

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



**UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES
CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

TEMA:

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS
FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CEBOLLA LARGA (*Allium
fistulosum*) SECTOR LASSO, CANTÓN LATACUNGA, COTOPAXI 2015”**

Tesis previa a la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo

AUTOR:

Xavier Alejandro Caicedo Yáñez

DIRECTOR DE TESIS:

Ing. Edwin Chancusig MSc.

LATACUNGA – ECUADOR

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, CAICEDO YÁNEZ XAVIER ALEJANDRO, con cédula de ciudadanía N° 050326667-8, actuando en calidad de autor de la tesis denominada **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CEBOLLA LARGA (*Allium fistulosum*) SECTOR LASSO, CANTÓN LATACUNGA, COTOPAXI. 2015”** declaro que el contenido de la presente tesis, es original, auténtica y académica, así como sus comentarios y discusiones emitidas son de exclusiva responsabilidad del autor.

Xavier Alejandro Caicedo Yánez

C.I. 0503266678

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 Director del Tema de Tesis: “**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CEBOLLA LARGA (*Allium fistulosum*) SECTOR LASSO, CANTÓN LATACUNGA, 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 habilitada para presentarse al acto de Defensa de Tesis, la cual se encuentra abierta para posteriores investigaciones.

Ing. Edwin Chancusig MSc.

DIRECTOR DE TESIS

AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

En calidad de miembros del Tribunal de la tesis Titulada: “**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CEBOLLA LARGA (*Allium fistulosum*) SECTOR LASSO, CANTÓN LATACUNGA, COTOPAXI. 2015**”, de autoría del egresado Xavier Alejandro Caicedo Yáñez, CERTIFICAMOS que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones al presente documento.

Aprobado por:

Ing. Edwin Chancusig MSc.

DIRECTOR DE TESIS

Ing. Paolo Chasi

PRESIDENTE

Ing. Luis Benavides

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Fabián Troya. MSc.

OPOSITOR

DEDICATORIA

A Dios, por haberme dado fuerza, valor y sabiduría para culminar esta etapa de mi vida, por haberme dado una familia tan maravillosa que han sido mi soporte y compañía durante toda mi vida.

A mis padres Guillermo y Mariana por ser el ejemplo más grande de sacrificio, constancia y esfuerzo por enseñarme que luchar es de valientes, gracias por aquellos consejos y palabras de aliento cuando decaía, gracias porque han sabido formarme con buenos sentimientos, hábitos y valores, por ser el pilar de mi vida, por su confianza, su amor y su apoyo en cada paso de mi vida.

A mis hermanos Fernando y Esteban por su apoyo constante su amor incondicional, por sus consejos en los momentos difíciles los cuales me ha ayudado a confrontar los retos que se me han presentado a lo largo de mi vida.

A mis tíos, por su apoyo incondicional, por su confianza y cariño, por sus consejos y palabras de aliento para seguir adelante.

A mis primos a quienes quiero mucho, quiero decirles que este logro sirva de ejemplo para que ustedes luchen por lograr sus metas planteadas y puedan vencer cada reto que se les presente en esta vida.

XAVIER

AGRADECIMIENTO

Primero agradezco a Dios por toda las bendiciones que he recibido de él en el momento indicado, y por estar a mi lado en cada paso que doy la 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 acurrucarme en su manto de sabiduría y conocimiento.

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

A mi familia quienes por ello soy lo que soy, amigos y todas las personas que colaboraron y confiaron en mí para culminar este trabajo de investigación.

XAVIER

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	i
AVAL DE DIRECTOR DE TESIS	ii
AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
RESUMEN.....	x
SUMMARY	xi
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS	3
PREGUNTA DIRECTRIZ	4
CAPÍTULO I.....	5
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA	5
1.1. El Cultivo De Cebolla Larga	5
1.1.1. Clasificación Botánica	6
1.2. Enfermedades en el cultivo de la cebolla larga.	6
1.2.1. Secamiento de las puntas (<i>Heterosporium alli</i>).....	6
1.2.2. Pudrición blanca (<i>Sclerotium cepivorum</i>).....	7
1.2.3. Mildiu (<i>Peronospora destructor</i>).....	7
1.3. Hongos Fitopatógenos	8
1.3.1 Características Generales	9
1.3.2 Estructuras Somáticas	9
1.3.3 Hongos Como Patógenos En Las Plantas	10
1.4. Medios De Cultivos Usados En El Aislamiento De Hongos	10

1.5 Estructuras Reproductivas De Hongos	11
1.5.1 Hongos Inferiores Y <i>Pseudohongos</i>	11
CAPÍTULO II	12
2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	12
2.1 Materiales Y Recursos.....	12
2.1.1 <i>Institucionales</i>	12
2.1.2 <i>Recursos Humanos</i>	12
2.1.3. <i>Material De Oficina</i>	12
2.1.5. <i>Materiales De Laboratorio</i>	13
2.2. Diseño Metodológico	15
2.2.1. <i>Investigación Descriptiva</i>	15
2.3. Método.....	16
2.3.1 <i>Métodos Lógicos</i>	16
2.3.2 <i>Técnica</i>	16
2.4. Delimitación Del Lugar De Recolección	17
2.4.1. <i>Ubicación Política</i>	17
2.4.2. <i>Ubicación Geográfica</i>	17
2.5. Delimitación De La Ubicación Del Laboratorio	18
2.5.1. <i>Ubicación Política</i>	18
2.5.2. <i>Ubicación Geográfica</i>	18
2.6 Diagnóstico Del Cultivo	18
2.6.1 <i>Toma De Muestras</i>	19
2.6.2 <i>Procedimientos en la toma de muestras</i>	19
2.7. En Laboratorio.....	19
2.7.1 <i>Aislamiento</i>	19

2.7.2 Purificación	20
2.7.3 Incubación Morfológica	20
2.7.4 Caracterización	20
2.7.5 Descripción	21
CAPÍTULO III	23
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	23
3.1 Determinación Del Hongo Fitopatógeno De Mayor Impacto En El Cultivo De Cebolla Larga (<i>Allium fistulosum</i>).....	23
3.2. Signos Y Síntomas De Mildiu (<i>Peronospora Destructor</i>) En El Cultivo De Cebolla Larga. (<i>Allium fistulosum</i>)	24
3.3 Caracterización De Macro Y Microestructuras De Mildiu (<i>Peronospora destructor</i>)	25
3.3.1 Macro Estructura.....	25
3.3.2. Micro Estructuras	26
3.4. Descripción Del Ciclo De Vida Del Hongo <i>Peronospora destructor</i> En Condiciones De Laboratorio.	31
3.5. Elaboración De Una Guía Didáctica	32
CONCLUSIONES:	33
RECOMENDACIONES:.....	34
GLOSARIO	35
BIBLIOGRAFÍA	37
ANEXOS.	1

ÍNDICE DE CUADROS:

CUADRO 1. Superficie cosechada de cebolla larga en hectáreas	1
CUADRO 2. Clasificación taxonómica de la cebolla larga	6
CUADRO 3. Clasificación taxonómica del mildiu en cebolla larga.	7
CUADRO 4. Condiciones edafoclimáticos.....	17
CUADRO 5. Caracterización de Macro y Micro estructuras del Patógeno.....	25
CUADRO 6. Ciclo de vida de <i>Peronospora destructor</i>	31

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS:

FOTOGRAFÍA 1. Cultivo de cebolla larga (<i>Allium fistulosum</i>)	23
FOTOGRAFÍA 2. Mildiu (<i>Peronospora destructor</i>)	24
FOTOGRAFÍA 3. Signos y síntomas de <i>Peronospora destructor</i>	25
FOTOGRAFÍA 4. Macro estructuras de <i>Peronospora destructor</i>	26
FOTOGRAFÍA 5. Micro estructura de <i>Peronospora destructor</i> con aumento 200x	27
FOTOGRAFÍA 6. Ramificación de esporangióforos con aumento 200x.....	28
FOTOGRAFÍA 7. Conidios de <i>Peronospora destructor</i> con aumento 200x.	28
FOTOGRAFÍA 8. Longitud de conidios con aumento 200x.....	29
FOTOGRAFÍA 9. Esporangióforos ramificados de <i>Peronospora destructor</i> con aumento 1000x.....	29
FOTOGRAFÍA 10. Conidios de <i>Peronospora destructor</i> con aumento 40x	30
FOTOGRAFÍA 11. Conidios y Esporangióforos <i>Peronospora destructor</i> con aumento 100x.....	30

RESUMEN

El desarrollo del presente trabajo "Caracterización Morfológica de Hongos Fitopatógenos En El Cultivo De Cebolla Larga (*Allium fistulosum*) En El Sector Lasso, con coordenadas: 0° 45' 11,30" latitud S, 78° 36' 39,53" longitud W, a una altura de 2850 msnm; en el cantón Latacunga, como resultado de esta investigación se determinó que el hongo fitopatógeno causante de mayor impacto en producción en el cultivo de cebolla larga (*Allium fistulosum*), es el denominado Mildiu (*Peronospora destructor*), ya que puede causar reducciones del rendimiento del 30% al 70%; esto se logró al realizar una determinación en campo, y con ayuda bibliográfica obtenida. El hongo fitopatógeno *Peronospora destructor* presentan signos característicos en la planta de cebolla larga (*Allium fistulosum*), la cual consiste en la aparición de manchas de formas ovales o cilíndricas de color verde-amarillo pálido a café en la hoja; y los síntomas se observan una palidez sin brillo y marchitamiento de las puntas en las hojas adultas.

El trabajo experimental se realizó en el laboratorio implementado en la ciudad de Latacunga, con coordenadas: 0°55'44.8" latitud S, 78° 37'24.2" longitud W, a una altura de 2850 msnm; aquí se realizó la caracterización de las macro estructuras, las mismas que presentaban un micelio de color blanco el mismo que se desarrollado hasta el punto de copar todo el medio de cultivo y el micelio se tornó de un color grisáceo.

Con un microscopio trinocular OLYMPUS CX31, acoplado con una cámara INFINITY 1-2CB, con aumentos de 40x, 100x, 200x, 1000x se caracterizó al hongo *Peronospora destructor* sus micro estructuras, esta se caracteriza por presentar esporangióforos ramificados, no septados y de colores violáceos, con una longitud de 100,42 µm y 13,56 µm de ancho y de igual manera su ciclo de vida este generó presentan esporas con dimensiones de 9,62 µm en promedio a partir del 4 día de infección.

SUMMARY

The development of this present work is the morphological characterization of pathogenic fungus on the green onions crop (*Allium fistulosum*) from Lasso sector with coordinates: 0° 45' 11.30" latitude S, 78° 36' 39.53" longitude W, to a height of 2850 mns; in the Latacunga canton, Cotopaxi province, 2015; as the research results were determined that the phytopathogenic fungus is causing greater impact on crop production of long onion (*Allium fistulosum*). It is dominated Mildiu (*Peronospora destructo.*). can cause yield reductions of 30% to 70%. This was reached by making a determination of field, itself that was based on own criterion and bibliographic help got. *Peronospora destructor* is a causative pathogen of a disease whose characteristic symptom. It is the appearance on the leaves at oval or cylindrical areas of green, yellow, pale brown color. Initially, the symptoms can appear on the adult leaves, and is got a long, dull pale stain.

The experimental work was made in the laboratory implemented of the Latacunga city, with coordinates: 0° 55' 44.8" latitude S, 78° 37' 24.2" longitude W, to a height of 2850 mns, place which is performed the characterization macro structure, themselves that are presented at beginning a mycelium of white color, itself which was developed to the surrounded point, all crop medium, itself which its mycelium took a greyish color.

Themselves that were looked with an Olympus CX31 trinocular microscope, coupled with an INFINITY 1-2CB camera with increases of 40x, 100x, 200x, 1000x, It was characterized by *Peronospora destructor* fungus, their micro structures are characterized by branched sporangiophores not accepted and from purplish colors, with a length of 100.42 µm and 13.56 µm wide, and as soon as its life cycle, this gender has spores with dimensions of 9.62 µm, into average to fourth day of infection.

INTRODUCCIÓN

La superficie de cebolla larga en el Ecuador, según el censo nacional agropecuario INEC- MAG – SICA, en el 2010, es de 4 565 hectáreas. Las provincias con mayor número de hectáreas cultivadas son: Tungurahua con 1 215 ha, Pichincha con 1 140 ha y la provincia de Chimborazo con 889 ha, mientras que la provincia de Cotopaxi tiene 746 ha. (INEC- MAG – SICA, 2010).

CUADRO 1. Superficie cosechada de cebolla larga en hectáreas

PROVINCIA	SUPERFICIE ha
Pichincha	1 140
Cotopaxi	746
Tungurahua	1 215
Chimborazo	889
Cañar	14
Azuay	260
Loja	100
Bolívar	201
TOTAL Hectáreas	4 565

Fuente: (INEC- MAG – SICA, 2010).

Los hongos más característicos del cultivo de cebolla larga son: Mildiu (*Peronospora destructor*), Secamiento de las puntas (*Heterosporium alli*), Pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*) (HIO, 2009).

El poco interés de los agricultores para la prevención y control de hongos fitopatógenos ocasiona pérdidas en las cosechas provocadas por el ataque de mildiu (*Peronospora destructor*), en el sector de Lasso, razón por la cual se debe dar alternativas en el manejo de la enfermedad causada por el hongo (*Peronospora destructor*). (HIO, 2009).

JUSTIFICACIÓN

El motivo de esta investigación es debido a que el cultivo de cebolla larga (*Allium fistulosum*), representa para el país una fuente indispensable de ingresos para el sector Agropecuario; según el Censo Nacional Agropecuario realizado por el INEC, MAG- SICA, 2010. El país viene enfrentando una gran cantidad de problemas fitosanitarios en el cultivo lo cual ocasiona pérdidas en la competitividad a nivel provincial.

La importancia de esta investigación se basa en los siguientes antecedentes: el poco interés de los agricultores, la no formación de asociaciones, y la falta de tecnificación de los cultivos, debido a los problemas planteados existe una alta incidencia de hongos fitopatógenos: mildiu, secamiento de las puntas, pudrición blanca, roya entre otros, en los cultivos de cebolla larga en el sector de Lasso; por tal motivo se realizó la caracterización morfológica, lo cual permitirá identificar con mayor eficacia al hongo, tomar decisiones oportunas al momento de su control y reducir las pérdidas de productividad.

Es necesario establecer una base de información que servirá para tomar decisiones oportunas, para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que permitirá reducir los costos e incrementar la producción y así aumentar sus ingresos económicos, por tal motivo los resultados de la investigación servirán como una guía didáctica a los agricultores del a los agricultores sector Lasso y estudiantes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción en el cultivo de cebolla larga (*Allium fistulosum*), Sector Lasso, Cantón Latacunga. Cotopaxi. 2015.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo de cebolla larga (*Allium fistulosum*).
- Identificar signos y síntomas del hongo fitopatógeno de la cebolla larga (*Allium fistulosum*) 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, microestructuras y ciclo de vida del hongo fitopatógeno Mildiu (*Peronospora destructor*) en condiciones de laboratorio?

CAPÍTULO I

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. El Cultivo De Cebolla Larga

El origen primario de la cebolla se localiza en Asia central, y como centro secundario el Mediterráneo, pues se trata de una de las hortalizas de consumo más antigua. Las primeras referencias se remontan hacia 3 200 a.C. pues fue muy cultivada por los egipcios, griegos y romanos. Durante la edad media su cultivo se desarrolló en los países mediterráneos, donde se seleccionaron las variedades de bulbo grande, que dieron origen a las variedades modernas. (TERRANOVA, 2001).

El Ecuador dispone de condiciones ambientales favorables para el cultivo y de cebolla larga de una infinidad de especies vegetales que pueden ser consideradas como hortalizas tanto en la sierra como en la costa. Al disponer de una ecología favorable, es obvio, que el cultivo o explotación de las hortalizas represente para el país un rubro de gran importancia en la estructura de la producción alimentaria. En cuanto se refiere a la alimentación humana las hortalizas juegan un papel fundamental. Ellas constituyen el cuarto grupo de alimento por su alto contenido vitamínico y mineral. Al haber una sobreproducción de hortalizas existe la opción de reducir las posibles pérdidas orientándoles a la agroindustria, que utiliza como insumo a estos vegetales para la preparación de elaborados, que a más de servir para entregar productos de alta calidad al consumidor, utiliza mano de obra. La explotación hortícola a más de tener una excelente demanda en los mercados locales, proyecta tipos de cultivos no tradicionales hacia el gran mercado internacional. (ALTIERI, 2008).

1.1.1. Clasificación Botánica

CUADRO 2. Clasificación taxonómica de la cebolla larga.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Liliopsida
Orden	Asparagales
Familia	Alliaceae
Género	<i>Allium</i>
Especie	<i>A. fistulosum</i>

Fuente: (COLOMBO & OBREGON, 2001).

1.2. Enfermedades en el cultivo de la cebolla larga.

Las principales enfermedades presentes en la producción y reconocidas en la actualidad, afectan los diversos órganos de las plantas de cebolla de larga. Entre las enfermedades que causan mayor daño podemos mencionar las siguientes. (TERRANOVA, 2001).

1.2.1. Secamiento de las puntas (*Heterosporium alli*)

Es producido por el hongo *Heterosporium alli*, comienza por la presencia de pequeñas manchas alargadas o elípticas e irregulares, un poco hundidas de color blanco y en ocasiones gris claro en el centro; algunas veces se aprecia un margen azulado. Estas manchas se pueden unir y necrosar grandes áreas de la hoja, dando la apariencia de un secamiento generalizado en las puntas de las hojas. Para el manejo de esta enfermedad se recomienda no descuidar el buen manejo del cultivo, de modo que las plantas crezcan con buena fertilidad, riego adecuado, manejo de malezas, etc. (HIO, 2009).

1.2.2. Pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum*)

Es una de las enfermedades que causan más daño a las cebollas y el ajo a nivel mundial. Es causada por el hongo *Sclerotium cepivorum*. Los síntomas iniciales se observan en las hojas en donde se produce un amarillamiento progresivo desde las puntas hacia sus bases. Paralelamente, y en la base de la cebolla, se produce un abundante crecimiento algodonoso (micelio), y al avanzar la enfermedad se forman unos cuerpos negros, redondos, del tamaño de la cabeza de un alfiler que son las estructuras de reproducción del hongo llamadas esclerocios, las cuales pueden permanecer y sobrevivir en el suelo por muchos años, en residuos de cosechas. Los ámbitos húmedos y fríos, suelos húmedos y temperaturas del suelo entre 10 y 23 °C. Favorecen el desarrollo de esta enfermedad, la cual disemina por el agua del riego o por el drenaje superficial del agua de lluvia, también por el uso de implementos contaminados con suelo infectado. (HIO, 2009).

1.2.3. Mildiu (*Peronospora destructor*)

Aunque su hospedante por excelencia es la cebolla, puede presentarse en otras especies del género *Allium*, limitándose su presencia a este género. Afecta por lo tanto, a *Allium cepa*, *A. schoenoprasum* (cebollino), *A. fistulosum* (cebolleta), *A. porrum* (puerro) y a otras especies cultivadas y silvestres. (COLOMBO & OBREGON, 2001).

CUADRO 3. Clasificación taxonómica del mildiu en cebolla larga.

División:	Eumycota
Subdivisión:	Mastigomycotina
Clase:	Oomycetes
Orden:	Peronosporales
Familia:	Peronosporacea

Fuente: (COLOMBO & OBREGON, 2001).

- **Sintomatología**

Las plantas muestran una disminución del crecimiento con una ligera decoloración verde pálida. En hoja y escapos florales presentan unas manchas pardas claras que cuando fructifican toma un color gris violáceo tiempo coalescen unas con otras pudiendo llegar a cubrir gran parte del área foliar del cebolla larga afectados. (HIO, 2009).

- **Análisis de la muestra**

Con frecuencia, la muestra ya llega fructificada de campo, si no es así, se seleccionan fracciones vegetales con manchas pardas claras y se introducen en cámara húmeda para que esporulen y se puedan observar al microscopio las estructuras del hongo. Posteriormente se hace una preparación en porta para su observación en el microscopio. (HIO, 2009).

- **Identificación**

Fructificaciones arborescentes que emergen de los estomas. Poseen esporangióforos ramificados, no septados y de colores violáceos, con una longitud de 122-150 μm y 7-18 μm de ancho. Presentan de dos a seis brazos monopodiales que acaban en dos esterigmas. Albergan de tres a sesenta y tres esporangios. Peronospora destructor cebolla Mildiu de la cebolla *Allium fistulosum*. Cebolla con las puntas necrosadas. Manchas en hoja de color violáceo. Arriba P. destructor. Abajo, presencia de Stemphyllium spp. en zona afectada por mildiu. Los esporangios son de forma piriforme a fusiforme, con un tamaño de 18-29 X 40-72 μm y unidos a los esporangióforos por su extremo final. Son de pared fina y poseen una tenue papila en su zona proximal. (VIRÁNYI, 1992).

1.3. Hongos Fitopatógenos

FHIA, (2007), 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 filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que tienen quitina, celulosa, o ambos componentes. (AGRIOS, 1999).

1.3.1 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).

1.3.2 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).

1.3.3 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. (AGRIOS, 2005).

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 plantas. (AGRIOS, 2005).

1.4. Medios De Cultivos Usados En El Aislamiento De Hongos

FRENCH & HEBERT, (1980), manifiestan que los medios de cultivo utilizados habitualmente que se encuentran en el mercado son:

- **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. (FRENCH & HEBERT, 1980).

La temperatura habitual de incubación de los hongos es entre 25 y 28 °C.

1.5 Estructuras Reproductivas De Hongos

1.5.1 Hongos Inferiores Y Pseudohongos

Los hongos inferiores se caracterizan por poseer micelio cenocítico. Según su reproducción sexual tenemos:

Clase: Oomycetes: (Ficomycetes) Esta clase de hongos producen oosporas, las que se originan por la unión de dos gametos diferentes, el oogonio y el anteridio. Estas oosporas son esféricas y de pared gruesa. Estos hongos se reproducen asexualmente por medio de esporas flageladas, denominadas zoosporas. Estas zoosporas se encuentran contenidas en cuerpos fructíferos denominados zoosporangios. (FRENCH & HEBERT, 1980).

CAPÍTULO II

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Materiales Y Recursos

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:** Xavier Alejandro Caicedo Yáñez
- **Director de tesis:** Ing. Edwin Chancusig MSc.
- **Miembros del tribunal:**
 - Ing. Paolo Chasi
 - Ing. Luis Benavides
 - Ing. Fabián Troya MSc.

2.1.3. Material De Oficina

- Cámara fotográfica SONY XPERIA 1
- Computadora hp
- Flash memory hp
- Fundas de papel

- Fundas de plástico “ziploc”
- GPS GARMIN
- Impresora hp 3950
- Libro de campo
- Tijera stainless steel

2.1.4. Material Experimental.

- Muestra de cebolla larga (*Allium fistulosum*) infectada con el hongo fitopatológico Mildiu (*Peronospora destructor*).

2.1.5. Materiales De Laboratorio

2.1.5.1. Equipos

- Autoclave semiautomática 2540-23 litros
- Balanza digital CASIO 2165
- Cámara científica INFINITY 1-2CB
- Cámara de crecimiento o incubadora
- Cámara de flujo laminar aurora mini con base
- Desmineralizador de agua WATERWISE 9000
- Estufa eléctrica
- Incubadora IN110
- Microscopio Trinocular OLYMPUS CX31
- Refrigeradora R1-425 QUARZO INDURAMA

2.1.5.2. Materiales

- Asa de siembra
- Bisturí
- Botellón de agua y soporte.

- Cajas Petri
- Cajas separadoras
- Cinta adhesiva transparente de 1,5 cm de ancho
- Cintas para etiquetar
- Cintas para medir el pH
- Cofias
- Cubre objetos
- Cucharas de plástico pequeñas
- Cucharas de cocina
- Encendedor
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- Goteros de plástico
- Guantes descartables
- Mandil
- Mascarillas descartables
- Mechas para mechero
- Mechero de alcohol
- Olla
- Papel absorbente
- Papel aluminio
- Parafilm de laboratorio
- Pinzas
- Porta objetos
- Protectores para calzado
- Taburetes
- Tamiz
- Tijera
- Varilla de agitación.
- Vaso de precipitación de 40 -100 - 1000 ml

2.1.5.3. Reactivos

- Agar
- Agua destilada
- Alcohol antiséptico 72°G.L
- Alcohol industrial
- Glucosa “azúcar”
- Levadura

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 Mildiu (*Peronospora destructor*), en base a imágenes captadas con el microscopio trinocular OLYMPUS CX31 acoplado con una cámara INFINITY; de esta manera se corrobora 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 de Lasso, cantón Latacunga, 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 de Mildiu (*Peronospora destructor*).
- **Método deductivo:** Para el avance de la investigación se empleó este método porque permitió recopilar información de las características morfológicas que presenta el hongo, permitiendo de esta manera identificar a *Peronospora destructor* en el cultivo de cebolla larga (*Allium fistulosum*).
- **Método comparativo:** Este método se utilizó con la finalidad de comparar el hongo fitopatógeno Mildiu (*Peronospora destructor*), 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 recolectó las muestras en el sector Lasso el mismo que se encuentra ubicado en la parte Norte del cantón Latacunga, esta limita: al norte con la Parroquia Pastocalle, al sur con el Cantón Latacunga, al este con San Agustín de Callo, al oeste con la Parroquia Tanicuchi.

2.4.1. Ubicación Política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Latacunga
- **Sector:** Lasso

2.4.2. Ubicación Geográfica

- **Latitud:** 0° 45' 11,30" S
- **Longitud:** 78° 36' 39,53" W
- **Altura:** 2850 msnm.

CUADRO 4. Condiciones edafoclimáticas

CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICOS	
Temperatura anual media (°C)	12.0
Humedad Relativa (%)	75
Precipitación anual (mm)	947.2

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

2.5. Delimitación De La Ubicación Del Laboratorio

Se implementó el laboratorio en el Cantón Latacunga, Provincial de Cotopaxi.

2.5.1. Ubicación Política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Latacunga
- **Sector:** Latacunga

2.5.2. Ubicación Geográfica

- **Latitud:** 0°55'44.8" S
- **Longitud:** 78° 37'24.2" W
- **Altura:** 2850 msnm

2.6 Diagnóstico Del Cultivo

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

- **Identificar a planta hospedante:** Cebolla larga (*Allium fistulosum*)
- **Síntomas en campo:** información propia y del agricultor.
- **Condiciones de cultivo:** Información del tipo de suelo, prácticas y riego, fertilización y aplicación de plaguicidas.
- **Síntomas en detalle:** Se observa manchas pardas claras que cuando fructifican toma un color gris violáceo, pudiendo llegar a cubrir gran parte del área foliar afectada.
- **Observación:** la observación se realizó con un microscopio OLYMPUS CX31 en laboratorio, de la superficie de las lesiones o tejidos muertos;

esto permitirá observar la presencia de esporas, cuerpos fructíferos del hongo.

2.6.1 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.

2.6.2 Procedimientos en la toma de muestras

Se extrajo partes de plantas afectadas “hojas” con una tijera stainless steel, 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 ziploc con su respectiva codificación y se trasladó inmediatamente al laboratorio para proceder con el trabajo en el mismo.

2.7. En Laboratorio

Preparación de medio de cultivo PDA. (ANEXO 1)

2.7.1 Aislamiento

Para realizar esta actividad se procedió con diferentes tipos de aislamientos según se presente el caso tales como:

- **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.

2.7.2 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.

2.7.3 Incubación Morfológica

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.

2.7.4 Caracterización

2.7.4.1 Observación microscópica

- **Técnica de cinta pegante:** Se procedió a realizar un dobléz 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 adiciono una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se pegó la cinta sobre el

portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con aumentos 40x, 100x, 200x y 1000x.

- **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 40x, 100x, 200x y 1000x.

2.7.5 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.
- 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.
- Elaboración de un cuadro comparativo con los hongos re-aislados, para ver si coincidía el hongo que se inoculó.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Determinación Del Hongo Fitopatógeno De Mayor Impacto En El Cultivo De Cebolla Larga (*Allium fistulosum*)

Mediante una observación directa se determinó que el hongo fitopatógeno de gran impacto económico en el cultivo de cebolla larga (*Allium fistulosum*), en el sector Lasso del cantón Latacunga de la provincia de Cotopaxi, fue Mildiu (*Peronospora destructor*) ya que se evidenció que en un 40% el cultivo presentaba esta enfermedad, lo cual se corrobora bibliográficamente este ítem, como se observa en la FOTOGRAFÍA. 1 y 2.

FOTOGRAFÍA 1. Cultivo de cebolla larga (*Allium fistulosum*)



Fuente: Caicedo Xavier

FOTOGRAFÍA 2. Mildiu (*Peronospora destructor*)



Fuente: Caicedo Xavier

3.2. Signos Y Síntomas De Mildiu (*Peronospora Destructor*) En El Cultivo De Cebolla Larga. (*Allium fistulosum*)

Mediante una observación realizada en campo los síntomas que presenta el Mildiu son áreas cilíndricas que se desarrollan en las hojas, estas áreas son de color verde-amarillo. Los síntomas aparecen generalmente primero en las hojas viejas. Cuando el clima esta húmedo y la temperatura es baja, las hojas infectadas se cubren de masas de esporas de color gris a violeta. Las hojas se tuercen, se caen y mueren. El tejido muerto de las hojas es rápidamente colonizado por manchas púrpura, que son de color más oscuro y son cubiertas por mildiu lanoso de esta manera concuerda con (HIO, 2009), como se observa en la **FOTOGRAFÍA 3**.

FOTOGRAFÍA 3. Signos y síntomas de *Peronospora destructor*



Fuente: Caicedo Xavier.

3.3 Caracterización De Macro Y Microestructuras De Mildiu (*Peronospora destructor*)

CUADRO 5. Caracterización de Macro y Micro estructuras del Patógeno.

CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	ÍNDICE	TÉCNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de cebolla larga (<i>Allium fistulosum</i>)	Talo	Tipo	Observación	Microscopio
	Micelio	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

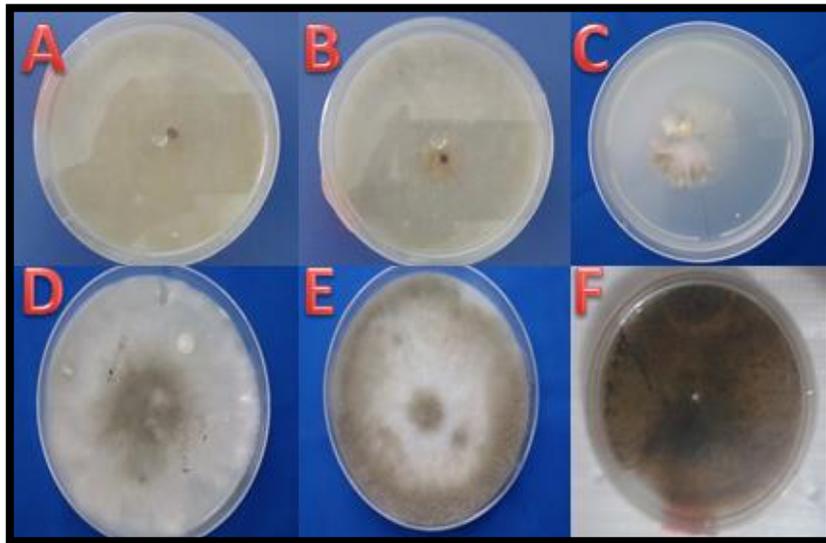
Fuente: Caicedo, Xavier.

3.3.1 Macro Estructura

Para observar detalladamente el hongo *Peronospora destructor* que se aisló en el laboratorio los primeros días de desarrollo en el medio de cultivo PDA se observó un crecimiento escaso de micelio el mismo que presentaba un color blanquecino el mismo que en el transcurso de los días fue creciendo paulatinamente hasta el

punto de ocupar todo el medio de cultivo, también se pudo observar que en el fondo de la base una coloración negra; al pasar los días y al llegar a la madures el hongo el micelio presento una coloración grisácea lo cual concuerda con (AGRIOS, 2005).

FOTOGRAFÍA 4. Macro estructuras de *Peronospora destructor*.



Fuente: Caicedo, Xavier.

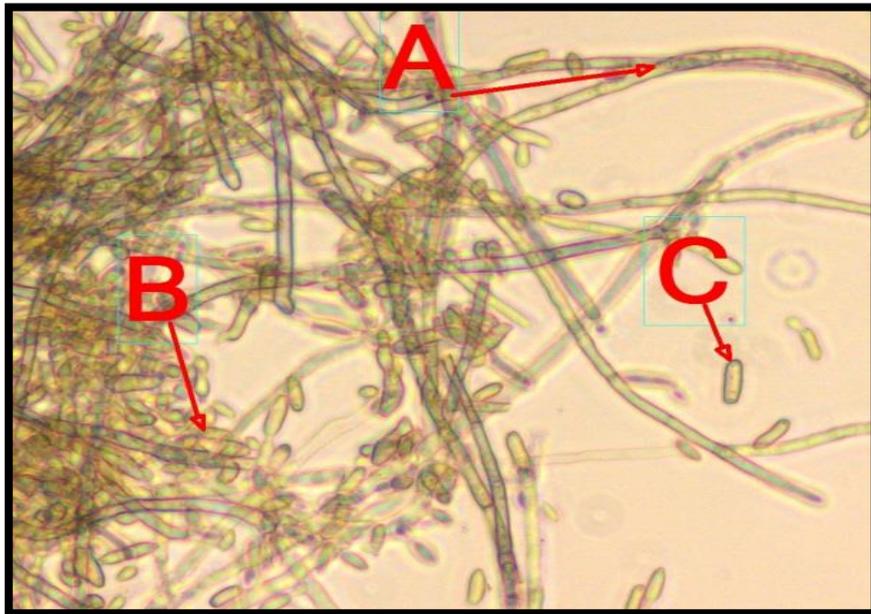
(A). Micelio a los 2 días de su desarrollo de color obscuro, (B). Micelio a los 4 días de su desarrollo de color obscuro, (C). Micelio a los 6 días de su desarrollo con pocas manchas de color gris en el centro de la caja, (D). Micelio a los 9 días de su desarrollo con una mancha uniforme de color gris en el centro de la caja, (E). Micelio a los 12 días de su desarrollo con un color gris cubriendo casi en su totalidad la caja, (F). Micelio a los 15 días de su desarrollo con un color grisáceo cubriendo en su totalidad la caja Petri.

3.3.2. *Micro Estructuras*

Se observó micro estructuras con un Microscopio trinocular OLYMPUS C X31 adaptada con cámara INFINITY 1-2CB, con aumento de 100-200x.

Se observó la muestra obtenida del micelio la presencia de hifas no septadas, hialinas las mismas que se multiplican vegetativamente, estas en ocasiones se ramifican en algunos casos las presentan septaciones (**FOTOGRAFÍA 5**). Los conidióforos que tienen una longitud de 100,42 μm , y un ancho de 13,56 μm (**FOTOGRAFÍA 6**). Los conidios que tienen una forma ovoide de color amarillo algo castaño en grupos (**FOTOGRAFÍA 7**). Los conidios presentan un tamaño de 9,62 μm en promedio (**FOTOGRAFÍA 8**). Lo cual concuerda con la bibliografía citada con (VIRÁNYI, 1992)

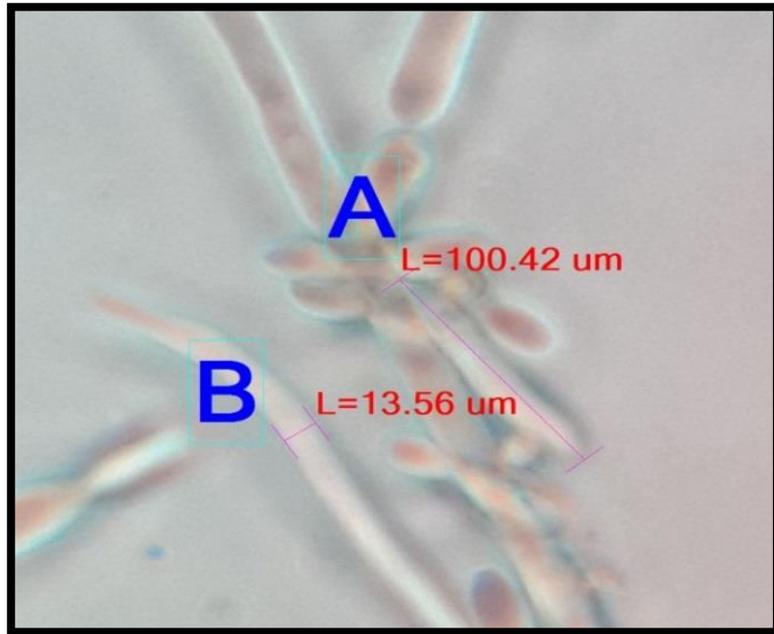
FOTOGRAFÍA 5. Micro estructura de *Peronospora destructor* con aumento 200x



Fuente: Caicedo, Xavier.

(A). Hifas, (B). Conidióforo y (C). Conidios

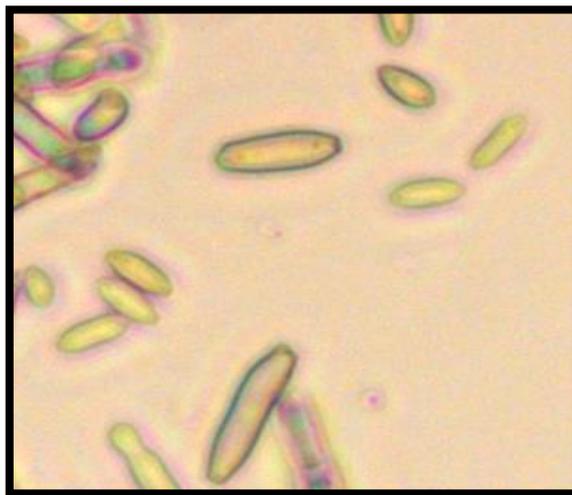
FOTOGRAFÍA 6. Ramificación de esporangióforos con aumento 200x



Fuente: Caicedo, Xavier.

(A). Ramificación de esporangióforos con una longitud de 100,42 μm , (B). Esporangióforo con un ancho de 13,56 μm . Lo cual concuerda con con la bibliografía citada con (VIRÁNYI, 1992)

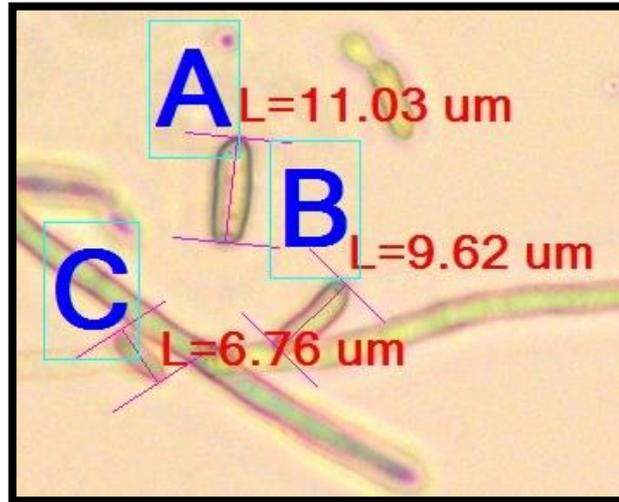
FOTOGRAFÍA 7. Conidios de *Peronospora destructor* con aumento 200x.



Fuente: Caicedo, Xavier.

Se observa en la imagen un conjunto de conidios de formas ovalados de color amarillo.

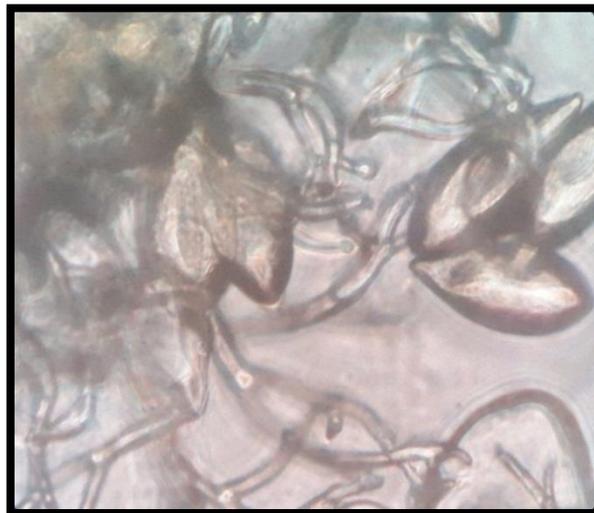
FOTOGRAFÍA 8. Longitud de conidios con aumento 200x



Fuente: Caicedo, Xavier.

(A). Conidio con dimensiones de 11,03 μm , (B). Conidio con dimensiones de 9,62 μm , (C). Conidio con dimensiones de 6,76 μm de longitud.

FOTOGRAFÍA 9. Esporangióforos ramificados de *Peronospora destructor* con aumento 1000x



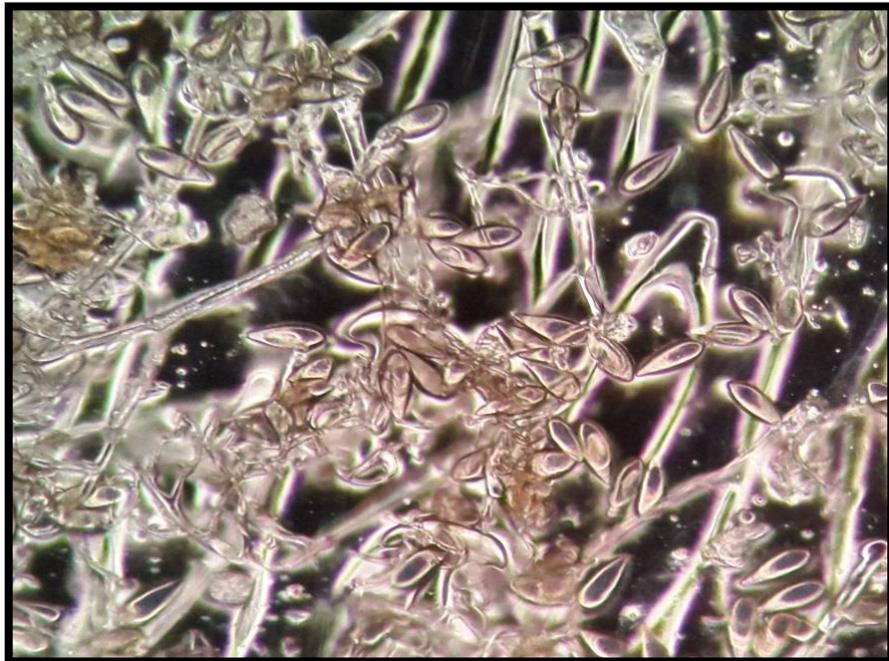
Fuente: Caicedo, Xavier.

FOTOGRAFÍA 10. Conidios de *Peronospora destructor* con aumento 40x



Fuente: Caicedo, Xavier.

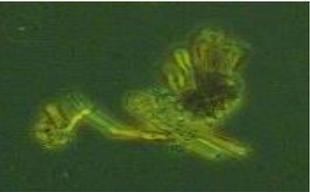
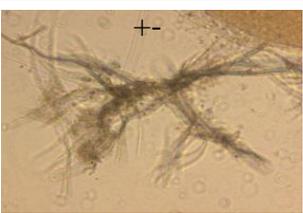
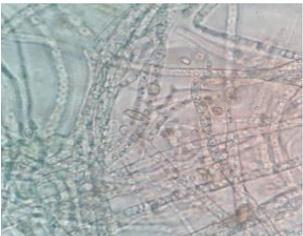
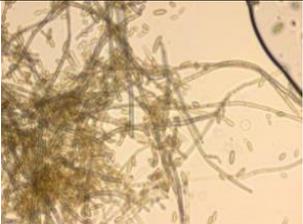
FOTOGRAFÍA 11. Conidios y Esporangióforos *Peronospora destructor* con aumento 100x



Fuente: Caicedo, Xavier.

3.4. Descripción Del Ciclo De Vida Del Hongo *Peronospora destructor* En Condiciones De Laboratorio.

CUADRO 6. Ciclo de vida de *Peronospora destructor*.

Actividad	Tiempo	T°	Imagen	Observación al microscopio	Aumento
Siembra del Hongo	10 min	19°C			40x
Infección	2 días	23,5°C			100x
Colonización completa del medio de cultivo	4-6 días	23,5°C			200x
Formación de conidióforos y conidios	8-10 días	23,5°C			100x
Formación de estructuras de resistencia (esclerocios)	12-15 días	23,5°C			1000x

Fuente: Caicedo, Xavier.

3.5. Elaboración De Una Guía Didáctica

Está presente en Anexo 1

CONCLUSIONES:

1. Se determinó que el hongo de mayor impacto económico en el cultivo de Cebolla larga (*Allium fistulosum*) en el sector Lasso, Cantón Latacunga de la Provincia de Cotopaxi, se trata de Mildiu (*Peronospora destructor*).
2. Se concluye que los signos y síntomas que corresponden a *Peronospora destructor* se manifiestan en las hojas infectadas la presencia de esporas de color gris a violeta, y a su vez el tejido muerto es rápidamente colonizado por manchas púrpura.
3. *Peronospora destructor* se caracterizó las macro estructuras, las mismas que presentaron un micelio de color blanquecino, la misma que al pasar los días fue cubriendo en su totalidad el medio de cultivo, en la última revisión presento un micelio de color grisáceo.
4. Las Micro estructuras y su ciclo de vida presentaron estructuras como: esporangióforos ramificados, no septados, con una longitud de 100,42 μm y 13,56 μm de ancho, y en cuanto esporas sus dimensiones fueron de 9,62 μm en promedio, con los aumentos 40x, 100x, 200x, 1000x.
5. Con el presente trabajo, se puede realizar una guía didáctica con el objetivo de proporcionar una ayuda a los agricultores y estudiantes que se interesen en dicho tema, que facilite el manejo tanto del cultivo de cebolla larga como del patógeno *Peronospora destructor*.

RECOMENDACIONES:

1. Se recomienda que las muestras tomadas de la planta en campo sean almacenadas en la funda ziploc, las mismas que tienen que ser transportadas rápidamente al laboratorio para su almacenamiento.
2. Si el espacio de trabajo es pequeño se recomienda no exceder su capacidad tanto en su uso como en el número de personas porque se dificultan las labores a ejecutar.
3. Se recomienda tomar en cuenta todos los protocolos para la buena utilización del laboratorio con la finalidad de realizar correctamente las prácticas y así evitar la contaminación de materiales y medios de cultivo.
4. Se recomienda realizar correctamente el medio de cultivo para el desarrollo del patógeno, para que su reproducción sea adecuada se debe utilizar una temperatura constante por 15 días de 23.5°C.
5. Para realizar las mediciones de las micro estructuras de los hongos se recomienda utilizar el programa INFINITY ANALIZE, programa que viene con la cámara científica INFINITY 1-2CB la cual esta acoplada al microscopio trinocular OLYMPUS CX31.

GLOSARIO

Agar: sustancia de consistencia gelatinosa que se obtiene de las algas marinas y que se utiliza para preparar medios de cultivo nutritivos en los que se estudia y cultiva a los microorganismos.

Aislamiento: separación de un patógeno a partir de un hospedante y su cultivo en un medio nutritivo.

Alogamia: es un tipo de reproducción sexual en plantas consistente en la polinización cruzada y fecundación entre individuos genéticamente diferentes

Cepa: progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro; aislado; grupo de aislados similares; una raza.

Coalescencia: es la propiedad de las cosas de fundirse o unirse. Las sustancias o los materiales coalescentes son aquellos que pueden unirse en un único cuerpo.

Conidio: espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo.

Conidióforo: Es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios

Cuerpo fructífero: estructura compleja de los hongos que contienen esporas.

Enfermedad: cualquier mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante, que resulta de la irritación continúa por un agente patogénico o factor ambiental y que lleva al desarrollo de síntomas.

Espora: unidad reproductiva de los hongos que consta de una o varias células, es análoga a la semilla de las plantas verdes.

Esterilización: eliminación de los patógenos y otros organismos vivos del suelo, recipientes, etc., mediante calor o sustancias químicas.

Fitopatógenos: termino que se aplica a los microorganismos que producen enfermedades en las plantas.

Hifa: ramificación simple de un micelio.

Hongo: pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes.

Hospedante: planta que es invadida por un paracito y de la cual este obtiene sus nutrientes.

Medio de cultivo: medio nutritivo preparado en el que se cultivan microorganismos o células vegetales.

Micelio: hifa o masa de hifas que constituyen el soma de un hongo.

Purificación: aislamiento y concentración de partículas virales en forma pura, libre de los componentes celulares.

Signo: patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

Sinema: Coremio, conidioma compuesto por conidióforos más o menos compactados erecto o a veces fusionados llevando los conidios en el ápice solamente o en ambos ápice y lateralmente.

Síntoma: reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de una enfermedad.

Uredóspora: Dícese de las esporas de las Uredinales (royas) que propagan la infección únicamente en las hojas atacadas

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS, G. (1999). *Fitopatología*. Mexico: LIMUSA.
- AGRIOS, G. (2005). *Plant Pathology*. Nueva York: Academic Press.
- AGRIOS, G. (2007). *Fitopatología*. Mexico: LIMUSA.
- ALTIERI. (2008). Agroecología: Principios y estrategias para enseñar sistemas agrarios sustentables. *En camino para una ecología sustentable*, 27-34.
- COLOMBO & OBREGON. (2001). Antioquia- Colombia, *Sanidad en los cultivos hortícolas* (136 ed.).
- FHIA. (2007). *Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias*. Obtenido de <http://fhia.org.hn/downloads/fhiainfdic2007.pdf>
- FRENCH, E., & HEBERT, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica: IICA.
- GAD COTOPAXI. (martes de enero de 2015). <https://www.cotopaxi.gob.ec>.
- HERRERA, L., & MAYEA, S. (1994). *Fitopatología General*. La Habana, Cuba: Felix Varela.
- HIO. (2009). *Estudio sobre la interacción del nematodo *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) y la bacteria *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) y su relación con la pudrición radical en cebolla de rama *Allium fistulosum* L. Aquitania*.
- INEC- MAG – SICA. (9 de Octubre de 2010). *INEC- MAG – SICA*. Recuperado el 15 de Mayo de 2015, de http://sigagro.flunal.com/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=237
- SICA, I. M. (2010). *INEC- MAG – SICA. Primera Edición*, 18.
- STREETS, R. (1972). *El diagnóstico de enfermedades de las plantas: un manual de campo y de laboratorio haciendo hincapié en los métodos más*

prácticos para la rápida identificación (2ª ed ed.). Tucson: University of Arizona Press.

TERRANOVA. (2001). *Enciclopedia agropecuaria Terranova: Producción agrícola 2* (2 ed.). (2. Terranova, Ed.) Costa Rica.

VIRÁNYI, F. (1992). *Peronospora destructor* (Berk.) Caspary. : *Manual de enfermedades de las plantas.*, 262.

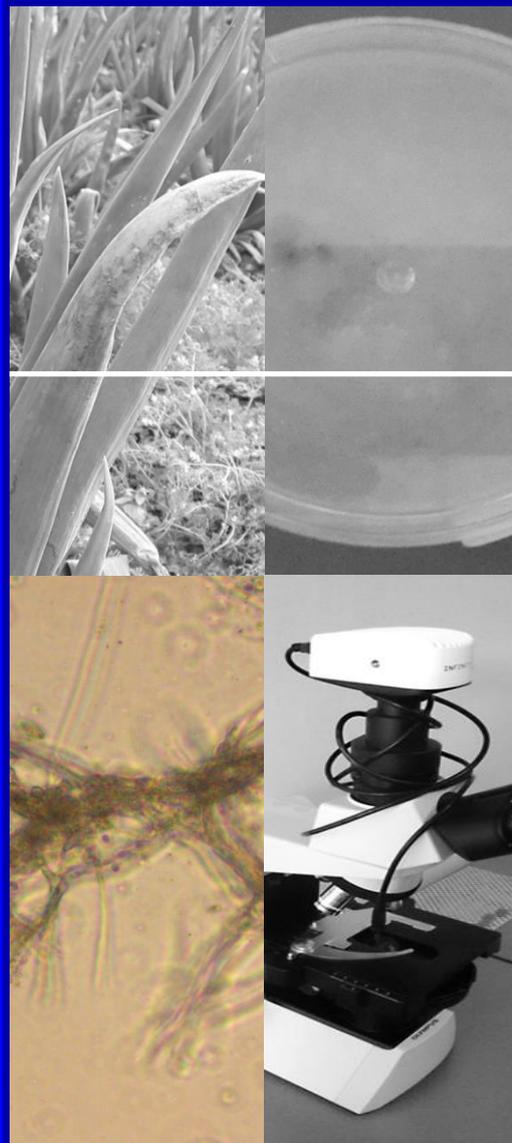
ANEXOS

ANEXO 1



Universidad
Técnica de
Cotopaxi

UNIDAD ACADÉMICA DE RECURSOS AGROPECUARIOS Y RECURSOS NATURALES



GUÍA DIDÁCTICA

CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA DEL
HONGO
FITOPATÓGENO
MILDIU

(Peronospora destructor)

AUTOR:

Xavier Alejandro

Caicedo Yáñez

DEDICATORIA

-

-

A la Universidad Técnica De Cotopaxi, en especial a la Carrera de Ingeniería Agronómica, quien me ha dado la oportunidad de acurrucarme en su manto de sabiduría y conocimiento.

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.

ÍNDICE

DEDICATORIA.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVO.....	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>Peronospora destructor</i>), EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	11
BIBLIOGRAFÍA.....	12

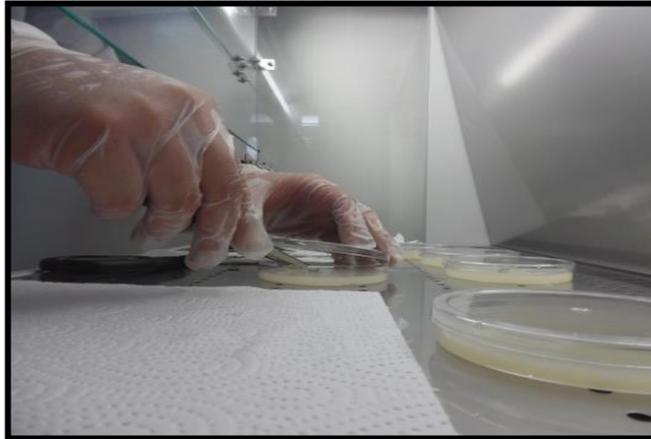
INTRODUCCIÓN

La presente investigación se pudo determinar, los signos y síntomas que se presentan en campo, descripción de macro y micro estructuras y el ciclo de vida del hongo fitopatógeno *Peronospora destructor* o *schleideni*, en condiciones de laboratorio.

Peronospora destructor o *schleideni* es el agente causal de la Mildiu en el cultivo de Cebolla larga (*Allium fistulosum*), que afecta principalmente a las hojas infectadas de esporas de color gris a violeta, el tejido muerto de las hojas es rápidamente colonizado por manchas púrpura, que son de color más oscuro.

OBJETIVO

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno Mildiu (*Peronospora destructor*) 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

MATERIALES Y REACTIVOS

Reactivos.

- | | |
|---|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> 3,5 g de levadura | * 1 varilla de agitación |
| <input type="checkbox"/> 30 g de Agar | * 1 vaso de precipitación de 1000ml |
| <input type="checkbox"/> 35 g de glucosa “azúcar” | |
| <input type="checkbox"/> 350 g de papa | * 2 matraces Erlenmeyer de 500ml |
| <input type="checkbox"/> 955 ml de agua desmineralizada | * 2 vasos de precipitación de 100ml |

Materiales

- | | |
|--|---------------------------|
| <input type="checkbox"/> 1 balanza digital | * 40 cajas petri |
| <input type="checkbox"/> 1 cocina eléctrica | * 7 papel filtro |
| <input type="checkbox"/> 1 cuchara de cocina | * Papel absorbente |
| <input type="checkbox"/> 1 cuchillo | * Papel aluminio |
| <input type="checkbox"/> 1 olla | * Auto clave |
| <input type="checkbox"/> 1 tamiz | * Cámara de flujo laminar |

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA

1. Lavar y cortar en pequeñas partes, y pesar 350 g 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 sobrante y añadir la cantidad de agua perdida 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 30g 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 vierte en dos matraces de 500ml equitativamente, después tapar los matraces Erlenmeyer 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

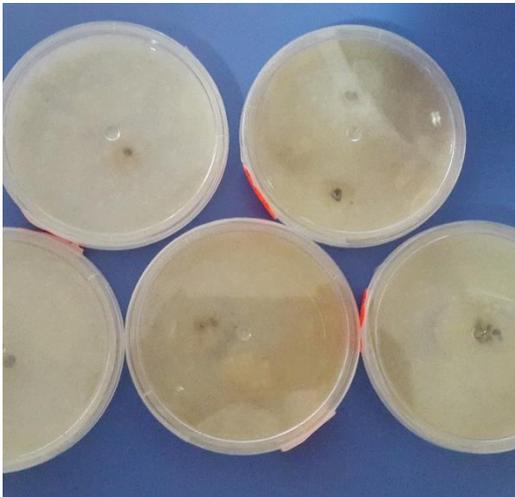
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

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 40x, 100x, 200x y 1000x



SIGNOS Y SÍNTOMAS:

-
Mediante la observación realizada en campo los síntomas que presenta el Mildiu son áreas cilíndricas que se desarrollan en las hojas, estas áreas son de color verde-amarillo. Cuando el clima es favorable, las hojas infectadas toman un color gris a

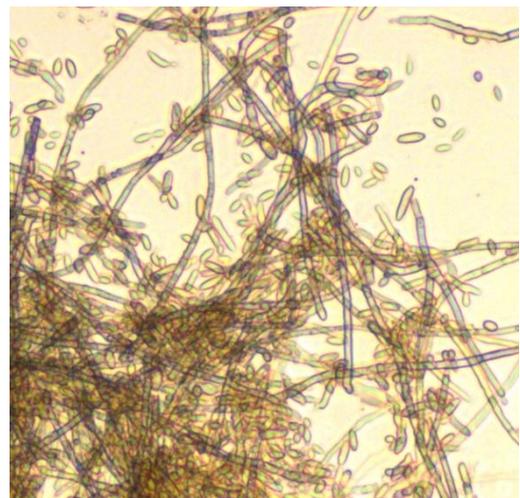


MACRO ESTRUCTURAS:

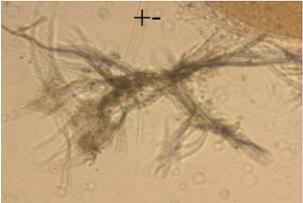
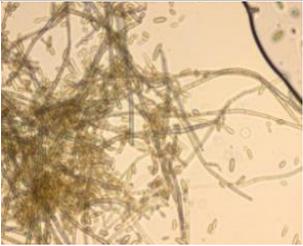
-
Para observar el hongo *Peronospora destructor* se aisló en el laboratorio en un medio de cultivo PDA, se observó un crecimiento escaso de micelio el mismo que presentaba un color blanquecino que en el transcurso de los

MICRO ESTRUCTURAS:

-
Se observó la muestra obtenida del micelio la presencia de hifas no septadas, hialinas las mismas que se multiplican vegetativamente, estas en ocasiones se ramifican en algunos casos las presentan septaciones. Los esporangióforos que tienen una longitud de 100,42 μm , y un ancho de 12,56 μm . Los esporidios que



CICLO DE VIDA DE (*Peronospora destructor*), EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Actividad	Tiempo	T °	Imagen	Observación al microscopio	Aumento
Siembra del Hongo	10 min	19°C			40x
Infección	2 días	23,5°C			100x
Colonización completa del medio de cultivo	4-6 días	23,5°C			200x
Formación de conidióforos y conidios	8-10 días	23,5°C			100x
Formación de estructuras de resistencia (esclerocios)	12-15 días	23,5°C			1000x

BIBLIOGRAFÍA:

- FRENCH, E., & HEBERT, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica: IICA.
- HIO. (2009). *Estudio sobre la interacción del nematodo *Ditylenchus dipsaci* (Kuhn) y la bacteria *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) y su relación con la pudrición radical en cebolla de rama *Allium fistulosum* L. Aquitania* .
- VIRÁNYI, F. (1992). *Peronospora destructor* (Berk.) Caspary. : *Manual de enfermedades de las plantas.*, 262.

ANEXO 1

IMÁGENES DE LA PRÁCTICA EN CAMPO

Fotografía. 1 Identificación de *Peronospora destructor*. En campo.



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía. 2 Toma de muestras



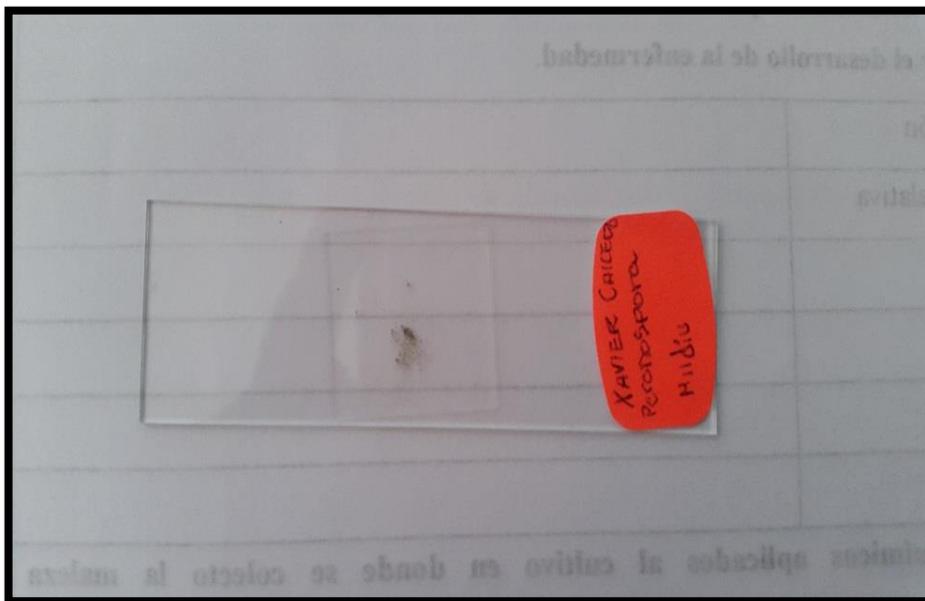
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 3. Selección de muestras y almacenamiento.



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 4. Etiquetado de la muestra.



Fuente: Caicedo, Xavier.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA

Fotografía 5. Extracción del almidón mediante la cocción.



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 6. Tamizado de la cocción para extraer el almidón



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 7. Pesado del Agar, sacarosa y levadura



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 8. Incorporación de todos los ingredientes a baño maría



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 9. Vaciado del medio PDA en los matraces, para llevarlos a la autoclave.



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 10. Tapado de los matraces con algodón y papel aluminio.



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 11.Autoclave por 15 minutos



Fuente: Caicedo, Xavier.

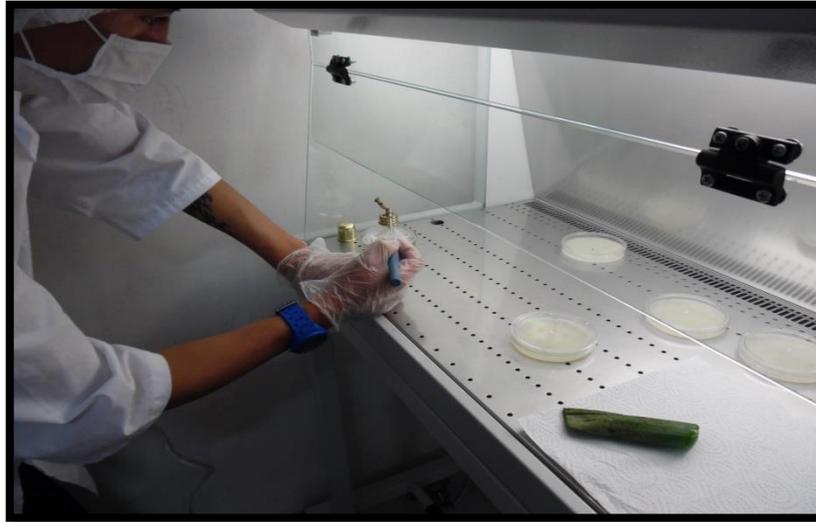
Fotografía 12. Vaciado en cajas petri



Fuente: Caicedo, Xavier.

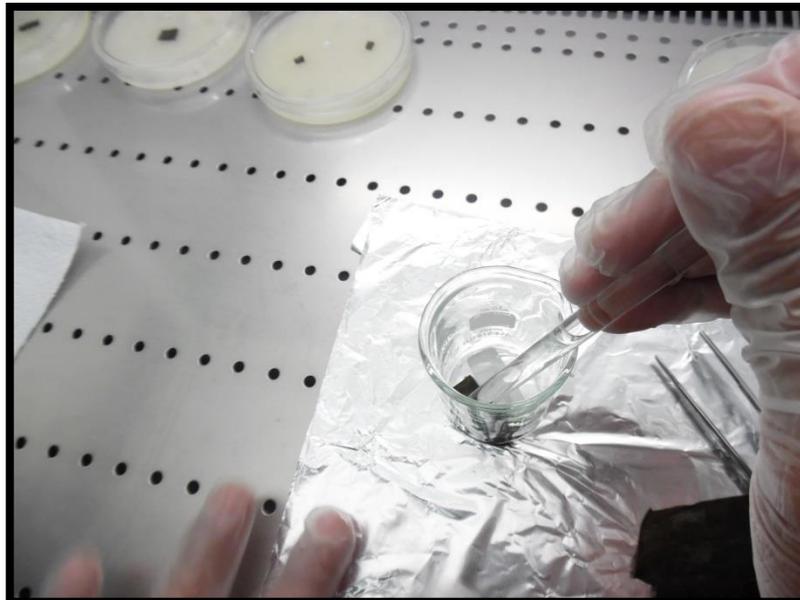
INOCULACIÓN DE *Peronospora destructor* EN MEDIO PDA

Fotografía 13. Preparación del material de trabajo



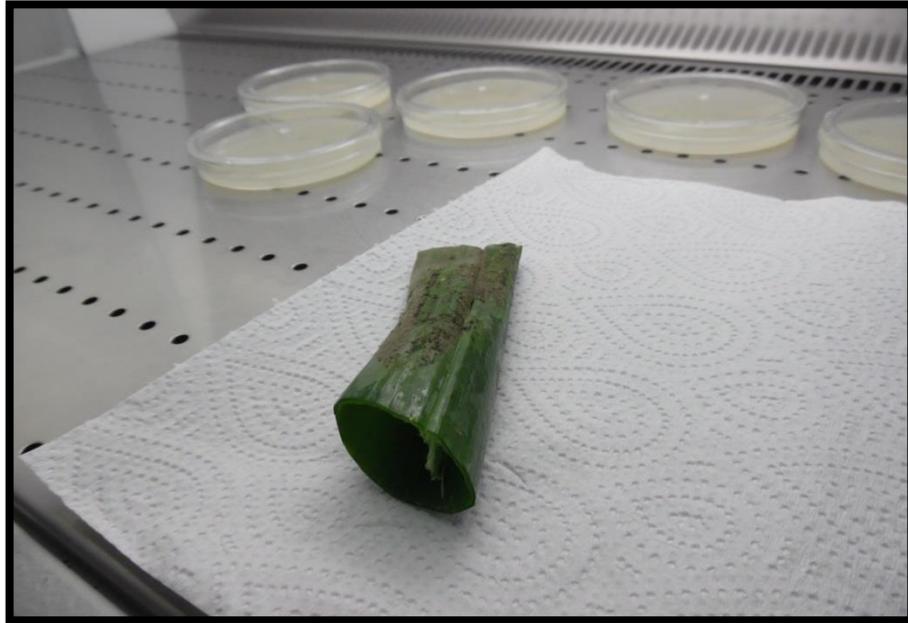
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 14. Desinfección de las muestras en solución 2 a 1 de agua más alcohol respectivamente



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 15.Secado de las muestras



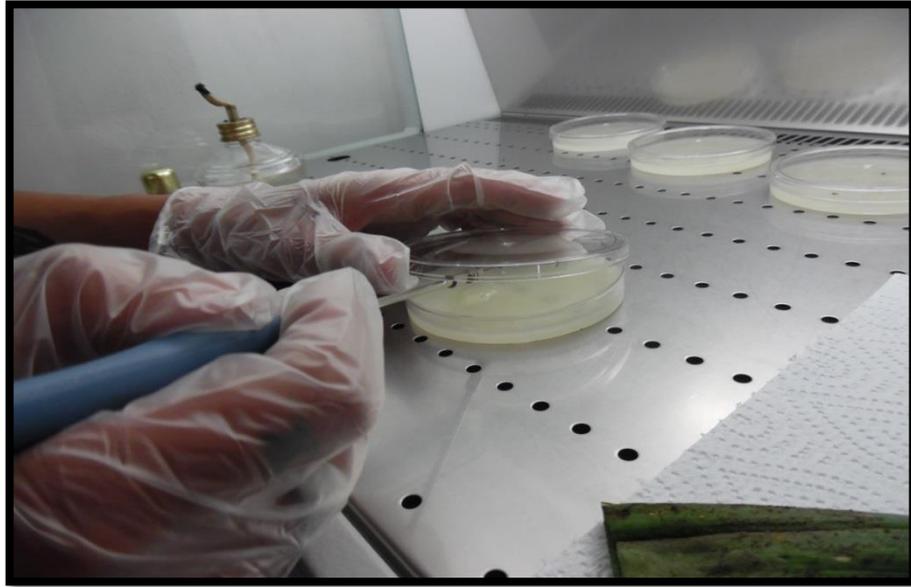
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 16. Inoculación con asa de siembra tomando una muestra que presentaba esporulación



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 17. Inoculación tomando una porción de tejido infectado



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 18. Sellado de muestras y etiquetado



Fuente: Caicedo, Xavier.

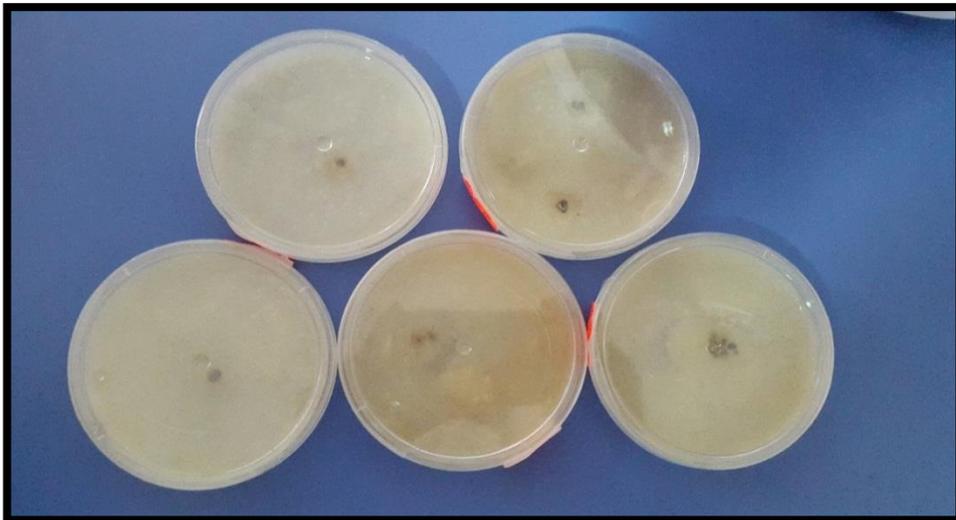
**REGISTRO DEL DESARROLLO DE MUESTRAS. MACRO
ESTRUCTURAS.**

Fotografía 19. Muestras de *peronospora destructor* a los 2 días



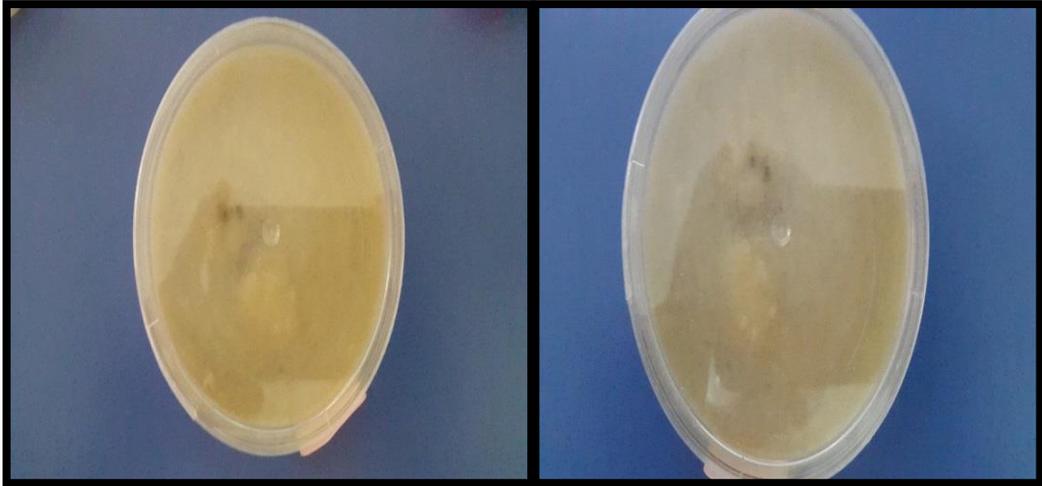
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 20. Muestras de *peronospora destructor* o *schleideni* a los 4 a 6 días



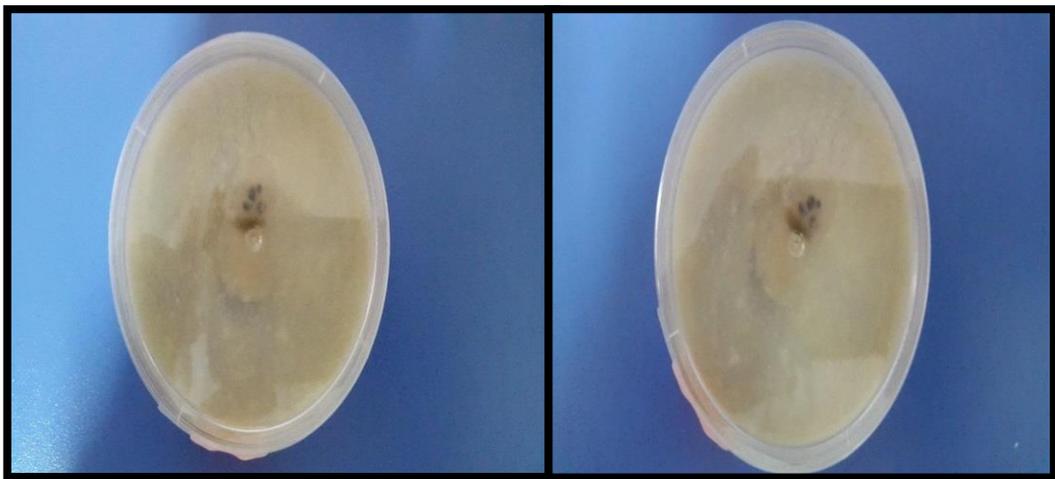
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 21. *Peronospora destructor* o *schleideni* a los 8 a 10 días



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 22. *Peronospora destructor* o *schleideni* a los 12 a 15 días.



Fuente: Caicedo, Xavier.

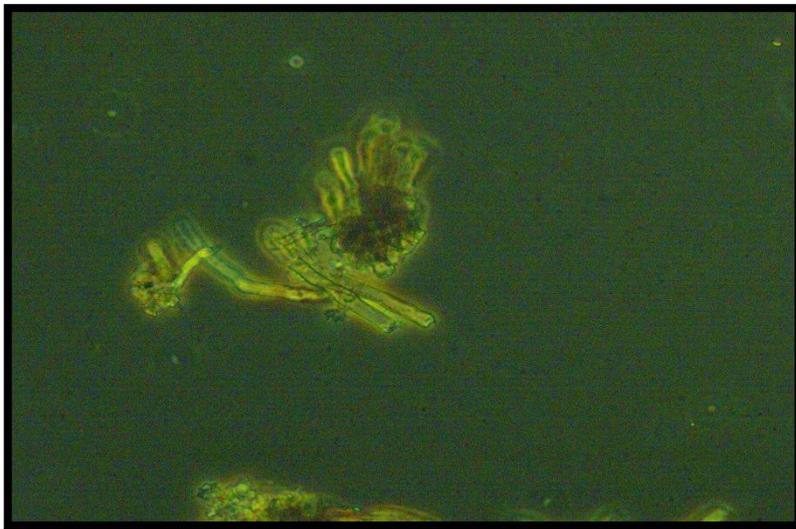
MICRO ESTRUCTURAS

Fotografía 23. Observación en el microscopio de las micro estructuras de *Peronospora destructor*. Y registro de las mismas.



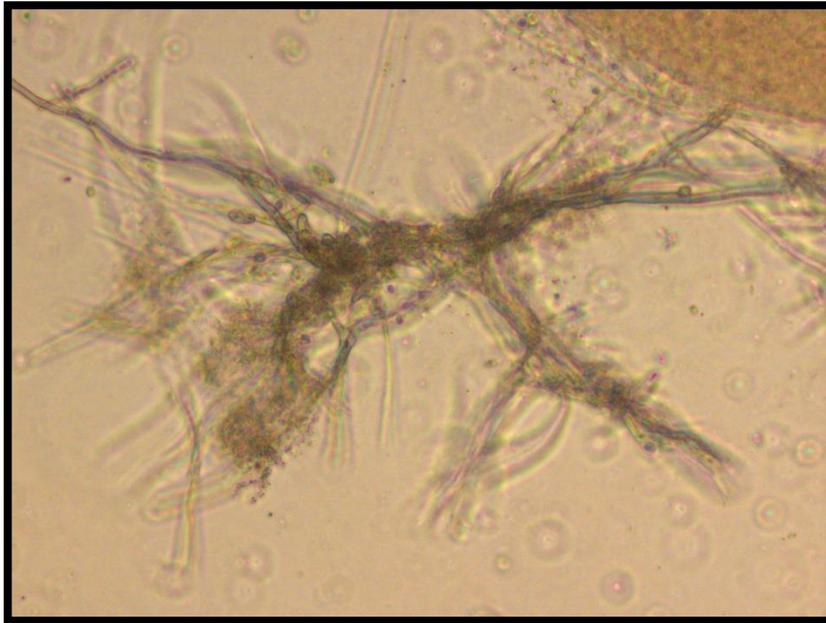
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 24 B *Peronospora destructor* muestra tomada directamente de la planta enferma con lente 100x.



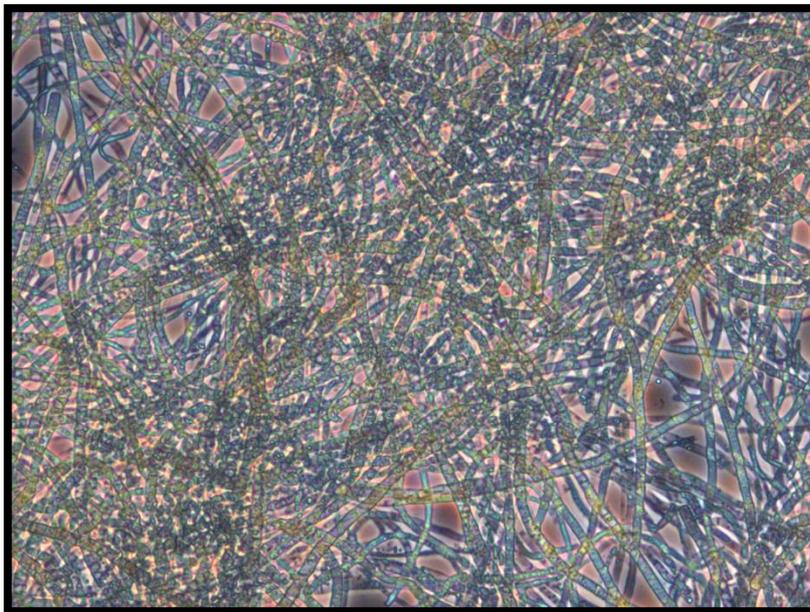
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 25. Desarrollo del micelio cuarto día en aumento de 100x.



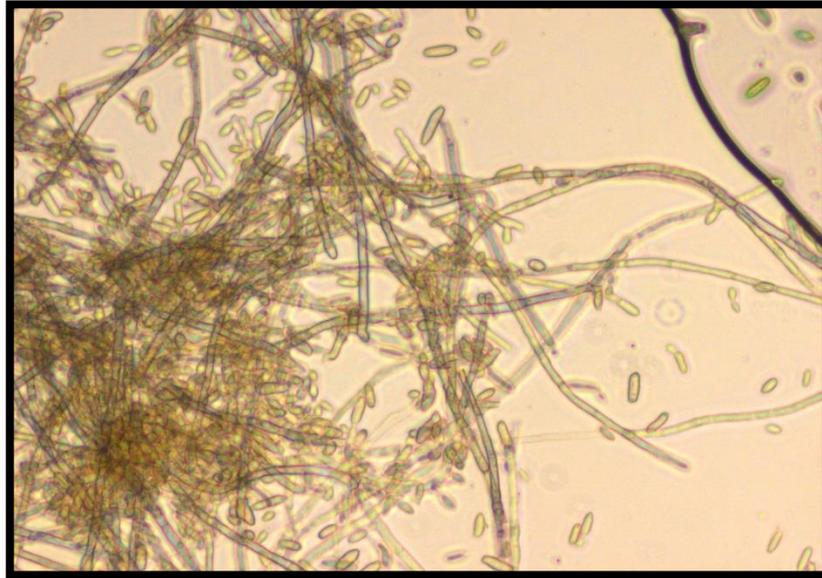
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 26. Desarrollo del micelio a los 8 días en aumento 200x.



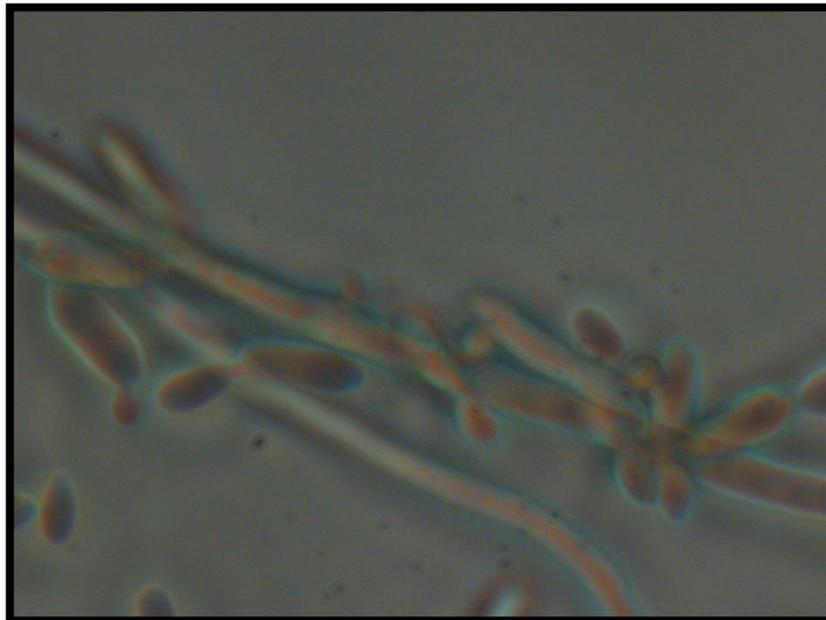
Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 27. Esporulación a partir del noveno día en aumento 100x.



Fuente: Caicedo, Xavier.

Fotografía 28. Esporulación a partir del décimo día en aumento 1000x.



Fuente: Caicedo, Xavier.

ANEXOS 3

COSTOS

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

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