas se forman en un apotecio.

## **BIBLIOGRAFÍA:**

ÁLVARES & VÁSQUEZ. (2009). Técnicas básicas de Microbiología. *INTRODUCCIÓN A LOS HONGOS FILAMENTOSOS.*, 7,8. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.

GONZALES. (2012). Patologías Bióticas de la Madera de los bosques templados de Chile. 10. Chile.

<http://www.abcagro.com/fertilizantes/botrytis.asp>

ROMERO. (1988). *Hongos fitopatógenos* (1° ed.). Luciano Tress V.

TORTORA Y OTROS. (2007). *Introducción a la microbiología* (9° ed.). Madrid, España: EDITORIAL MEDICA PANAAMERICANA.

## ANEXO 2

### TRABAJO EN CAMPO

#### Reconocimiento del lugar (Salache Barbapamba).



#### Selección de muestras de la planta con Botrytis (*Botrytis cinerea*).





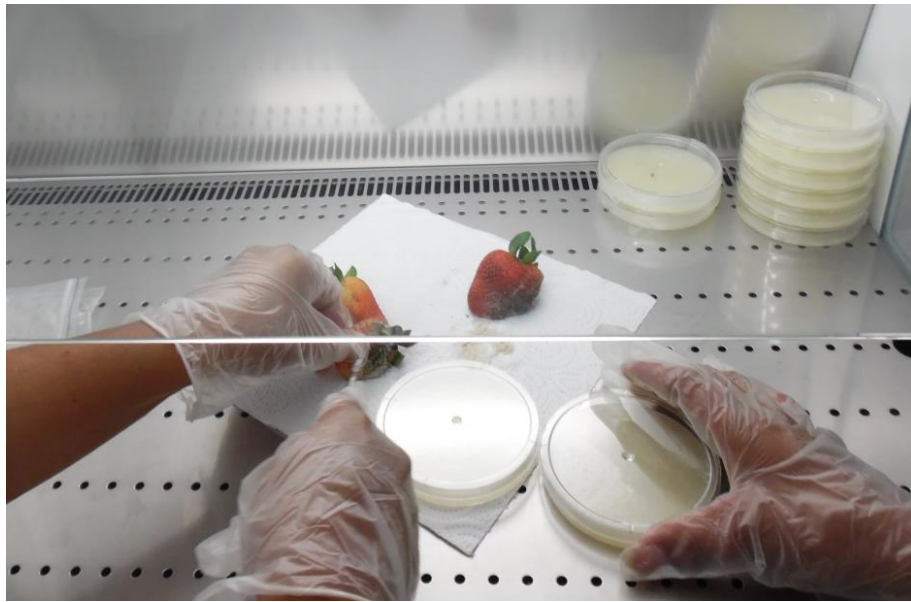
**Selección del fruto infectado con Botrytis**



## ANEXO 3

### TRABAJO EN LABORATORIO

Cajas petri con PDA y fruto infectado con botrytis en cámara lista para la siembra.

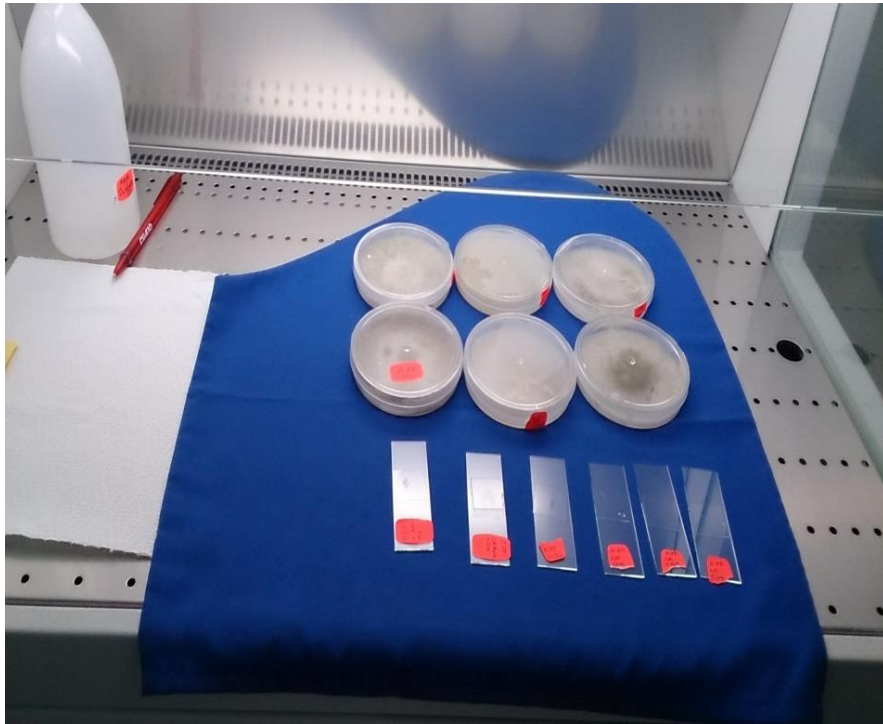


Siembra de *Botrytis* (*Botrytis cinerea*) en la caja petri con medio de cultivo PDA.





**Toma de las muestras de las 6 cajas petri y puestas en los porta objetos para ser revisados en el microscopio.**



## **EQUIPOS DE LABORATORIO**

### **Autoclave**



**Balanza de precisión**



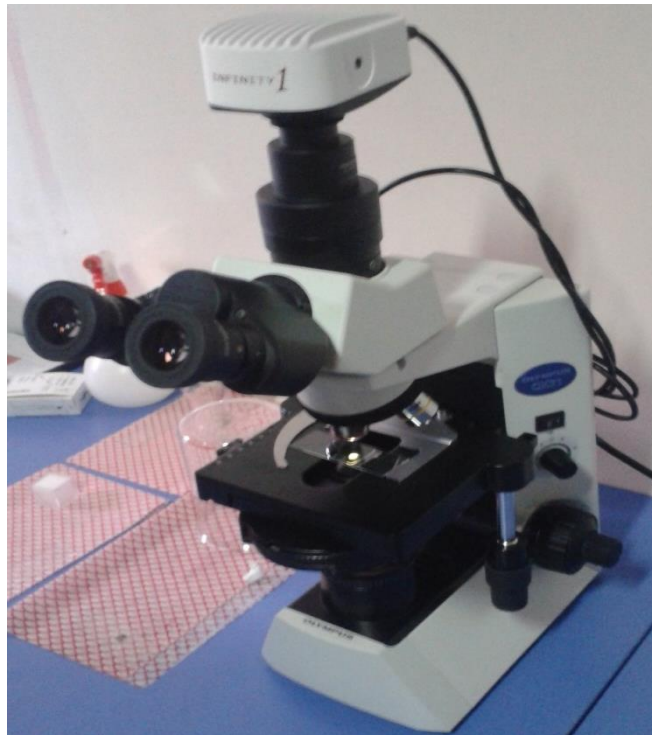
**Cámara de crecimiento o incubadora**



**Cámara de flujo laminar**



**Microscopio**



**Estufa eléctrica**



**Refrigeradora**

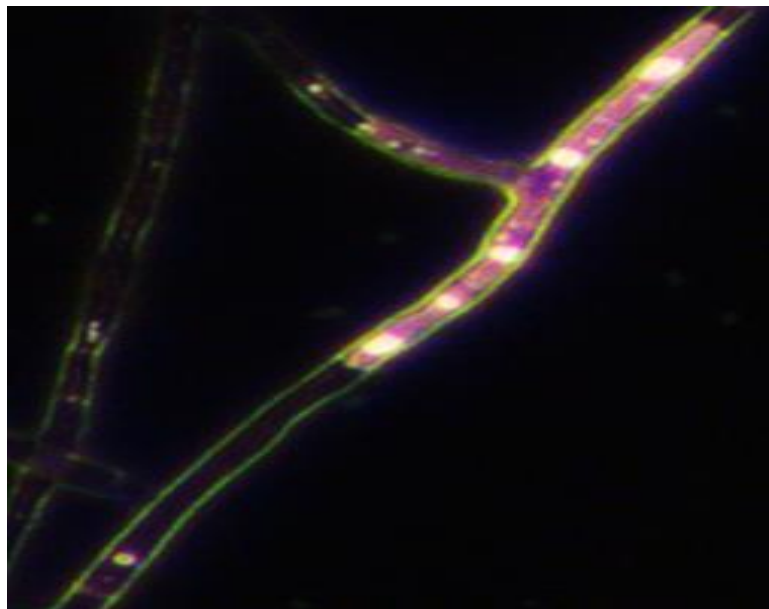


## ANEXO 4

### MICROESTRUCTURAS OBSERVADAS EN EL LABORATORIO



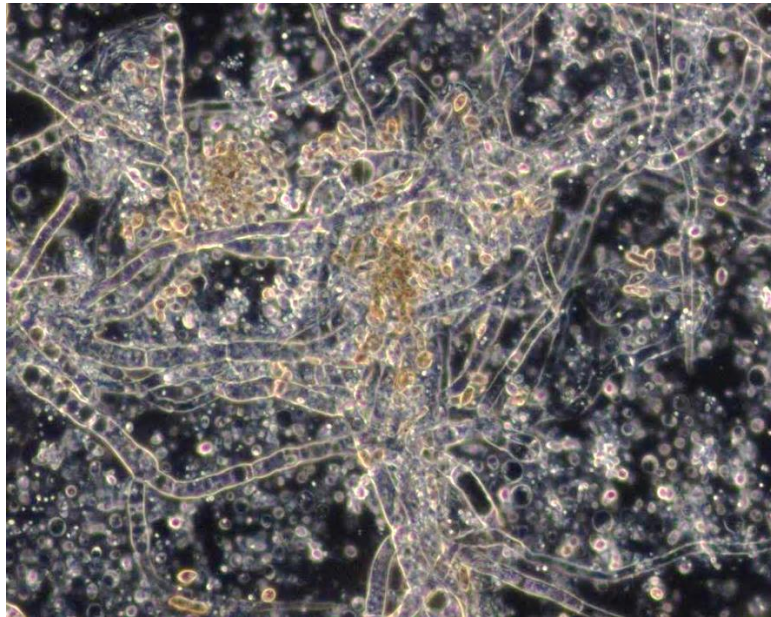
Microestructura de micelio observada con lente 20 X



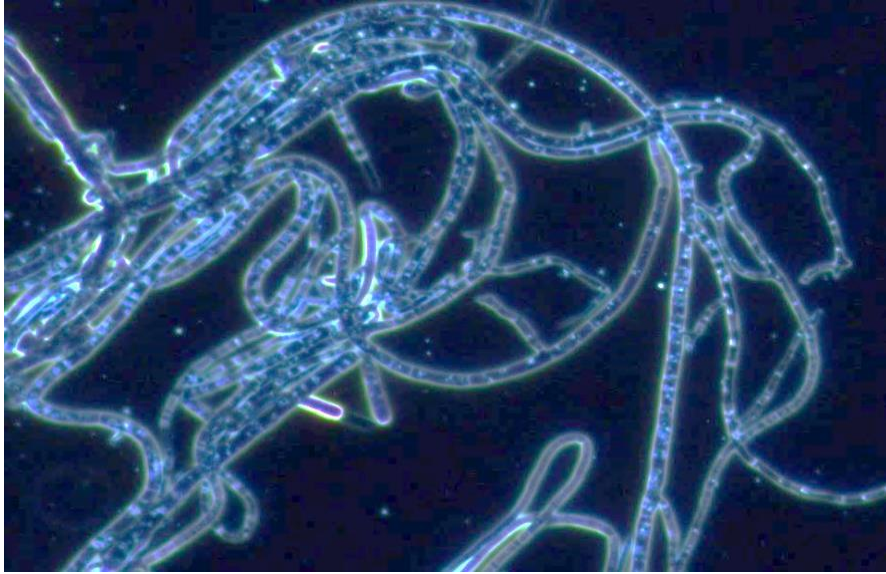
Microestructura de micelio observada con lente 40 X



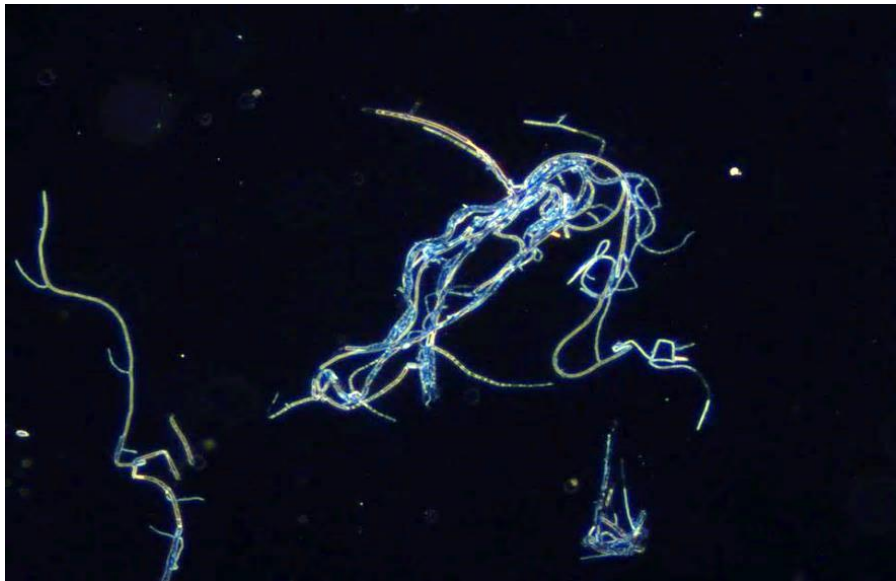
Microestructura de micelio observada con lente 20 X



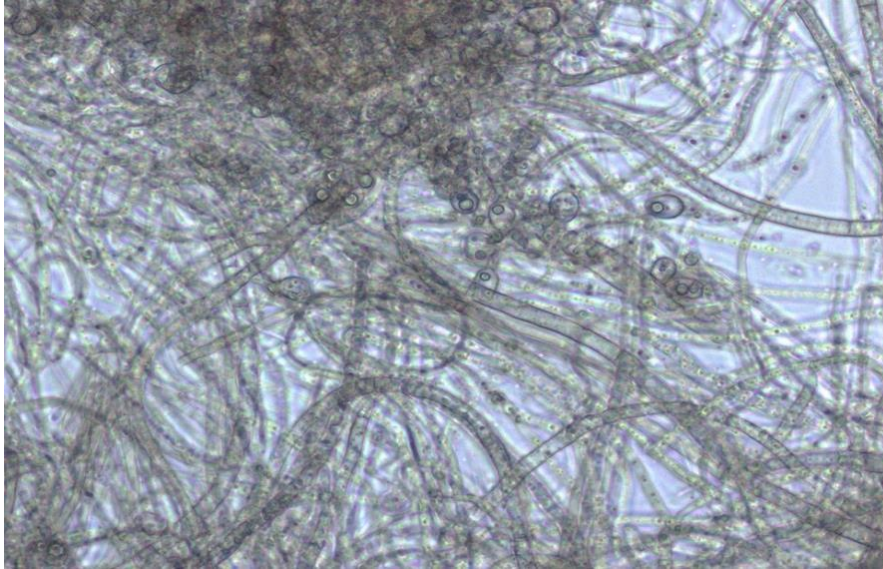
Microestructura de micelio y formación de conidioforos observada con lente 20 X



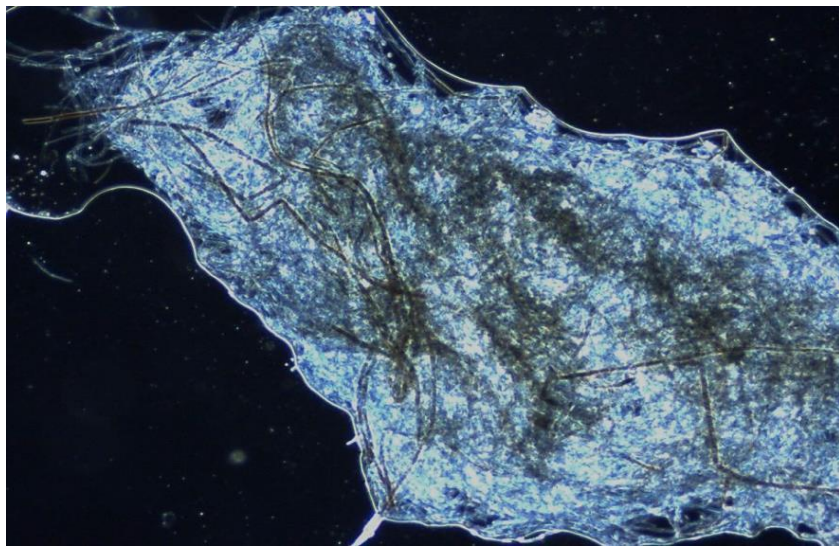
Microestructura de micelio observada con lente 40 X



Microestructura de micelio observada con lente 20 X

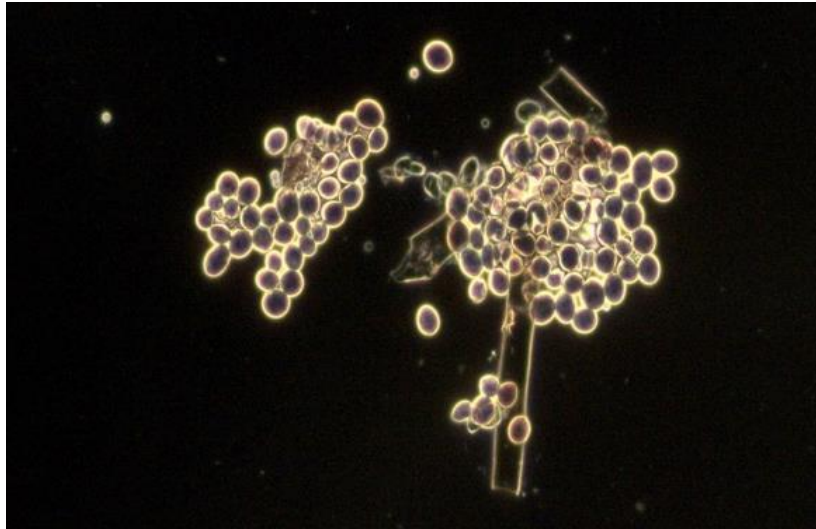


Microestructura de micelio observada con lente 20 X

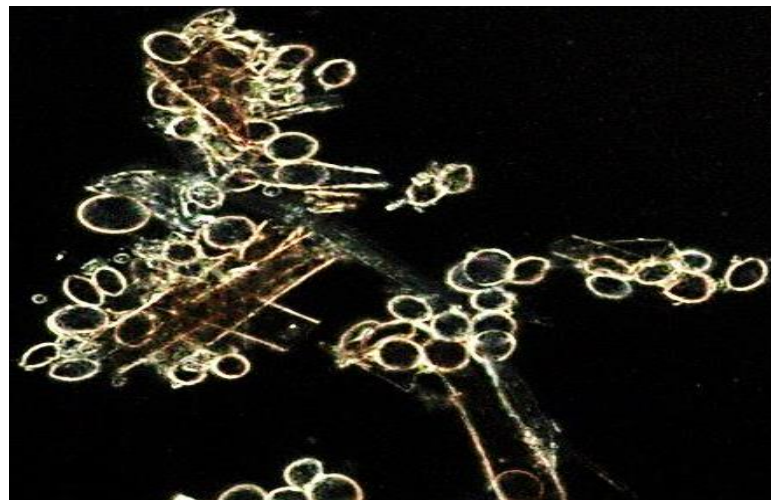


Microestructura de micelio observada con lente 40 X

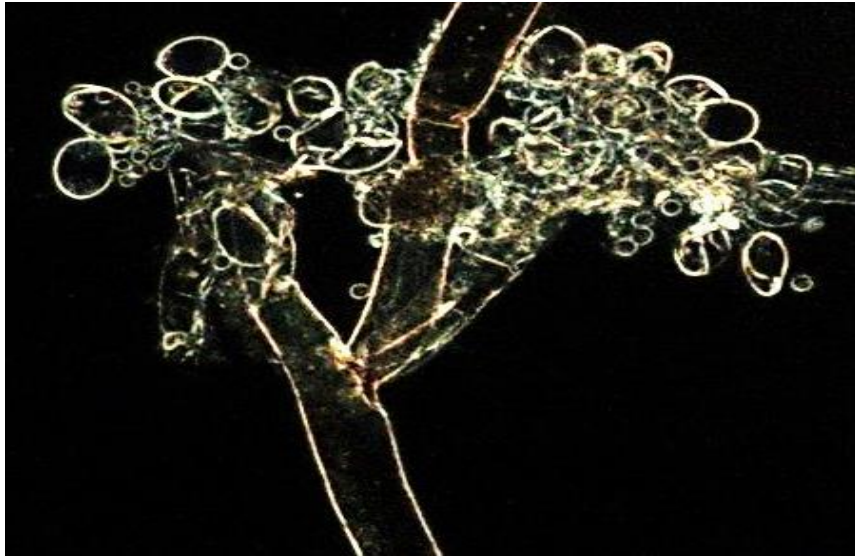




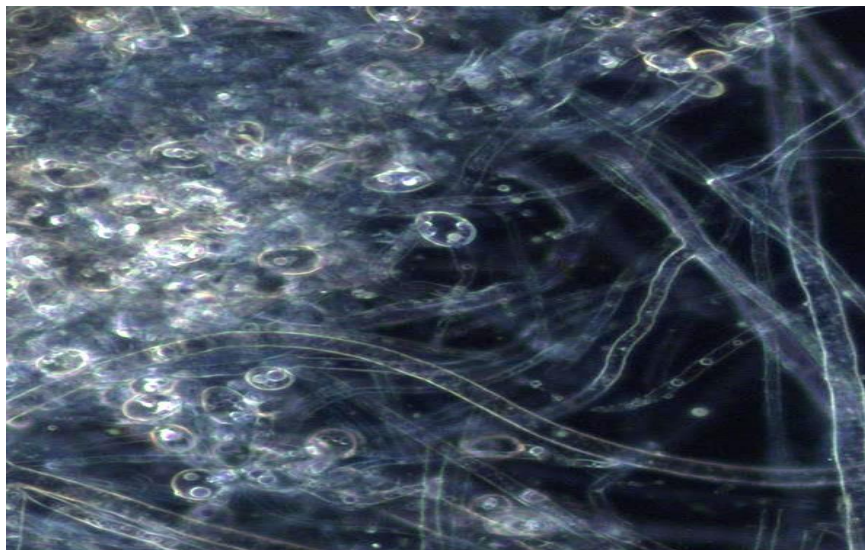
Microestructura de conidioforos y conidios observada con lente 40 X



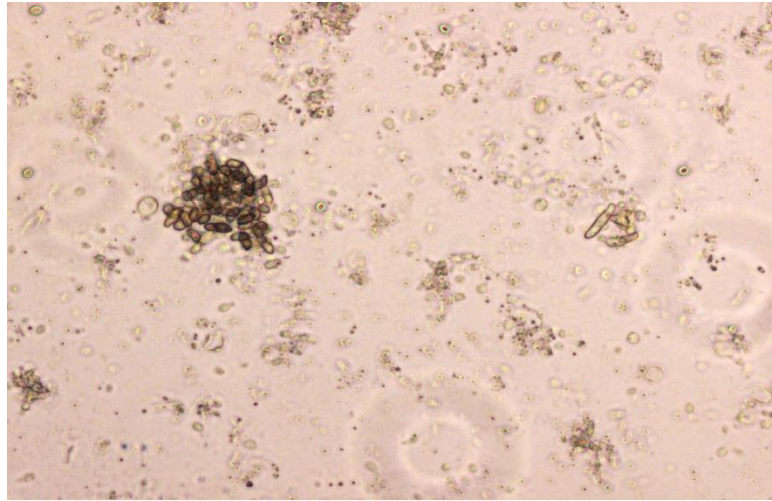
Microestructura de conidioforos y conidios observada con lente 40 X



Microestructura de conidioforos y conidios observada con lente 40 X



Microestructura de conidioforos y conidios observada con lente 20 X



Microestructura de micelio y conidios observada con lente 40 X

## ANEXO 5

### COSTOS

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
<b>Materiales de aseo</b>			
Cofias	15	0,3	4,5
Escoba	1	2	2
Franela	2	4,5	9
Guantes	15	0,25	3,75
Mascarillas	15	0,25	3,75
Papel de cocina	2	3,5	7
Trapeador	2	3	6
Zapatos	15	0,35	5,25
<b>REACTIVOS DE ASEO</b>			
Alcohol	1	5,5	5,5
Kalipto	1	4,3	4,3
Yodo	1	3,6	3,6
<b>MATERIALES DE LABORATORIO</b>			
Asa de inoculación de cromo	2	3,6	7,2
Cajas mono Petri descartables	40	0,21	8,4
Cajoneras de plástico	1	7,5	7,5
Cintas de Ph	10	0,14	1,4
Colador	1	2	2
Cubre objetos	1	2,5	2,5
Erlenmeyer de 500 ml y 1000 ml	3	5	15
Hojas de bisturí estéril	10	0,04	0,4
Juego de botellón de agua	1	28	28
Laminas porta-objetos	1	2,99	2,99
Lámpara de alcohol	3	3,99	11,97
Olla	1	4	4
Papel aluminio	1	3	3
Papel parafilm	0,5	49	24,5
Pinzas	1	2,08	2,08
Tijeras	1	1,5	1,5
Varilla de agitación	1	3,5	3,5
Vasos de precipitación de 50 ml, 100 ml, 600 ml y 1000 ml	4	2,5	10
<b>REACTIVOS</b>			
Ácido cítrico	1	2,5	2,5

Bidón de Agua	1	2	2
Bacto agar	0,5	88	44
Levadura	1	2	2
Sacarosa	1	2	2
<b>EQUIPOS</b>			
Autoclave semiautomática 2540-23 litros	1	2999,47	2999,47
Balanza	1	30	30
Cámara científica INFINITY 1-2CB	1	2176,56	2176,56
Cámara de flujo laminar aurora mini con base	1	6690	6690
Cámara digital	1	280	280
Cocineta eléctrica	1	30	30
Desecador 250mm de diámetro con tapa	1	229,8	229,8
Destilador de agua WATERWISE 9000	1	511,3	511,3
Incubadora IN110	1	2665,7	2665,7
Microscopio Trinocular CX31	1	2455,68	2455,68
Refrigeradora R1-425 QUARZO INDURAMA	1	767,97	767,97
Termómetro digital	1	25	25
<b>SUBTOTAL</b>			19104,57
<b>Imprevistos (10%)</b>			1910,457
<b>COSTO TOTAL</b>			<b>21015,027</b>