

“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 HABA (*Vicia faba L.*)
SECTOR LA URBINA, CANTÓN PILLARO, TUNGURAHUA 2015.**

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

AUTOR:

Alex Mauricio Soria Guerra

DIRECTOR

Ing. Emerson Jácome

ASESOR TÉCNICO

Ing. Santiago Jiménez

Latacunga-Ecuador

2015

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

Yo, SORIA GUERRA ALEX MAURICIO, con cédula de ciudadanía N° 171619948-2, libre y voluntariamente declaro que la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE HABA (*Vicia faba L.*) SECTOR LA URBINA, CANTÓN PILLARO, TUNGURHUA 2015.”**, es original, autentica y personal. En virtud, declaro que el contenido será de mi sola responsabilidad legal y académica.

Alex Mauricio Soria Guerra

C.I. 171619948-2

AVAL DEL 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 HABA (*Vicia faba L.*) SECTOR LA URBINA, CANTÓN PILLARO, TUNGURHUA 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, lo cual se encuentra abierta para posteriores investigaciones.

.....
Ing. Emerson Jácome

DIRECTOR

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 HABA (*Vicia faba L.*) SECTOR LA URBINA, CANTÓN PILLARO, TUNGURHUA 2015.”, de autoría del egresado Alex Mauricio Soria Guerra, CERTIFICAMOS que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones al presente documento.

Ing. Emerson Jácome
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Edwin Chancusig
PRESIDENTE

Ing. Fabián Troya
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Ing. Karina Marín
OPOCITORA

DEDICATORIA

A mis padres:

Juan Francisco Soria Guerra y María Soledad Guerra Carrillo. Por su amor infinito, su valioso y constante apoyo y por la confianza depositada en mí.

A mi hijo:

Hugo Alexander Soria Sani. Quien cambio mi vida dándole un giro muy importante.

ALEX.

AGRADECIMIENTO

En todo este tiempo que me ha tomado realizar la tesis de grado y a pesar de las cosas negativas que ha podido haber, me sobran motivos para estar agradecido por tantas cosas buenas que he recibido. Por ello quiero compartir mi profundo agradecimiento.

A mis padres por haberme dado la oportunidad de existir, por siempre estar a mi lado dándome la mano para levantarme a pesar de mis tantas caídas y no permitir que desmaye en el duro camino hacia el futuro. Gracias por ello y mucho más, los quiero mucho.

A mis hermanos quienes depositaron su confianza y apoyo en mí sin importar que los haya decepcionado en algunas ocasiones, les agradezco porque creyeron en mí incluso cuando yo dejaba de hacerlo.

Agradezco también el apoyo y paciencia de mis profesores quienes dieron lo mejor de sí para que yo pueda dar un paso más hacia el éxito
Y no puedo olvidar a todos quienes aportaron en el desarrollo de esta tesis especialmente a mis compañeros y amigos, quienes siempre estuvieron empujándome para seguir adelante.

Y un agradecimiento especial a Dios, por poner en mi camino a tantas personas maravillosas, especialmente a ti hijo mío.

ALEX.

ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA.....	i
AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xi
INTRODUCCIÓN.....	1
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	5
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
PREGUNTA DIRECTRIZ.....	6
CAPITULO I.....	7
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	7
1.1. Mancha Chocolate (<i>Botrytis fabae</i> L.).....	7
1.1.1. Taxonomía.....	8
1.1.2. Etiología.....	8
1.1.3. Descripción y morfología.....	8
1.1.4. Sintomatología.....	11
1.1.5. Ciclo del hongo.....	12
1.1.6. Control.....	12
1.2. Hongos fitopatógenos.....	13
1.2.1. Características generales.....	13
1.2.2. Estructuras somáticas.....	14
1.2.3. Hongos como patógenos en las plantas.....	14
1.2.4. Signos Y Síntomas De Hongos Patógenos En La Planta.....	15
1.3. Medio de cultivo usado en el aislamiento de hongos.....	15

1.4. Estructuras reproductivas	16
1.4.1. <i>Hongos superiores</i>	16
CAPITULO II	18
2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	18
2.1. Materiales	18
2.1.1. <i>Institucionales</i>	18
2.1.2. <i>Recursos humanos</i>	18
2.1.3. <i>Material de oficina</i>	19
2.1.4. <i>Material experimental</i>	19
2.1.5. <i>Materiales de laboratorio</i>	19
2.2. Diseño Metodológico	21
2.2.1. <i>Investigación Descriptiva</i>	22
2.3. Métodos y Técnicas	22
2.3.1. <i>Método</i>	22
2.3.2. <i>Métodos lógicos</i>	23
2.3.3. <i>Técnica</i>	23
2.4. Delimitación del lugar de recolección	24
2.4.1. <i>Ubicación Política</i>	24
2.4.2. <i>Ubicación Geográfica</i>	24
2.5. Delimitación de la ubicación del laboratorio	24
2.5.1. <i>Ubicación Política</i>	25
2.5.2. <i>Ubicación Geográfica</i>	25
2.6. Diagnóstico del cultivo	25
2.6.1. <i>Toma de muestras</i>	26
2.6.2. <i>Procedimientos en la toma de muestras</i>	26
2.7. En Laboratorio.....	26
2.7.1. <i>Preparación de medio de cultivo PDA</i>	26
2.7.2. <i>Aislamiento</i>	27
2.7.3. <i>Purificación</i>	27
2.7.4. <i>Incubación</i>	28
2.7.5. <i>Caracterización morfológica</i>	28

2.7.6. Descripción	28
CAPITULO III	30
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
3.1. Determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en el cultivo del Haba (<i>Vicia faba</i> L.)	30
3.2. Signos y síntomas de la Mancha chocolate (<i>Botrytis fabae</i> L.) en el cultivo del Haba (<i>Vicia faba</i> L.)	31
3.3. Caracterización de macro y micro estructuras de la Mancha Chocolate (<i>Botrytis fabae</i> L.)	32
3.3.1. Macro estructuras de <i>Botrytis fabae</i> L.	32
3.3.2. Micro estructuras de <i>Botrytis fabae</i> L.	34
3.4. Descripción del ciclo de vida del hongo <i>Botrytis fabae</i> L. en condiciones de laboratorio	38
3.5. Elaboración de una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo de Mancha chocolate (<i>Botrytis fabae</i> L.)	39
CONCLUSIONES:	40
RECOMENDACIONES:	41
GLOSARIO:	42
BIBLIOGRAFÍA	44
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del genero <i>Botrytis</i>	8
Tabla 2. Ciclo de vida de <i>Botrytis fabae</i> L.....	38

INDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA 1. Observación en campo: (<i>Botrytis fabae</i> L.).....	30
FOTOGRAFÍA 2. Mancha chocolate (<i>Botrytis fabae</i> L.).....	31
FOTOGRAFÍA 3. Macro estructuras de Mancha chocolate (<i>Botrytis fabae</i> L.) ..	32
FOTOGRAFÍA 4. Macro estructuras de Mancha chocolate (<i>Botrytis fabae</i> L.) . .	33
FOTOGRAFÍA 5. Micro estructura de <i>B. fabae</i> observada con el lente de 20x. .	34
FOTOGRAFÍA 6. Hifa observada al microscopio con el lente de 20x	35
FOTOGRAFÍA 7. Longitud del conidióforo observado con el lente de 20x.....	35
FOTOGRAFÍA 8. Longitud de la hifa observada con el lente de 20x	36
FOTOGRAFÍA 9. Conidios de <i>B. fabae</i> observados con el lente de 20x.....	36
FOTOGRAFÍA 10. Medidas del conidio observado con el lente de 20x	37

RESUMEN

El presente trabajo se desarrolló en la Provincia de Cotopaxi, cantón Latacunga, sector Latacunga, ubicado a 2850 msnm, latitud 0°55'44.8" S y longitud 78°37'24.2" W con el objetivo de caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno en el cultivo del Haba (*Vicia faba* L.) en el Sector La Urbina, cantón Pillaro, Tungurahua. Identificando el fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo, sus signos y síntomas, caracterizando sus macro, micro estructuras y describiendo su ciclo de vida en condiciones de laboratorio. Mediante la inoculación del hongo utilizando como medio de cultivo PDA (agar papa dextrosa) para luego ser observado directamente y al microscopio durante todo su ciclo y registrando todo el trabajo en fotografía, obteniendo como resultados que en el cultivo del haba se reporta a *Botrytis fabae* L. como el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo, causante de manchas de color marrón en hojas en una etapa no agresiva y manchas necróticas en tallos, vainas y frutos en la etapa agresiva, que presenta como macro estructuras un micelio o hifas de color blanco y grises cuando estas están listas para su propagación (al no presentar las condiciones para su propagación forma esclerocios que miden de 1-6 mm de sección transversal por 1-4 mm de sección longitudinal), y como micro estructuras se observan los conidióforos los cuales miden 232.1 μm de longitud, son coloreados finamente granuloso con septaciones en el ápice donde se insertan los conidios (estructuras unicelulares hialinas de forma ovoide algo irregular de 22,19 x 15,38 μm de longitud). Su ciclo de vida en condiciones de laboratorio hasta la formación de esclerocios es de 15 días. De esta manera se concluye que *B. fabae* L. es el fitopatógeno de mayor impacto en el cultivo del haba por sus signos y síntomas y por su corto ciclo de vida. Estos resultados sugieren tomar en cuenta los protocolos de uso del laboratorio para la obtención de muestras de calidad para su estudio.

SUMMARY

The present work was developed in the Cotopaxi province, Latacunga canton, located at 2850 mns, latitude 0° 55' 44.8" S and longitude 78° 37' 24.2" W with the objective of characterizing morphologically, the phytopathogenic fungus in the (*Vicia faba* L.) bean crop at the La Urbina sector, Pillaro canton, Tungurahua province. Identifying the phytopathogenic greatest impact in crop production. Its signs and symptoms are characterizing its macro and micro structures and describing its life cycle in laboratory conditions. Through, the inoculation of the fungus used as a PDA (potato dextrose agar) crop medium and then, it is directly looked and microscopically, throughout its lifecycle and are recording all the work in photography, getting results as the crop bean is reported to *Botrytis fabae* L. such as the phytopathogenic fungus greatest impact on crop production. It is causative of brown spots on leaves a non-aggressive stage and necrotic spots into stems, pods and fruits in the aggressive stage, which present as macro structures a mycelium or hyphae of white and gray color, when they are ready for their propagation (it is not present conditions for propagation form sclerotia, which is measuring 1-6 mm by 1-4 mm longitudinal section), and as micro structures are looked the conidiophores which measured 232.1mm, in length, they are colored finely grained septations at the apex where the conidia are inserted (hyaline unicellular structures with an ovoid shape, something irregular of 22.19 x 15.38 mm in length). Its life cycle in laboratory conditions until the sclerotia formation is 15 days. Thus, it is concluded that *B. Fabae* L. is the phytopathogenic greatest impact on the bean crop its signs, symptoms and short life cycle. These results suggest taking into account the use of laboratory protocols for getting quality samples for study.

INTRODUCCIÓN

Las leguminosas son de gran importancia para el ser humano. Han estado presentes en la mayoría de las civilizaciones desde que comenzó el desarrollo de la agricultura. Se emplean para alimentación humana y animal, en este último caso tanto para pienso como para pasto, destacando el alto contenido proteico de sus semillas: aportan un tercio de las necesidades de proteínas del ser humano, pudiendo llegar hasta el 50% en condiciones de subsistencia (GRAHAM y VANCE, 2003).

Se las considera también la fuente de proteína más barata y accesible para los pobres (THARANATHAN y MAHADEVAMMA, 2003).

Son igualmente de gran relevancia por su capacidad de fijar nitrógeno, lo que resulta capital para el mantenimiento de los suelos agrícolas. A pesar de esto, las leguminosas son un cultivo secundario frente a los grandes cereales (arroz, trigo y maíz), en parte debido a su mayor sensibilidad a los estreses bióticos y abióticos y a sus menores rendimientos (SIDDIQUE et al., 2012).

Las habas (*Vicia faba* L.) son unas de las leguminosas más cultivadas, de gran valor nutritivo y ampliamente utilizada tanto para consumo humano como pienso para animales (CREPON et al., 2010). Según las cifras de la FAO, en 2010 ocuparon una superficie de cultivo de 2.559.773 hectáreas y alcanzaron el sexto lugar en producción entre las leguminosas, con 4.312.871 toneladas (FAOSTAT, 2010). Los principales productores son China, Europa (principalmente Reino Unido, Francia, España, Portugal y Grecia), Etiopía, Egipto y Australia (DUC et al., 2010).

El haba (*Vicia faba* L.) es un cultivo tradicional de la Sierra ecuatoriana. Generalmente se cultiva sola o en asociación con otras especies como maíz, papa, quinua, melloco, etc. El haba constituye un componente importante en la dieta de varios sectores de la población rural y urbana, y se consume tanto en estado tierno como en seco.(PERALTA & OTROS, 1993).

En el Ecuador se cultiva, en determinados microclimas de 16 provincias, diferentes variedades de haba donde aproximadamente 180 mil familias se encargan de cultivar actualmente alrededor 9.653 hectáreas con un rendimiento promedio de 1.78 toneladas por hectárea.(PERALTA & OTROS, 1993).

Las enfermedades de los cultivos es un problema que provocó calamidades en el mundo desde la edad antigua; un ejemplo fue la destrucción de cultivos de papa ocasionada por el tizón tardío en Irlanda en los años 1845 y 1846, que causó la muerte de cientos de miles de personas y la emigración de más de un millón y medio de irlandeses a los Estados Unidos, esta experiencia reafirmó la importancia de las enfermedades de las plantas y estimuló de manera significativa la investigación de sus causas. (AGRIOS, 2004)

Según MAMANI, (2007), en el cultivo del haba se presentan generalmente enfermedades de origen fungoso, y que pueden afectar hasta en un 80% la producción de grano de haba; por lo que es muy importante saber el comportamiento de estas. Según COCA, (2004), las enfermedades más conocidas del haba a nivel mundial son las que afectan al área foliar, tal es el caso de la mancha chocolate (*Botrytis fabae*), la mancha concéntrica (*Alternaria alternata*).

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades 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 botrytis es una enfermedad fúngica que afecta a los cultivos de habas en muchas partes del mundo, especialmente en las regiones húmedas. Sus síntomas característicos son pequeñas lesiones circulares de crecimiento limitado y color marrón oscuro que le han dado el nombre característico con el que es conocida en inglés: *chocolate spot* (mancha de chocolate). Estos síntomas se encuentran con frecuencia en las hojas y los tallos de *Vicia faba*, sin que supongan una seria amenaza para la misma. Sin embargo, cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables para el desarrollo de la enfermedad (temperaturas moderadas y alta humedad relativa) pueden aparecer las llamadas “lesiones agresivas”. Éstas consisten en necrosis rápidas y extendidas que no provienen del crecimiento y unión de las lesiones circulares sino que se deben a un colapso generalizado del tejido vegetal en una zona concreta en ocasiones, las lesiones pueden incluso llegar a afectar a las vainas. Cuando varios ciclos de infección tienen lugar en un corto espacio de tiempo, las necrosis se expanden con rapidez y pueden llevar a la defoliación y la muerte de toda la planta. Estos efectos devastadores hacen de esta enfermedad una de las causas más importantes de disminución de rendimientos en las habas. Se han registrado pérdidas de hasta el 90% en Australia, del 61% en Etiopía, del 59% en el Reino Unido y de más del 50% en China (DAVIDSON et al., 2007).

Botrytis fabae, en cambio, es un patógeno especializado, que infecta principalmente a *Vicia faba* y otras especies del género *Vicia*, aunque también puede darse en algunas otras especies de leguminosas pertenecientes a los géneros *Lens*, *Pisum* y *Phaseolus* (STAATS et al., 2005).

JUSTIFICACIÓN

La limitada información sobre la prevención y control de los hongos fitopatógenos y los altos porcentajes de pérdidas en las cosechas provocadas por el ataque de enfermedades, causan problemas a los agricultores no solo en el sector de la Urbina del Cantón Pillaro sino también a nivel nacional, razón por la cual el estudio de los agentes causales de las enfermedades con el fin de dar alternativa al manejo de enfermedades causadas por hongos en este cultivo.

La presente investigación es muy importante ya que el cultivo del haba en el Ecuador especialmente en la Región Andina constituye una de las bases alimenticias tanto del hombre como de animales. Por tanto el interés en la mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.), ya que esta enfermedad es la causante de hasta un 80% de pérdidas en el cultivo.

La presencia de la mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.), impide una mayor productividad motivo por el cual se propone la presente investigación: “Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo del Haba (*Vicia faba* L.), en el Sector “La Urbina”, la cual pretende brindar una base de información que servirá al agricultor para tomar decisiones oportunas y reducir las medidas de combate creando estrategias para el manejo integrado del patógeno, mitigando el impacto negativo.

Los resultados de la investigación se estima pueden servir como una guía para el productor que ayude en la reducción del uso de agroquímicos o el uso correcto de estos permitiéndole reducir los costos e incrementar la producción del sector La Urbina.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar Morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción en el cultivo de haba (*Vicia faba L.*), sector La Urbina, cantón Pillaro - Tungurahua. 2015

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo de haba (*Vicia faba L.*).
- Identificar signos y síntomas del hongo fitopatógeno del haba (*Vicia faba L.*) en campo.
- Caracterizar macro y micro estructuras 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 el ciclo de vida del hongo fitopatógeno de la Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.) en condiciones de laboratorio?

CAPITULO I

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. Mancha Chocolate (*Botrytis fabae* L.)

La enfermedad es causada por el hongo *Botrytis fabae*, es considerada como una de las principales enfermedades del cultivo de haba; en épocas con bastantes lluvias las enfermedad puede afectar a toda la parcela, afecta en cualquier estado de desarrollo de la planta (desde la emergencia hasta la maduración). La presencia de esta enfermedad se ve favorecida por una alta humedad ambiental, suelos pobres o deficientes en fosfato, calcio y potasio. (COCA, 2004).

Es la principal enfermedad que afecta a las hojas, tallos, flores, vainas verdes y grano. La humedad es importante para el desarrollo de esta enfermedad. La fase no agresiva, se presenta desde la emergencia hasta la madurez del cultivo. Durante el desarrollo del cultivo, la humedad dentro de la canopia (follaje) crea un microclima ideal para el desarrollo de la enfermedad, por lo que es importante la densidad del cultivo (entre surco y sobre surco). Abundante crecimiento vegetativo, alta humedad y lluvias y suelos pesados, hacen más vulnerables para el desarrollo de la enfermedad (COCA, 2004).

Esta enfermedad es provocada por *B. fabae* y *B. cinerea* y puede aparecer en todos los lugares en donde se cultiven habas, siendo una de las patologías más destructivas (HEBBLETHWAITE, 1983; PARRY, 1990; SAHILE et al., 2008 y STODDARD et al., 2010).

Las condiciones óptimas favorables para que se presente la infección son: humedad relativa mayor al 80% y temperaturas de 18 a 20°C (IICA, 1990).

1.1.1. Taxonomía

Tabla 1. Clasificación del genero Botrytis

Clase	Hypomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Genero	Botrytis
Especie	B. fabae

Fuente: CRUZ, 2001

1.1.2. Etiología

La enfermedad que causa la mancha chocolate es *Botrytis fabae* S, este hongo produce abundante micelio gris, conidióforos largos y ramificados que portan racimos de conidios ovoides, unicelulares, hialinas, produciéndose a menudo esclerotios de color negro (IICA, 1990).

1.1.3. Descripción y morfología

- **Micelio** cespitulos formando una capa compacta, de color francamente castaño claro, más tarde blanquecinos; nunca tupido y gris como en el grupo cinerea. Micelio en el interior de la matriz, hialino al principio, después castaño más o menos obscuro, pluriarticulado (células de 12-70 μ

de longitud), con hifas de 4,9-15,1 μ de diámetro. Las ramas conidióforas salen por los estomas y, a medida que se van desarrollando los conidióforos, va constituyéndose un estroma de color castaño oscuro sobre el que quedan implantados los sucesivos aparatos conidióforos (SARDIÑA JR., 1929).

- **Conidióforos** de 162-231 μ de longitud, pardo-oscuros en la base y que palidecen hacia arriba, hasta ser hialinos en sus últimas ramificaciones, de contenido finamente granuloso (sólo en algunas regiones, tanto de las partes castañas como de las hialinas, es como espumoso); erguidos, unos ensanchados en la base en forma cónica, más o menos globosa, y otros no, con 1-3 tabiques en su tronco principal y 3-4 ramas primarias de 1-3 tabiques, que o no se ramifican o rara vez lo hacen en dos ramas terminales; las terminaciones de estas ramas últimas se hallan algo dilatadas en forma esférica o ligeramente piriforme, y en ellas están insertos los conidios, mediante cortos esterigmas; las cabezuelas de conidios que se forman alrededor de estas últimas ramificaciones tienen de 38-63 μ de diámetro. (SARDIÑA JR., 1929).
- **Conidios** ovoideos, a veces algo irregulares y frecuentemente con la cicatriz de inserción del esterigma bien marcada; en grandes masas presentan un color manifiestamente castaño claro, y aun en preparación montada en agua y observada con un aumento de 200 X poseen un ligero color amarillento. Las dimensiones son: 15,2-24,3 X 10,9-18,2 μ : la mayoría de 20-23 X 13,9-16,4 μ : media de 200 esporas 20,6 X 14,6 μ . (SARDIÑA JR., 1929).
- **Esclerocios** no vistos en plantas atacadas naturalmente, ni tampoco en las inoculadas de modo experimental, pero sí en determinados cultivos. Los esclerocios son las principales estructuras de resistencia de *Botrytis*. Son

órganos pluricelulares, de morfología plano-convexa, cuyas dimensiones oscilan entre 1-5 mm de sección transversal y 1-15 mm de sección longitudinal, dependiendo de las condiciones de cultivo. Están compuestos por un 75 % de carbohidratos, 10 % de proteínas, 5 % de glucosamina y 0.21 % de lípidos. Su estructura se forma por el crecimiento de las hifas, las cuales van entrecruzando sus paredes a medida que se van dividiendo hasta que se fusionan unas con otras dando lugar a un tejido compacto de coloración oscura. La formación de los esclerocios está influenciada por múltiples factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición del tejido sobre el que se desarrolla (LOPEZ HERRERA *et al.*, 1986).

La función más relevante que desempeñan los esclerocios es la de supervivencia del hongo, siendo su compacta morfología y la alta acumulación de sustancias nutritivas, las que le proporcionan las condiciones idóneas para soportar temperaturas bajas en la estación invernal, para posteriormente, con la llegada de la primavera poder germinar dando lugar a un nuevo micelio. También juegan un importante papel en el ciclo sexual del hongo, porque son ellos los que participan como gameto femenino, y a partir de los cuales se desarrollan los apotecios. Y además, poseen una enorme capacidad para producir conidióforos (GRINDLE, 1979).

- **Los apotecios** son cuerpos reproductivos que surgen, individualmente o en grupo, de los esclerocios que han sido fecundados. Su morfología consta de un pequeño tallo o estípite (de 2 a 20 mm de longitud y 0.5-1.5 mm de grosor) y una región ensanchada a modo de embudo denominada himenio o tecio. (GRINDLE, 1979).
- **Los estípetes** están compuestos por hifas septadas, dispuestas longitudinalmente y paralelas entre sí. En el tecio o región fértil se encuentran las ascas dispuestas regularmente y en distintos estadios de desarrollo. Las ascas son hifas fértiles con forma cilíndrica y alargadas que

contienen en su interior un total de ocho ascosporas. Además de las ascas se presentan unas hifas estériles ramificadas en la base del pecio llamadas paráfisis. (GRINDLE, 1979).

- **Las ascosporas** poseen una morfología elipsoidal con unas dimensiones que oscilan entre 9-17.6 μm para la sección longitudinal y de 4-9.3 μm para la transversal y su interior contiene un variable y elevado número de núcleos. (GRINDLE, 1979).

1.1.4. Sintomatología

En la fase inicial del desarrollo del cultivo, la enfermedad se puede presentar en forma de manchas características de color chocolate sobre las hojas (fase no agresiva), posteriormente alcanza a los tallos, flores y vainas. En la fase agresiva de la enfermedad (floración, formación y maduración de vainas), las partes afectadas se ven como manchas necrosadas con abundante formación de una felpa de color gris marrón sobre la misma (Coca, 2004).

- Las manchas de color chocolate sobre las hojas, se considera como una fase no agresiva.
- Las manchas en tallos y vainas, se considera como una fase agresiva.
- En la producción de vainas, el ataque ocurre desde la punta hacia la base y los granos presentan manchas sobre el tegumento. La enfermedad se desarrolla en las hojas, aunque los tallos y flores también pueden ser infectados bajo condiciones favorables al hongo.

Sobre las hojas los síntomas varían desde pequeños puntos de color marrón-rojizo a manchas circulares con el margen marrón rojizo y el centro de

color café claro, en condiciones óptimas de temperatura (18-20°C) y humedad (90-100%) la infección resulta muy agresiva (IICA, 1990).

1.1.5. Ciclo del hongo

El ciclo estacional de *Botrytis* comienza con la germinación de esclerocios que han permanecido en restos de cultivos y plantas hospederas durante el período invernal. Los esclerocios producen micelio, el cual puede esporular originando conidias que son dispersadas por el viento o transportadas por vectores. La infección del hospedero ocurre a partir de la germinación de las conidias que se han depositado sobre la superficie del mismo, desarrollándose inicialmente un micelio superficial, pero que luego puede invadir tejidos susceptibles. Bajo condiciones favorables el hongo produce abundante micelio y gran número de conidias, las cuales pueden causar infecciones posteriores y propagar el patógeno hacia otras plantas. Bajo condiciones limitantes o desfavorables al crecimiento, el patógeno produce esclerocios, que son las estructuras de resistencia para sobrevivir durante períodos adversos. *Botrytis* también puede invernar en forma de micelio en restos de plantas o rastrojos de cultivos. Al producirse condiciones climáticas favorables, se reanuda el crecimiento del micelio o germinan los esclerocios, reiniciándose el ciclo (COLEY *et al.*, 1980; AGRIOS, 2005 y HOLZ, *et al.*, 2007).

1.1.6. Control

La infección puede ser minimizada por la destrucción de restos de plantas al final de la temporada, evitar los sitios recientemente utilizados para los cultivos de haba y la selección de variedades con un alto nivel de resistencia a la enfermedad. Los fungicidas se pueden utilizar, pero para obtener los mejores

resultados del cultivo deben ser controlados cuidadosamente, el patógeno se debe identificar con precisión y el cultivo rociado con el producto correcto en el momento óptimo. El mayor impacto de la enfermedad de la mancha chocolate es a través de la pérdida de flores y fumigación durante el periodo de floración es probable que logren el mayor incremento en el rendimiento (COCA, 2004).

1.2. Hongos fitopatógenos

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, 2004).

1.2.1. 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).

1.2.2. 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).

1.2.3. 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 biótros, 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 necrótros, 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).

1.2.4. 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, 2004).

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, 2004).

1.3. Medio de cultivo usado en el aislamiento de hongos

FRENCH & HEBERT (1980), manifiestan que el medio de cultivo utilizado habitualmente que se encuentran en el mercado es:

- **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 y es el más utilizado en el laboratorio para cultivos puros.

1.4. Estructuras reproductivas

1.4.1. 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.
- **Estructuras representativas de la clase Basidiomycetes:** La clase basidiomycetes se caracteriza por tener micelio tabicado y reproducirse sexualmente mediante la producción de basidioporas. Estas son producidas exógenamente sobre una estructura llamada basidio. Los basidios pueden ser septados o no.
- **Estructuras representativas de la clase Deuteromycetes:** Esta Clase incluye a los hongos superiores (micelio tabicado) a los que no se les conoce la reproducción sexual. En algunos casos por no tener reproducción sexual, o si la tienen esta se produce rara vez, o simplemente porque no se le conoce aún. Estos hongos se reproducen de forma asexual formando esporas denominadas conidios. Estos conidios pueden producirse en forma libre o dentro de cuerpos fructíferos. Los conidios pueden tener diferentes formas y tamaños. Pueden ser hialinos u oscuros.

Pueden ser unicelulares o multicelulares. Pueden estar sueltos o agrupados en ramilletes o cadenas.

CAPITULO II

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

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: Alex Mauricio Soria Guerra
- Director de tesis: Ing. Emerson Jácome
- Miembros del tribunal:
 - Ing. Edwin Chancusig
 - Ing. Fabián Troya
 - Ing. Karina Marín

2.1.3. Material de oficina

- Cámara fotográfica SONY
- Computadora hp
- Flash memory hp
- Fundas de papel (sobres de carta)
- Fundas de plástico (ciploc)
- GPS GARMIN
- Impresora
- Libro de campo
- Navaja
- Tijeras

2.1.4. Material experimental

- Muestra infectada del Haba (*Vicia faba* L.) con Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.).

2.1.5. Materiales de laboratorio

2.1.5.1. Equipos

- Autoclave semiautomática 2540-23 litros
- Balanza digital
- Cámara científica INFINITY 1-2CB
- Cámara de crecimiento o incubadora IN110
- Cámara de flujo laminar aurora mini con base
- Desmineralizador de agua waterwise 9000

- Estufa eléctrica
- 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
- Cofias
- Cubreobjetos
- Cucharas de plástico pequeñas
- Cucharas de cocina
- Encendedor
- Esferográfico
- Goteros de plástico
- Guantes descartables
- Mandil
- Mascarillas descartables
- Material didáctico
- Matraz erlenmeyer de 500 ml
- 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
- Vasos 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

Para dicha investigación se caracterizó morfológicamente: signos y síntomas, macro y micro estructuras y ciclo de vida del hongo fitopatógeno *Botrytis fabae* L. En base a imágenes captadas con el microscopio trinocular OLYMPUS CX31 con una cámara acoplada INFINITY 1-2CB.

2.2.1. Investigación Descriptiva

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

Esta 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. Métodos y Técnicas

2.3.1. Método

La investigación se basa en un diseño no experimental, pues no se realizó manipulación de ninguna variable, es decir no se cambiara la realidad del cultivo del haba en el sector La Urbina, cantón Pillaro-Tungurahua, por el contrario lo que se intenta con la investigación es mejorarla, gracias a la “Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos”.

2.3.2. Métodos lógicos

- **Método descriptivo analítico:** Se utilizó este método en la investigación porque se describió y analizó detalladamente en campo como en laboratorio el hongo fitopatógeno mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.).
- **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 que se trata de *Botrytis fabae* L. en el cultivo del Haba (*Vicia faba* L.)
- **Método comparativo:** Este método se utilizó con el fin de comparar si el hongo en estudio coincide o no con la bibliografía citada.

2.3.3. Técnica

- **Observación:** Consistió en observar en campo y laboratorio, los sucesos de manera directa y abierta con el propósito de obtener información de primera mano del fenómeno que se investiga. La observación permitió conocer la realidad en la que se desarrolla el hongo, además se observó los signos y síntomas que se presentan en el cultivo. Como instrumento se utilizó un cuaderno de campo y cámara fotográfica SONY con el fin de apuntar todos los sucesos observados en el cultivo, y en laboratorio se utilizó un microscopio trinocular le marca OLYMPUS CX31 con una cámara acoplada INFINITY 1-2CB y lo ayuda de un computador.

2.4. Delimitación del lugar de recolección

Se recolecto las muestras en el sector La Urbina el mismo que se encuentra ubicado en la parte Norte del cantón Pillaro, Provincia del Tungurahua, esta limita: al norte con la Parroquia San Andrés, al sur con el Cantón Pillaro, al este con San Andrés y Píllaro, al oeste con Cunchibamba y Unamuncho.

2.4.1. Ubicación Política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Tungurahua
- **Cantón:** Pillaro
- **Sector:** La Urbina

2.4.2. Ubicación Geográfica

- Latitud: 01° 08'47.23" S
- Longitud: 078° 33'10.77" O
- Altura: 2853 msnm
- Extensión: Aproximada 13 Km²

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 RUBERT STREETS (1972).

- Identificar la planta hospedante: haba (*Vicia faba L.*)
- Síntomas en campo: utilizar información propia y del agricultor.
- Condiciones de cultivo: Información del tipo de suelo, prácticas y riego, fertilización y aplicación de plaguicidas.
- Síntomas en detalle: Observación de manchas, roya foliar, pudriciones chancros o agallas.

- Observación: se observó con un microscopio OLYMPUS CX31 en laboratorio de la superficie de las lesiones y tejidos muertos; esto permitió observar la presencia de esporas y cuerpos fructíferos del hongo.

2.6.1. Toma de muestras

Se tomó las muestras por cuotas, en la cual se fijó un número de individuos que reúnen unas determinadas condiciones.

2.6.2. Procedimientos en la toma de muestras

Se tomó plantas afectadas (hojas y fruto) utilizando tijeras, en cada corte se esterilizó 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 colocó en una funda ziploc con su respectiva codificación y se trasladó inmediatamente al laboratorio para proceder con el trabajo.

2.7. En Laboratorio

2.7.1. Preparación de medio de cultivo PDA

Anexo 1. Con la guía didáctica.

2.7.2. Aislamiento

Par realizar este proceso se procedió con diferentes tipos de aislamientos según se presente el caso tales como:

2.7.2.1. Aislamiento directo.

Se observó a través del microscopio el ejemplar enfermo; para ver si se encontraban fructificaciones, micelio, etc., se procedió a tomar una muestra de este material con una aza de cultivo esterilizada y se colocó directamente sobre el medio de cultivo solidificado. Se incubó a una temperatura de 23,5°C y se realiza observaciones durante los siguientes 7 días.

2.7.2.2. Partes vegetales en medio de cultivo.

Se tomó porciones de tejido enfermo y se lavó en agua desmineralizada, se secó los tejidos con papel absorbente, para desinfectarlos en una solución 2:1 de alcohol (72° G.L.), se lavó dos veces con agua destilada (estéril) y se eliminó los excesos de la misma, como paso final se colocó en el interior de una caja de petri estéril con PDA.

2.7.3. Purificación

Consistió en realizar cortes de puntas de micelio con la ayuda de un bisturí estéril del borde de la colonia en crecimiento. 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.

2.7.4. Incubación

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

2.7.5. Caracterización morfológica

2.7.5.1. 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 sostuvo con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después se colocó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se pegó la cinta sobre el portaobjetos para luego observar en el microscopio con el lente 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 asa se extendió el micelio, después se colocó el cubreobjetos y finalmente se observó en el microscopio con el lente de 4x, 10x, 20x y 100x.

2.7.6. 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 objetivo adecuado y toma de fotografías microscópicas de las diferentes estructuras.
- Creación de un archivo con las 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 inoculo.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en el cultivo del Haba (*Vicia faba* L.)

Mediante observación directa se pudo determinar que el hongo fitopatógeno de mayor impacto en el cultivo del Haba (*Vicia faba* L.) en el sector la Urbina, Cantón Pillaro, Provincia del Tungurahua, es la Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.) no solo por encontrarse presente en todo el cultivo (determinado por sus signos y síntomas, como se observa en la Fotografía 1). Sino también por el testimonio del agricultor quien nos confirma cuan agresiva puede llegar a ser esta enfermedad.

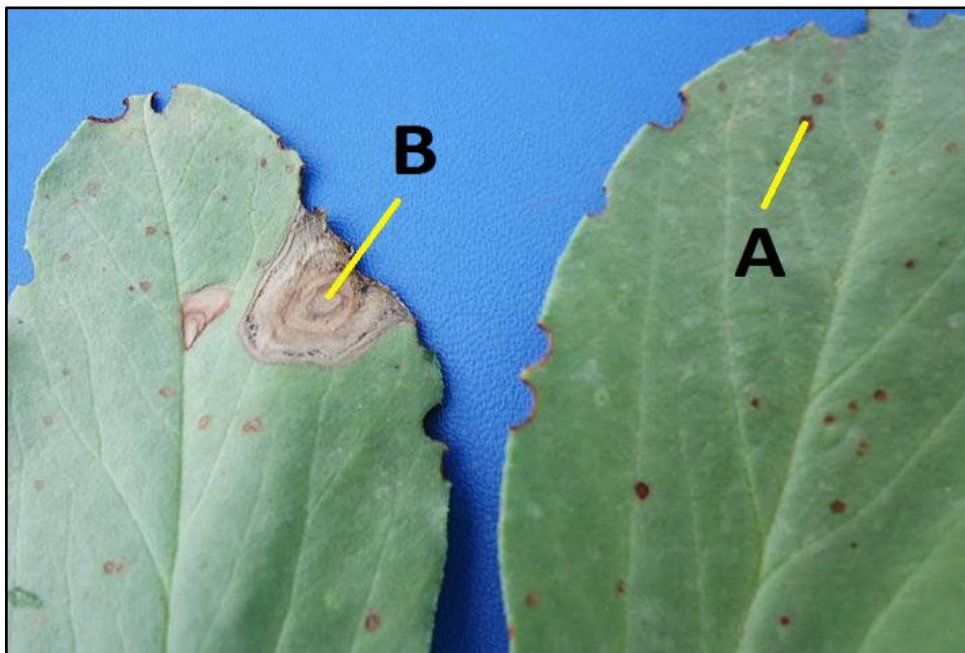


FOTOGRAFÍA 1. Observación en campo: (*Botrytis fabae* L.)

Fuente: Soria Alex

3.2. Signos y síntomas de la Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.) en el cultivo del Haba (*Vicia faba* L.).

En campo se evidencio puntos de color marrón-rojizo dispersos en toda el área foliar especialmente las más cercanas al suelo, manchas circulares con bordes de color marrón rojizo y el centro de color café claro (Fotografía 2.), e incluso en algunas hojas estas se extendían casi en la totalidad también se encontró manchas necróticas en tallos y vainas, correspondientes a *B. fabae* L. corroborando lo que dice (IICA, 1990 y COCA 2004)



FOTOGRAFÍA 2. Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.).

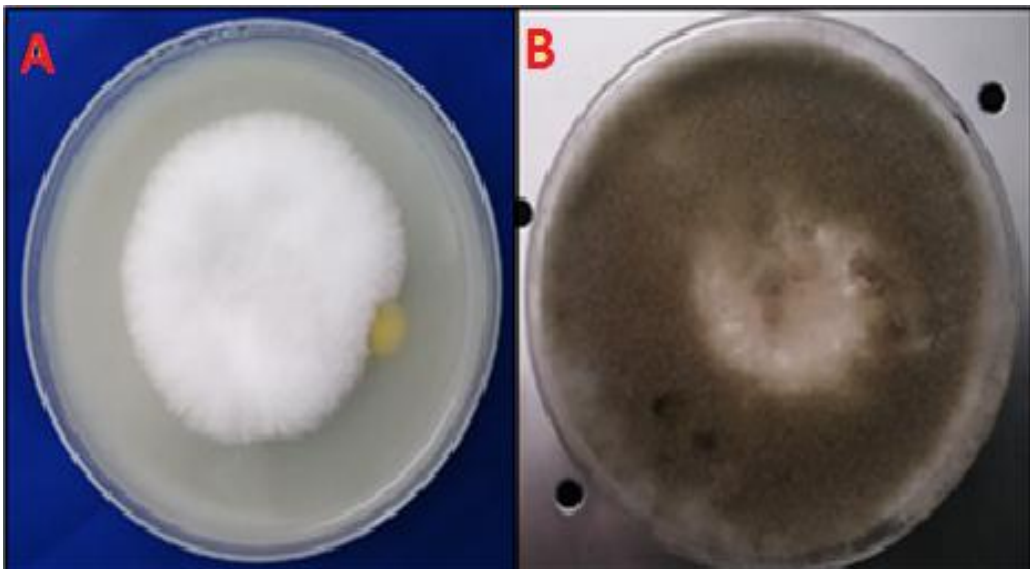
Fuente: Soria Alex

3.3. Caracterización de macro y micro estructuras de la Mancha Chocolate (*Botrytis fabae* L.).

3.3.1. Macro estructuras de *Botrytis fabae* L.

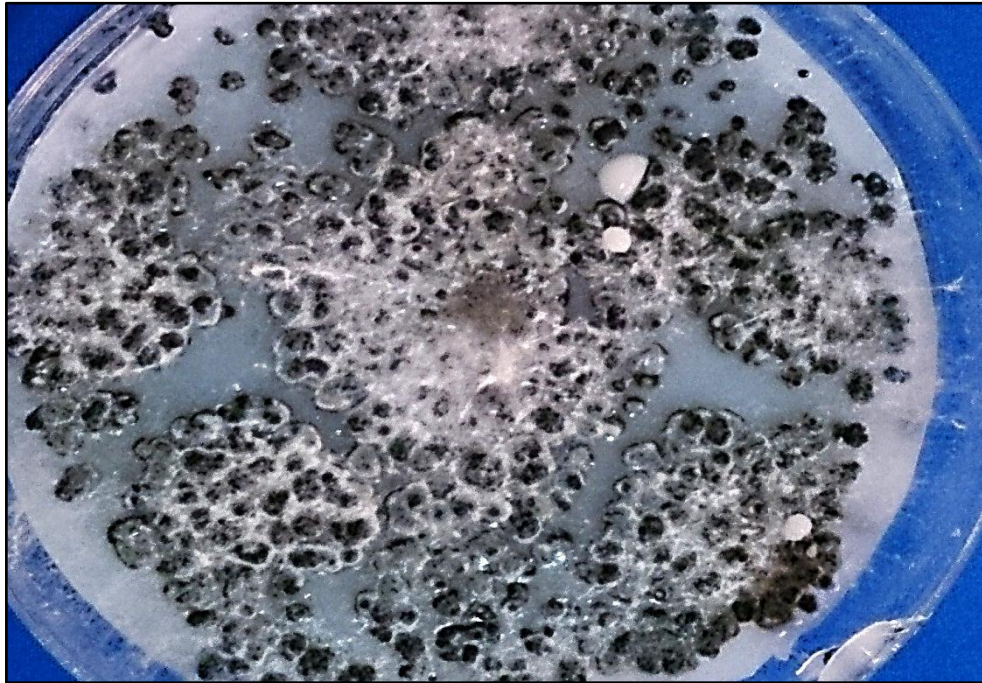
Luego del aislamiento y la incubación del fitopatógeno se observa las siguientes macro estructuras:

El primero, que se presenta desde el segundo día de la inoculación, donde se puede observar como el micelio de un tono castaño claro se desarrolla por el interior de la matriz (medio de cultivo) para luego infectar la superficie con un micelio de color blanco el cual se desarrolló de manera concéntrica (Fotografía 3.A.), cubriendo en su totalidad de la caja Petri y finalmente tornándose de color gris con estructuras asexuales (Fotografía 3.B.).



FOTOGRAFÍA 3. Macro estructuras de Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.)
Fuente: Soria Alex

Dadas las condiciones que no permitían el desarrollo de la enfermedad y su expansión, se observó como el micelio se agrupaba dando lugar a unos tejidos compactos de color negro llamados esclerocios, de forma semiesféricos más bien irregulares de superficie lisa y de 1-6 mm de sección transversal por 1-4 mm de sección longitudinal y menos de 1 mm de grosor (Fotografía 4). Estos no son más que estructuras de resistencia los cuales aseguran su permanencia en la tierra o restos vegetales hasta que existan las condiciones adecuadas para reproducirse. Corroborando lo que dice (LOPEZ HERRERA et al., 1986)

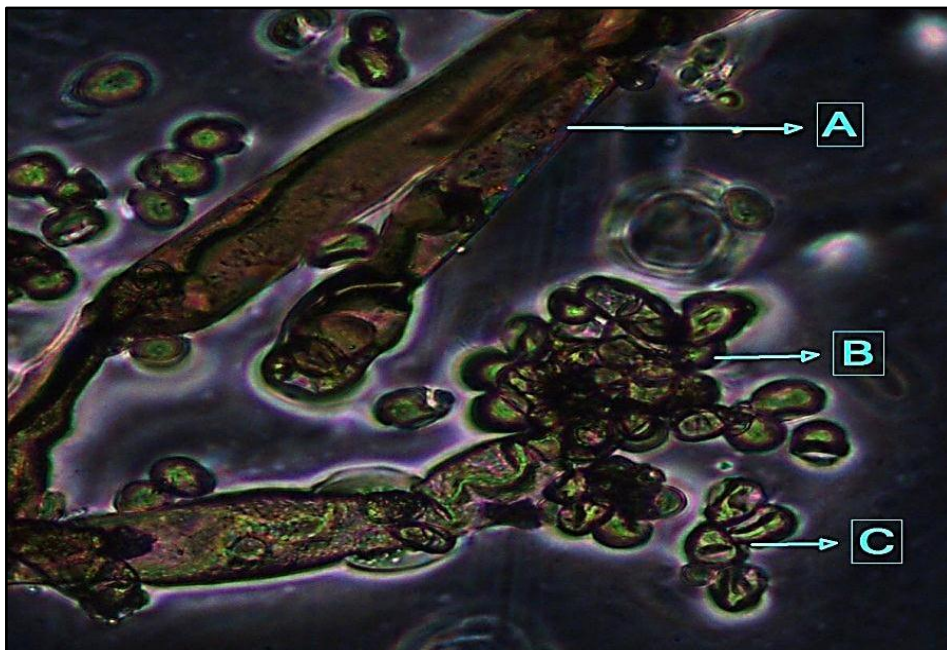


FOTOGRAFÍA 4. Macro estructuras de Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.).
Fuente: Soria Alex

3.3.2. Micro estructuras de *Botrytis fabae* L.

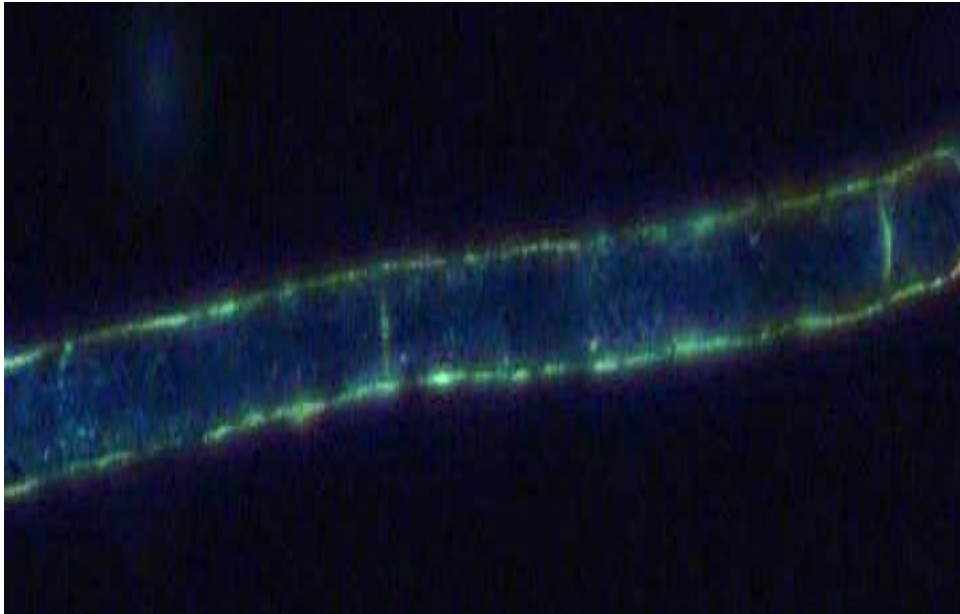
Se observó micro estructuras con el Microscopio Trinocular OLYMPUS CX31 con cámara científica INFINITY 1-2CB, con el lente de 10-20x.

Se identificó claramente; el micelio, el conidióforo y los conidios (Fotografía 5.). El micelio sin septaciones hialino que se multiplica vegetativamente (Fotografía 6.), existe septaciones cerca al ápice en el conidióforo el mismo que se ramifica en algunos casos y las ramificaciones también presentan septaciones (Fotografía 7 y 8). Los conidióforos son coloreados de 232,91 μm y en ellos se insertan los conidios que tienen una forma ovoide y otros irregulares de color amarillo algo castaño en grupos (Fotografía 9). Los conidios presentan un tamaño de 22,19 x 15,38 μm (Fotografía 10). Corroborando lo que dice (SARDIÑA JR., 1929)

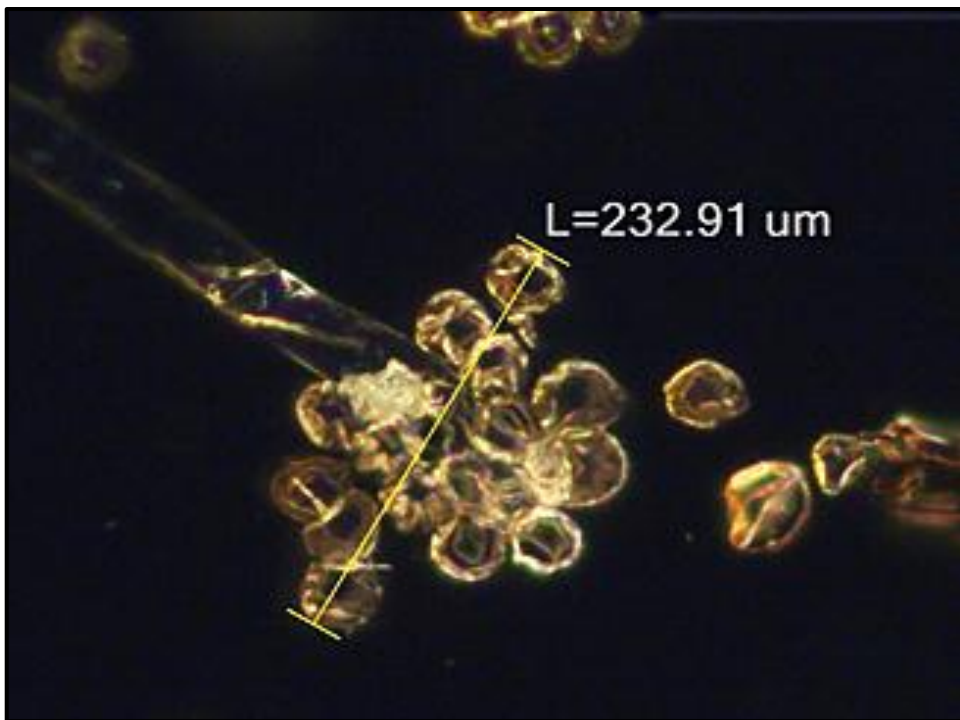


FOTOGRAFÍA 5. Micro estructura de *B. fabae* observada con el lente de 20x.

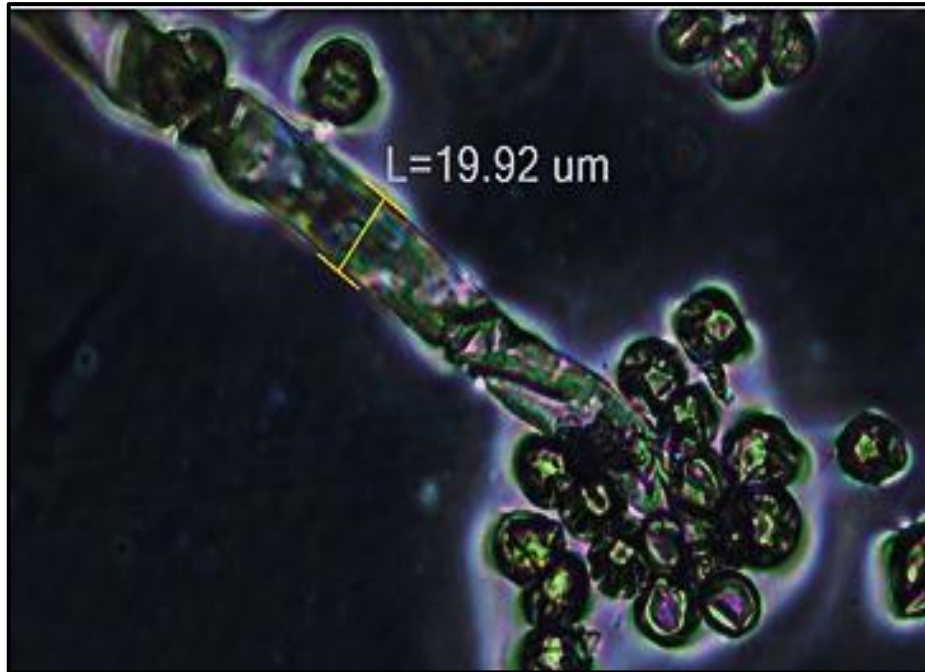
Fuente: Soria Alex



FOTOGRAFÍA 6. Hifa observada al microscopio con el lente de 20x
Fuente: Soria Alex



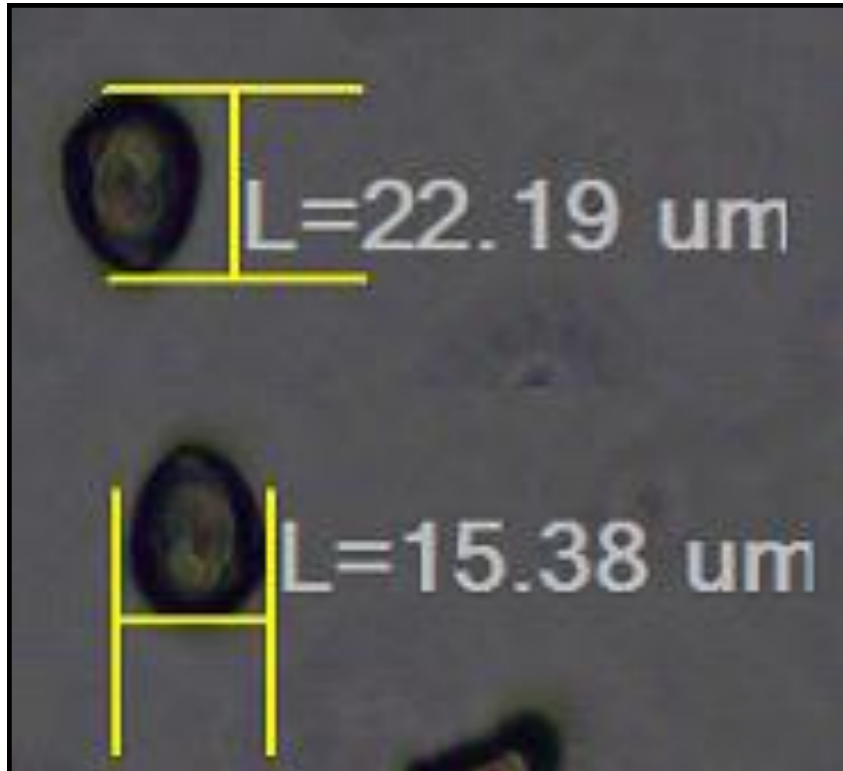
FOTOGRAFÍA 7. Longitud del conidióforo observado con el lente de 20x
Fuente: Soria Alex



FOTOGRAFÍA 8. Longitud de la hifa observada con el lente de 20x
Fuente: Soria Alex




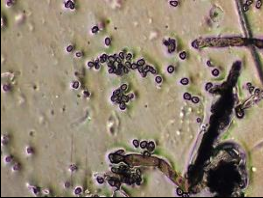



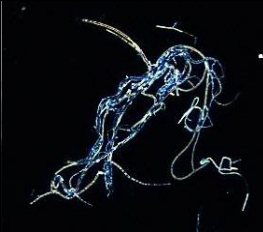
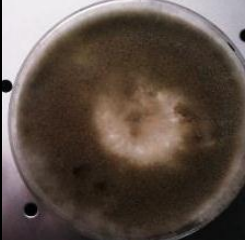

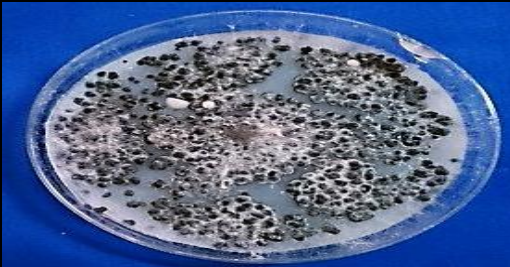
FOTOGRAFÍA 9. Conidios de *B. fabae* observados con el lente de 20x.
Fuente: Soria Alex



FOTOGRAFÍA 10. Medidas del conidio observado con el lente de 20x
Fuente: Soria Alex

3.4. Descripción del ciclo de vida del hongo *Botrytis fabae* L. en condiciones de laboratorio.

Tabla 2. Ciclo de vida de *Botrytis fabae* L.

Actividad	Tiempo/ Temperatura	Imagen	Observación al microscopio	Lente
Siembra del Hongo	10 min /19°C			20x
Infección	2 días /23,5°C			10x
Colonización completa del medio de cultivo	5-7 días /23,5°C			10x
Formación de conidióforos y conidios	9-11 días /23°C			20x
Formación de estructuras de resistencia (esclerocios)	11-15 días			

Fuente: Soria Alex

3.5. Elaboración de una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo de Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.)

La guía de la caracterización morfológica del hongo *Botrytis fabae* L. se encuentra en el ANEXO 1.

CONCLUSIONES:

1. Se determinó que el hongo de mayor impacto económico en el cultivo del haba (*Vicia faba* L.) en el sector La Urbina, Cantón Pillaro de la Provincia del Tungurahua, se trata de Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.) luego de una recopilación de testimonios de pequeños agricultores de la zona, lo cual me permitió corroborar los datos obtenidos bibliográficamente.
2. Se concluye que los signos y síntomas que corresponden a *Botrytis fabae* L. se manifiestan con puntos de color marrón-rojizo o manchas circulares de color marrón rojizo con el centro de color café claro y manchas necróticas como se observa en la imagen 2. Y concuerda con la bibliografía citada.
3. Luego de una breve revisión bibliográfica y sumado a observación en el laboratorio, se determinó como macro estructuras al micelio que es de color blanco inicialmente luego se torna gris con estructuras asexuales para finalmente formar esclerocios. Y como micro estructuras precintan conidióforos de $232.91\mu\text{m}$ y conidios de $20.19 \times 15.38\mu\text{m}$.
4. También se pudo concluir que el ciclo de vida del hongo *Botrytis fabae* L. en condiciones de laboratorio es de 11 a 15 días hasta la formación de esclerocios.
5. El presente trabajo se puede concluir con una guía didáctica que pretende servir de ayuda a los agricultores y estudiantes que se interesen en dicho tema, que facilite el manejo tanto del cultivo del haba como del patógeno *Botrytis fabae* L.

RECOMENDACIONES:

1. Se recomienda tomar en cuenta los protocolos del uso adecuado del laboratorio, equipos y los materiales para obtener muestras de calidad para su estudio.
2. Tener muy en cuenta las condiciones de asepsia durante todo el proceso ya que de eso depende la obtención de los resultados deseados y nos ahorrara tiempo y dinero.
3. Debido al problema que *Botrytis fabae L.* representa para la productividad del cultivo del haba se recomienda tomar muy en cuentas las practicas pre culturales y culturales del cultivo, con el fin de minimizar al máximo la incidencia de la enfermedad y la utilización de productos químicos en su control.
4. Dado que el uso de agroquímicos será en un punto inevitable, se recomienda el asesoramiento técnico adecuado con el fin de no causar una intoxicación a la planta, al suelo o al medio.

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.
- **Cepa.**- Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro; aislado; grupo de aislados similares; una raza.
- **Conidio.**- Espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo.
- **Conidióforos.**- Es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Se localizan en el extremo de hifas las cuales levantan el conidióforo en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia.
- **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 continuada 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.**- Se denomina a un organismo, en general microorganismo, que causa enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular causado por la secreción de enzimas, toxinas y otras sustancias.
- **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.
- **Hongos.-** 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 Fungí. La ciencia que los estudia se llama Micología (Mykes=Hongo y Logos=Estudio).
- **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.
- **Mitospóricos.-** Los hongos *Mitospóricos*, también llamados deuteromicetes, hongos imperfectos o anamorfos, carecen de fase sexual.
- **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.
- **Síntoma.-** Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de una enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRIOS., (2004). Fitopatología. (2ª Ed). Limusa, Noriega Editores. México
- AGRIOS, G. (2005). Plant Pathology. Nueva York: Academic Press.
- AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. San Diego, Estados Unidos. 5ª ed. Academic Press. 922p.
- COCA, M. (2004). Enfermedades foliares del haba (*Vicia faba*). En el altiplano de La Paz y su manejo. La Paz, Bolivia.
- COLEY, J., VERHOEFF, K., y JARVIS, W. 1980. The biology of *Botrytis*. London, England. Academic Press. 318 p.
- CREPON, K., MARGET, P., PEYRONNET, C., CARROUEE, B., ARESE, P., DUC, G., (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. Field Crops Research 115, 329-339.
- DAVIDSON, J., PANDE, S., BRETAG, T., LINDBECK, K. Y KISHORE, G. (2007). Biology and management of *Botrytis* spp. in legume crops. In: ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P. Y DENLE, N. *Botrytis* biology, pathology and control. Springer, USA. pp: 295-318.
- DUC, G., BAO, S., BAUM, M., REDDEN, B., SADIKI, M., JOSE SUSO, M., VISHNIAKOVA, M., ZONG, X. (2010). Diversity maintenance and use of *Vicia faba* L. genetic resources. Field Crops Research 115, 270-278.
- FAOSTAT, (2010). <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>
- FRENCH, E., & HEBERT, T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica: IICA.
- GRAHAM, P.H., VANCE, C.P. (2003). Legumes: Importance and constraints to greater use. Plant Physiology 131, 872-877.
- GRINDLE, M. (1979). Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology **111**, 109-120.
- HEBBLETHWAITE, P. (1983). The faba bean (*Vicia faba* L.). Cambridge, England. Scribe Design. 573 p.
- HERRERA, L., & MAYEA, S. (1994). Fitopatología General. La Habana, Cuba: Felix Varela.

- IICA-BID-PROCIANDINO. (1990). Boletín Técnico N° 5. Estudio, identificación y control de principales enfermedades y plagas del haba (*Vicia faba* L.) en la Subregión Andina. Edición: PROCIANDINO, Quito, Ecuador 17p.
- HOLZ, G., COERTZE, S y WILLIAMSON, B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *In*: ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P. Y DENLE, N. *Botrytis* biology, pathology and control. Springer, USA. pp:9-27.
- KIRSOP, B., & DOYLE, A. (1991). Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. San Diego - California: Academic Press Inc.
- LAUNDON, G.F. Y WATERSTON, J.M., (1965). *Uromyces viciae-fabae*. CMI. Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria. CAB International. No. 60.
- LOPEZ HERRERA, C. J., MATEO SAGASTA, E. & GRANA, E. E. (1986). Estudio de la facies esclerocial de *Botrytis cinerea*. *Phytopath. medit.* 25, 19-25.
- MAMANI, F. (2007). Uso de trichoderma sp para el control de enfermedades fungosas en haba (*Vicia faba* L) en el altiplano norte, La Paz. La Paz, Bolivia.
- MIRZAEI S., E. MOHAMMADI GOLTAPPEH, M. SHAMS-BAKHSY Y N. SAFAIE. (2008). Identification of *Botrytis* spp. On Plants Grown in Iran. *Journal of Phytopathology* 156: 21–28.
- NIÑO. (2005). Guía agronomica cultivo de haba. Churin.
- PARRY, W. (1990). Plant pathology in agriculture. Cambridge, England. CUP. 365p.
- PERALTA & OTROS. (1993). Guía para el cultivo de haba. Machachi, Pichincha, Ecuador: INIAP.
- SAHILE, S., AHMED, S., FININSA, C., ABANG, M. Y SAKHUJA, K. (2008). Survey of chocolate spot (*Botrytis fabae*) disease of faba bean (*Vicia faba* L.) and assessment of factors influencing disease epidemics in northern Ethiopia. *Crop Protection* 27: 1457-1463.

- SARDIÑA, J.R. 1929. Una nueva especie de *Botrytis* que ataca las habas. Real Sociedad Española de Historia Natural. Memorias 15:291-295.
- SMARTT, J., (1984). Evolution of legumes. I. Mediterranean pulses. *Experimental Agriculture* 20: 275-296
- SIDDIQUE, K.H.M., JOHANSEN, C., TURNER, N.C., JEUFFROY, M.-H., HASHEM, A., SAKAR, D., GAN, Y., ALGHAMDI, S.S. (2012). Innovations in agronomy for food legumes. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32,45-64.
- STAATS, M., VAN BAARLEN, P., VAN KAN, J.A.L., 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22, 333-346.
- STODDARD F., NICHOLAS, A., RUBILAES, D., THOMAS, J. Y, VILLEGAS, A. (2010). Integrated pest management in faba bean. *Field Crops* 115: 308-318.
- 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.
- THARANATHAN, R.N., MAHADEVAMMA, S.(2003). Grain legumes - a boon to human nutrition. *Trends in Food Science & Technology* 14, 507-518.

ANEXOS


ANEXO 1. Guía técnica



Universidad
Técnica de
Cotopaxi

UA-CAREN

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



GUÍA

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL HONGO FITOPATÓGENO DE LA MANCHA CHOCOLATE (*Botrytis fabae* L)

Autor:

Alex Mauricio Soria Guerra



DEDICATORIA

Dedico la creación e esta guía didáctica a 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.

ALEX

ÍNDICE

DEDICATORIA

INTRODUCCIÓN

OBJETIVO

RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL
LABORATORIO

TOMA DE MUESTRA

MATERIALES Y PREPARACIÓN

PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PDA

TIPOS DE AISLAMIENTOS

PURIFICACIÓN

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

SIGNOS Y SÍNTOMAS

MACRO Y MICRO ESTRUCTURAS

CICLO DE VIDA DE (*Botrytis fabae* L), EN
CONDICIONES DE LABORATORIO

BIBLIOGRAFÍA

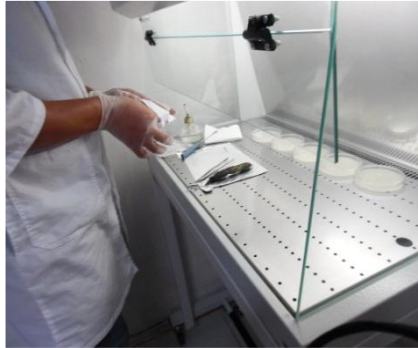
INTRODUCCIÓN

El motivo de esta investigación se basa en que la actividad de los pequeños agricultores dedicados al cultivo del haba quienes enfrentan una gran cantidad de problemas fitosanitarios lo cual ha provocado pérdidas en la economía de dichos agricultores y una reducción en el mismo cultivo en nuestro país. Uno de los principales problemas y de gran importancia es el denominado Mancha chocolate causado por el hongo *Botrytis fabae* L. el cual puede provocar una pérdida de hasta un 80% en la producción del cultivo.

Motivo por el cual se desarrolla la presente guía, esperando sea de utilidad para futuras investigaciones y para el control de dicha enfermedad.

OBJETIVO

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno Mancha chocolate (*Botrytis fabae* L.) 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 REACTIVOS

Reactivos.

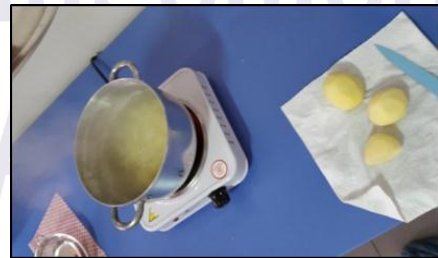
- * 3,5 gr de levadura
- * 30 gr de Agar
- * 35 gr de glucosa “azúcar”
- * 350 gr de papa
- * 955 ml de agua desmineralizada

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 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 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 vierte en dos matraces de 500ml equitativamente, después 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.

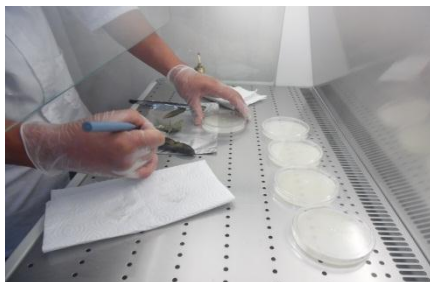
10. Enfriar la solución y colocar en cajas petri, hasta cubrir la base de las mismas.



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.

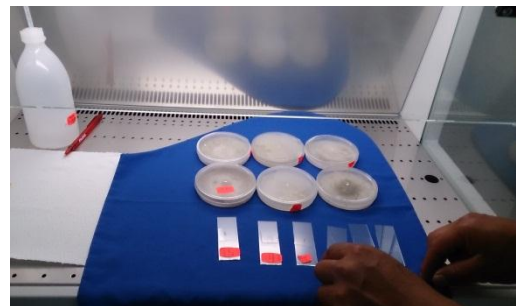
INCUBACIÓN

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

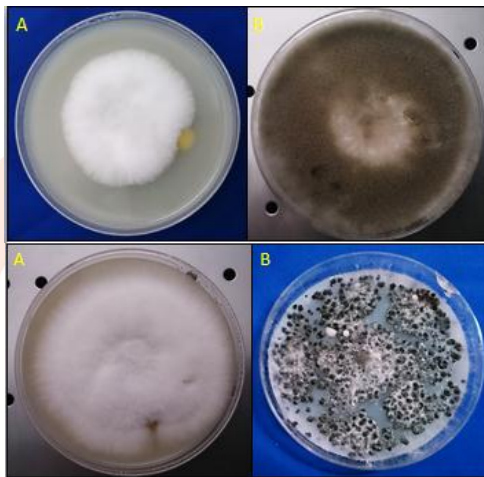
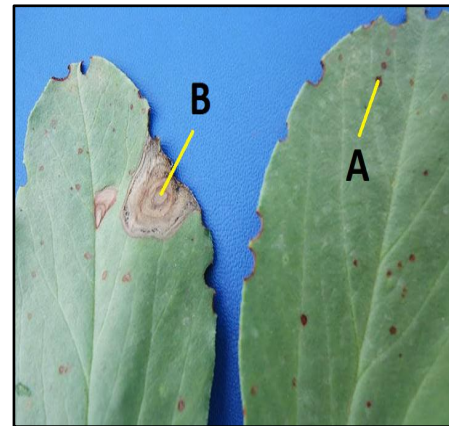
OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

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 el lente de 4x, 10x, 20x y 100x.



SIGNOS Y SÍNTOMAS:

Presenta puntos de color marrón-rojizo o manchas circulares con bordes de color marrón rojizo y el centro de color café claro en sus hojas y manchas necróticas en tallos y vainas que corresponden a *B. fabae* L. Si la infección es fuerte puede causar la muerte de la planta.

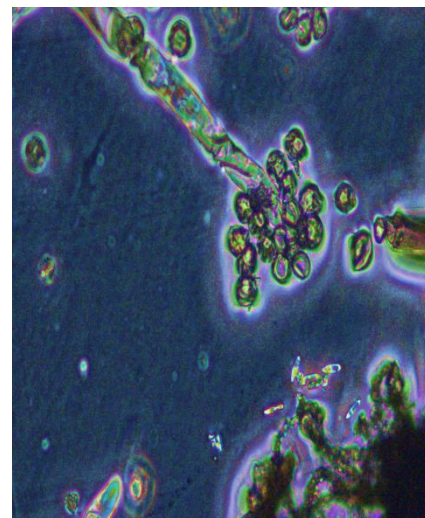


MACRO ESTRUCTURAS:

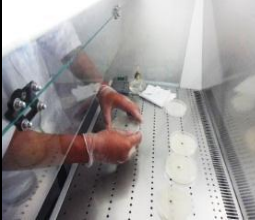
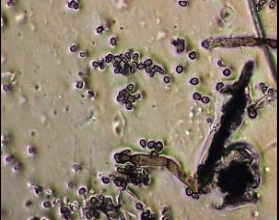






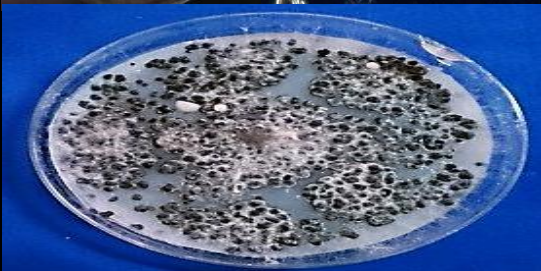
En el laboratorio se observa como macro estructuras al micelio o hifas de color blanco que luego se tornaran de color gris con estructuras asexuales (esporas), y al no presentarse las condiciones adecuadas para su desarrollo estas forman esclerocios.

MICRO ESTRUCTURAS:

Se identifica claramente un micelio sin septaciones hialino que se multiplica vegetativamente, existe septaciones cerca al ápice en el conidióforo el mismo que se ramifica en algunos casos y las ramificaciones también presentan septaciones. Los conidióforos son coloreados de 232,91 μm y en ellos se insertan los conidios que tienen una forma ovoide y otros irregulares de color amarillo algo castaño en grupos. Los conidios presentan un tamaño de 22,19 x 15,38 μm .



CICLO DE VIDA DEL HONGO *Botrytis fabae* L.

Actividad	Tiempo/ Temperatura	Imagen	Observación al microscopio	Lente
Siembra del Hongos	10 min /19°C			20x
Infección	2 días /23,5°C			10x
Colonización completa del medio de cultivo	5-7 días /23,5°C			10x
Formación de conidióforos y conidios	9-11 días /23°C			20x
Formación de estructuras de resistencia (esclerocios)	11-15 días			

BIBLIOGRAFÍA:

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

CREPON, K., MARGET, P., PEYRONNET, C., CARROUEE, B., ARESE, P., DUC, G., (2010). Nutritional value of faba bean (*Vicia faba* L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research* 115, 329-339.

DAVIDSON, J., PANDE, S., BRETAG, T., LINDBECK, K. Y KISHORE, G. (2007). Biology and management of *Botrytis* spp. in legume crops. In: ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P. Y DENLE, N. *Botrytis biology, pathology and control*. Springer, USA. pp: 295-318.

SARDIÑA, J.R. 1929. Una nueva especie de *Botrytis* que ataca las habas. *Real Sociedad Española de Historia Natural. Memorias* 15:291-295.

ANEXO 2. Imágenes de la práctica en campo

Ilustración 1. Identificación de *B. fabae* L. En campo.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 2. Toma de muestras.



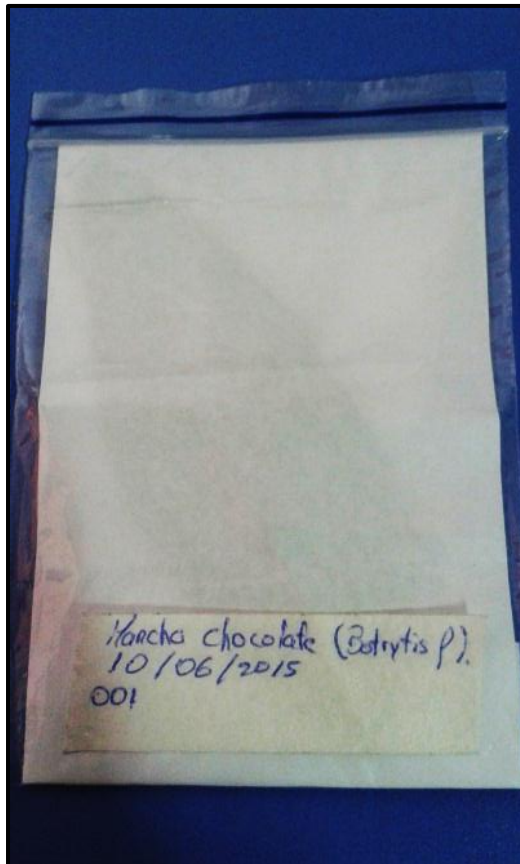
Fuente: Soria Alex

Ilustración 3. Selección de muestras y almacenamiento.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 4. Etiquetado de la muestra.



Fuente: Soria Alex

ANEXO 3. Preparación del medio de cultivo PDA.

Ilustración 5. Extracción del almidón mediante la cocción.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 6. Tamizado de la cocción para extraer el almidón.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 7. Pesado del Agar, sacarosa y levadura.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 8. Incorporación de todos los ingredientes a baño maría.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 9. Vaciado del medio PDA en los matraces.



Fuente: Soria Alex

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



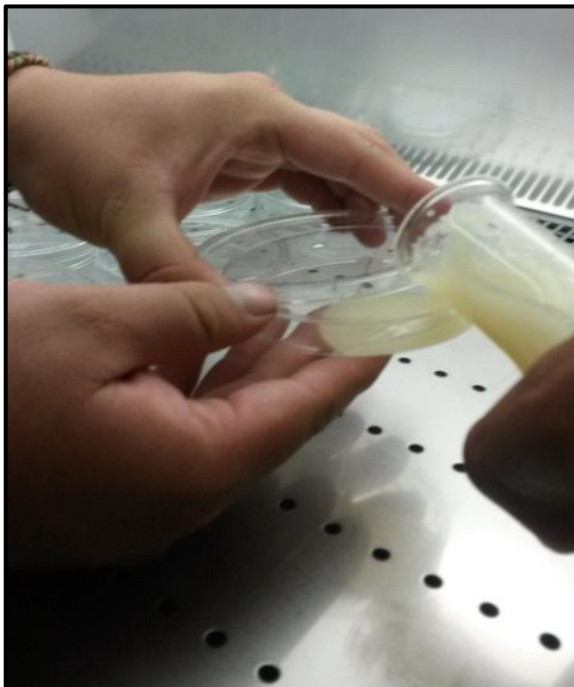
Fuente: Soria Alex

Ilustración 11. Autoclave por 15 minutos.



Fuente: Soria Alex

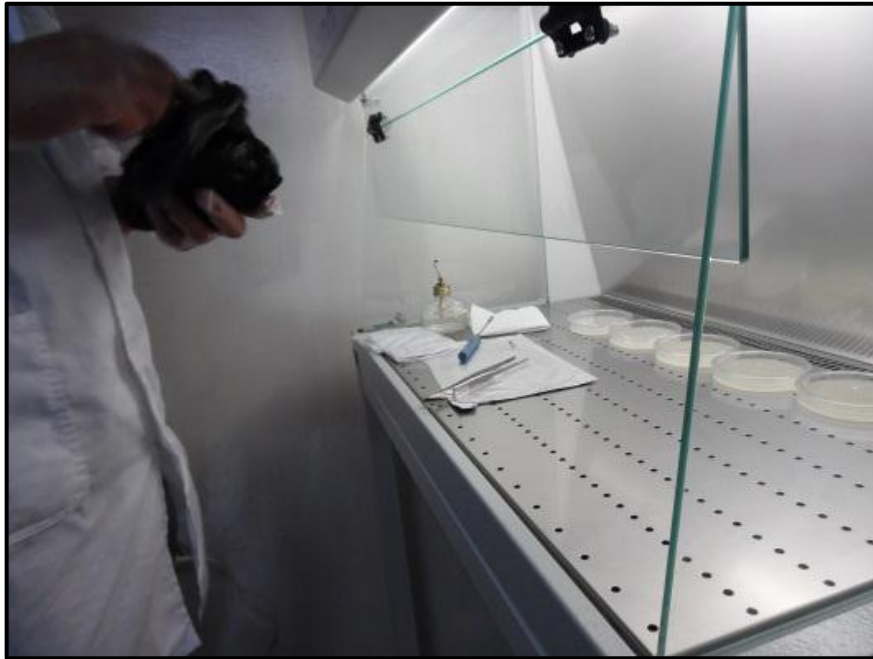
Ilustración 12. Vaciado en cajas Petri.



Fuente: Soria Alex

ANEXO 4. Inoculación de *B. fabae* L. en medio PDA.

Ilustración 13. Preparación del material de trabajo.



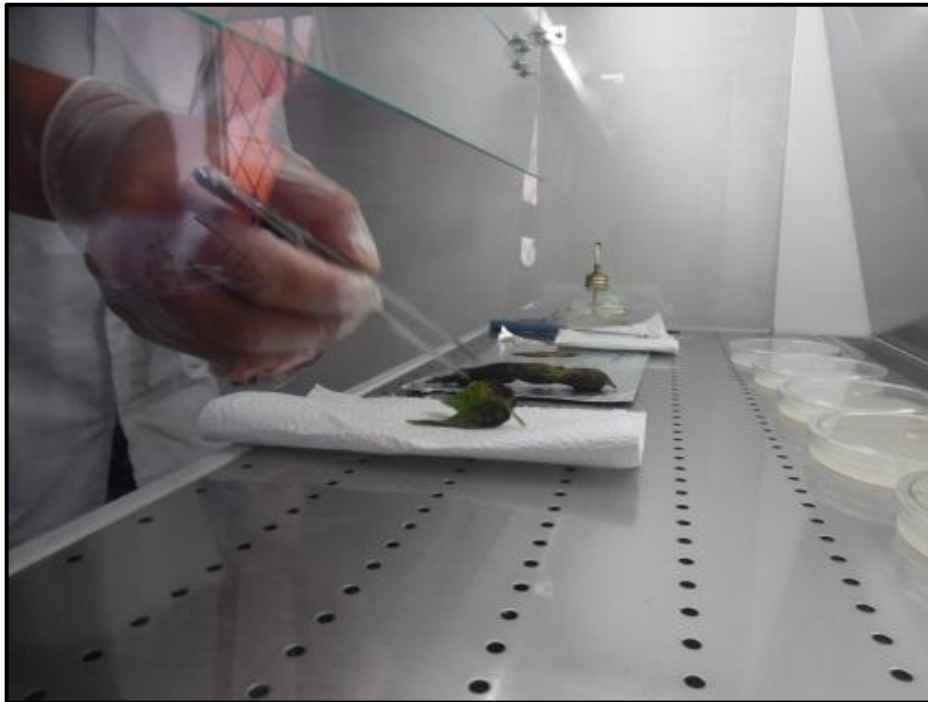
Fuente: Soria Alex

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



Fuente: Soria Alex

Ilustración 15. Secado de las muestras.



Fuente: Soria Alex

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



Fuente: Soria Alex

Ilustración 17. Inoculación tomando una porción de tejido infectado.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 18. Sellado de muestras y etiquetado.



Fuente: Soria Alex

ANEXO 5. Registro del desarrollo de muestras. Macro estructuras.

Ilustración 19. Registro del desarrollo de *B. fabae* L. a los 5 días de siembra falla en la elaboración del medio de cultivo.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 20. Muestras de *B. fabae* L. a los 3 días.



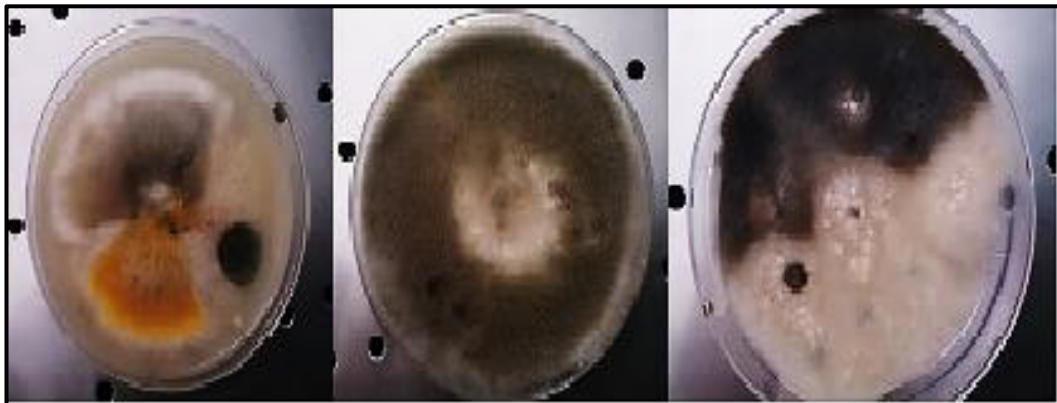
Fuente: Soria Alex

Ilustración 21. Muestras de *B. fabae* L. a los 5 a 7 días.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 22. *B. fabae* L. a los 9 a 11 días.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 23. *B. fabae* L. a los 15 días.



Fuente: Soria Alex

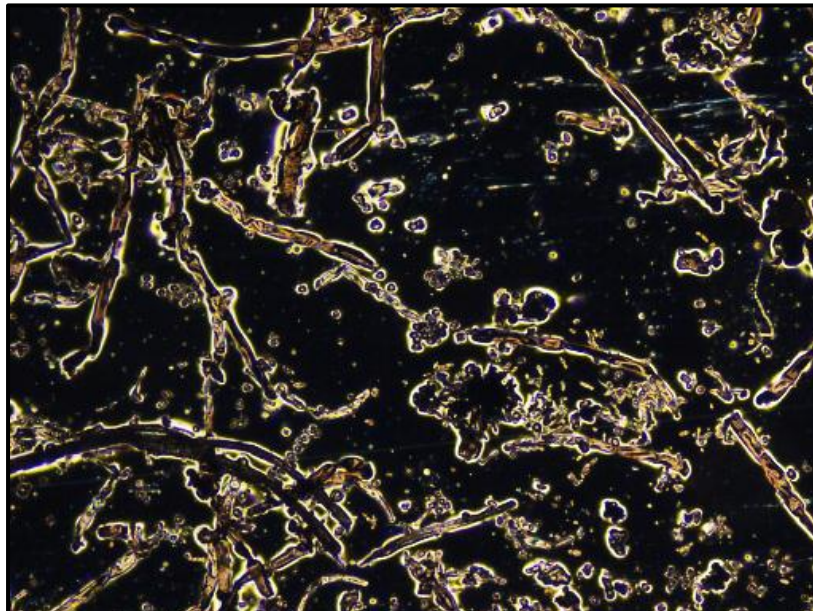
ANEXO 6. Micro estructuras.

Ilustración 24. Observación en el microscopio de las micro estructuras de *B fabae* L. Y registro de las mismas.



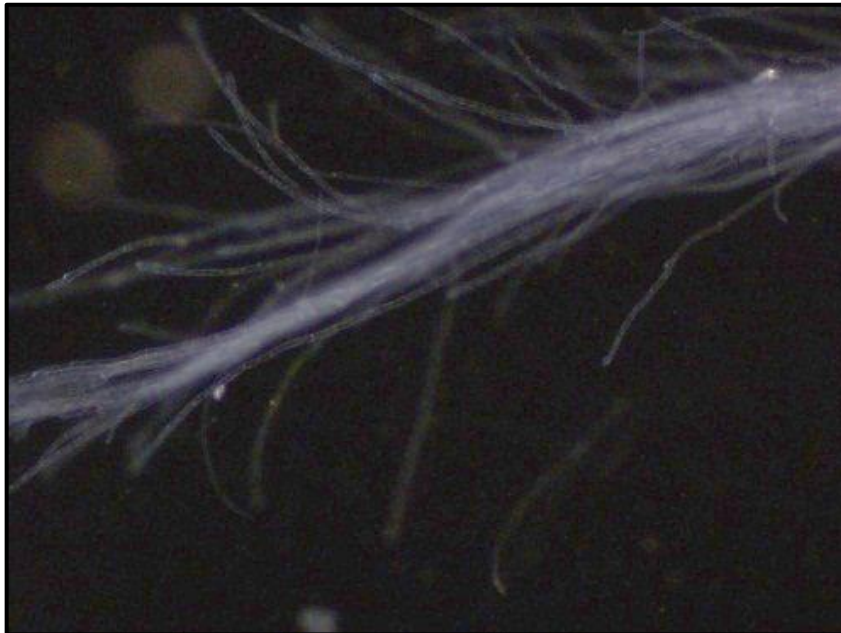
Fuente: Soria Alex

Ilustración 25. *B fabae* L. muestra tomada directamente de la planta enferma observada con el lente de 4x.



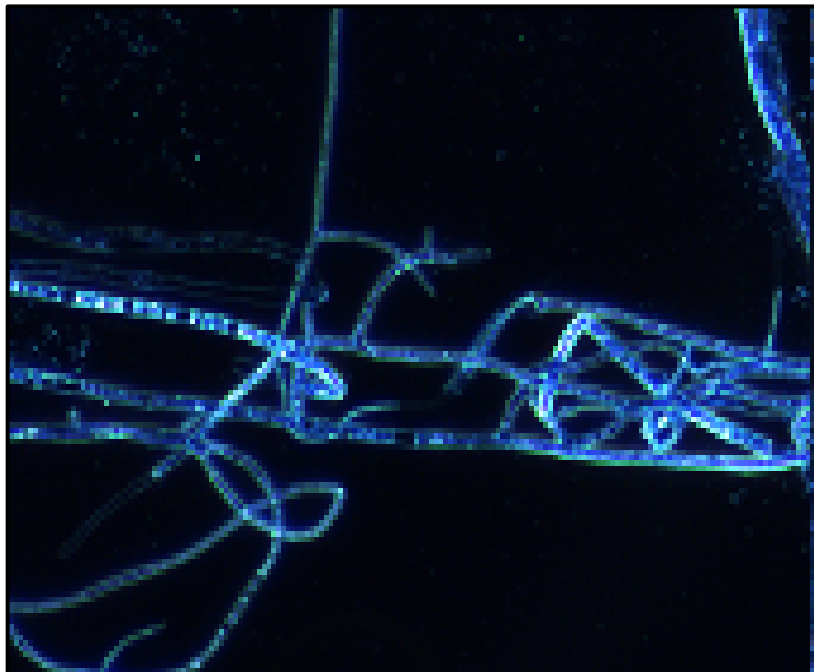
Fuente: Soria Alex

Ilustración 26. Desarrollo del micelio tercer día, observado con el lente de 10x.



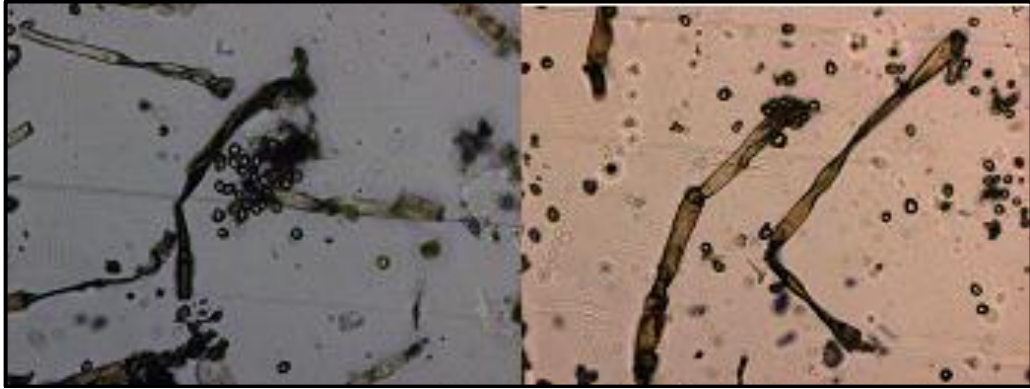
Fuente: Soria Alex

Ilustración 27. Desarrollo del micelio a los 5 días observado con el lente de 20x.



Fuente: Soria Alex

Ilustración 28. Esporulación a partir del noveno día, observado con el lente de 10x.



Fuente: Soria Alex

ANEXO 7. Costos

COSTOS

DESCRIPCION	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