

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN
EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*) EN EL SECTOR
PANYATUG, CANTÓN PANGUA, COTOPAXI 2015.

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

AUTOR: Néstor Alfonso Vizuete Guato

DIRECTORA DE TESIS: Ing. Mg. Guadalupe López

Cotopaxi – Ecuador

2015

AUTORÍA

Yo, NÉSTOR ALFONSO VIZUETE GUATO, portador de la cédula ciudadanía N° 171990790-7, libre y voluntariamente declaro que la tesis titulada: “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*) EN EL SECTOR PANYATUG, CANTÓN PANGUA, COTOPAXI 2015”.

Es original, autentica y personal.

En la virtud declaro que el contenido será de mi sola responsabilidad legal y académica.

Sr. Néstor Alfonso Vizúete Guato

C.I. 171990790-7

AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS

Cumpliendo 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 de tema de tesis: **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*) EN EL SECTOR PANYATUG, CANTÓN PANGUA, COTOPAXI 2015”**. Debo confirmar que el presente trabajo de investigación fue desarrollado de acuerdo con el planteamiento requerido.

En virtud ante lo expuesto considero que se encuentra habilitada para presentar al acto de defensa de Tesis la cual se encuentra abierta para posteriores investigaciones.

Ing.Mg. Guadalupe López

Directora de tesis

AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL

En calidad de miembros de Tribunal de la Tesis Titulada: **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE FREJOL FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*) EN EL SECTOR PANYATUG, CANTÓN PANGUA, COTOPAXI 2015** De Autoría Del Egresado Néstor Alfonso Vizúete Guato CERTIFICAMOS que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones al presente documento.

Aprobado por:

Ing. Mg. Guadalupe López
DIRECTORA DE TESIS

Ing. Agr. Jorge Kaslin
PRESIDENTA

Ing. Mg. Emerson Jácome
OPOSITOR

Ing. Agr. Santiago Jiménez
MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Universidad
Técnica de
Cotopaxi



Centro
Cultural de
Idiomas

CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS

AVAL DE TRADUCCIÓN

En calidad de docente del idioma de Inglés de la Universidad de Cotopaxi: en forma legal CERTIFICO que la traducción del resumen de tesis al Idioma del Inglés presentando por la señor Egresado de la Carrera de Ing. Agronómica de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales: NESTOR ALFONSO VIZUETE GUATO. Cuyo título versa **CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE HONGOS FITOPATOGENOS EN EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*) EN EL SECTOR PANYATUG CANTÓN PANGUA -COTOPAXI 2015**, lo realizo bajo mi supervisión y cumple con una correcta estructura gramatical del idioma.

Es cuanto puedo certificar en honor a la verdad y autorizo al peticionario hacer el uso del presente certificado de manera ética que estimaren conveniente

Latacunga, Enero,2016

Atentamente

.....

Wilmer Collaguazo

C.I: :172241757-1

DOCENTE DEL CENTRO CULTURAL DE IDIOMAS UTC.

AGRADECIMIENTO

Mi agradecimiento especial a Dios por haberme dado este regalo de vida y por su amor y sabiduría en desarrollo de mi tesis.

Agradezco a mis padres por los valores inculcados, y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el transcurso de mi vida y sobre todo por el excelente ejemplo de vida a seguir.

Agradezco a mis hermanos que siempre han estado a mi lado con su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

Le agradezco la confianza, puesta en mí a la Ing. Mg. Guadalupe López Directora de Tesis por su invaluable dirección en el desarrollo de este trabajo de investigación por compartir sus conocimientos.

A mis amigos que colaboraron y confiaron en mí para culminar este trabajo de investigación.

Muchas Gracias...

NESTOR VIZUETE .G

DEDICATORIA

Va dedicada a mi Dios, quien supo guiarme por el buen camino, dándome fuerzas para seguir adelante y atravesar los problemas que se presentaban, sin desfallecer en el intento.

A mi padres especialmente que con su apoyo, comprensión y amor me ayudo en los momentos difíciles, y por apoyarme con los recursos necesarios para estudiar. Me han brindado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño y perseverancia para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar en el transcurso de esta etapa universitaria. A mis amigos quien me ha brindado motivación para la culminación de mis metas.

Muchas Gracias...

NESTOR VIZUETE .G

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimiento.....	VI
Dedicatoria.....	VII
Índice de Contenidos.....	VIII
Índice de Tablas.....	X
Índice de Imágenes.....	XI
Resumen.....	VII
Abstract.....	VIII
Introducción.....	1
Justificación.....	2
Objetivos.....	3
Pregunta directriz.....	4
1 Fundamento Teórico.....	5
1.1 El Cultivo de fréjol.....	5
1.2 Clasificación Botánica.....	6
1.3 Enfermedades en el cultivo de fréjol.....	7
1.3.1 Antracnosis (<i>Colletotricum lindemuthianum</i>).....	7
1.3.1.1 Signos y síntomas.....	7
1.3.1.3 Etimología.....	9
1.4 Hongos fitopatógeno.....	10
1.4.1 Características generales.....	10
1.4.2 Estructuras somáticas.....	10
1.4.3 Hongos como patógenos en las plantas.....	11
1.4.4 Inducción al desarrollo miceliar.....	11
1.4.5 Lavado de tejidos afectado.....	12
1.4.6 Identificación de hongos.....	13
1.5 Signos y síntomas de hongos patógenos en la planta.....	13
1.5.1 Calidad de la muestra.....	16
1.5.2 Recomendaciones para toma de muestras - sanidad vegetal.....	16
1.6 Pasos para el aislamiento de patógenos.....	16
1.6.1 Métodos de aislamiento.....	17

1.6.2 Aislamiento de hongos.....	17
1.6.3 Aspectos a contar en el estudio de los hongos en laboratorio.....	18
1.6.4 Medios de cultivos usados en el aislamiento de hongo.....	18
1.7 Hongos inferiores y pseudohongos.....	19
1.7.1 Hongos superiores.....	19
2. diseño de la investigación	21
2.1 Materiales.....	21
2.1.1 Recursos humanos.....	21
2.1.2 Materiales de campo.....	21
2.1.3 Recursos tecnológicos.....	22
2.1.4 Material de laboratorio.....	22
2.1.5 Reactivos.....	23
2.2 Ubicación del ensayo.....	23
2.3 Características del lugar.....	24
2.4 Diseño metodológico.....	24
2.4.1 Investigación descriptiva.....	24
2.5 Método.....	25
2.6 Técnicas.....	26
2.7 Metodología.....	26
2.8 Preparación para la toma de muestras laboratorio.....	27
2.8.1 Preparación de medio de cultivo.....	28
2.8.2 Aislamiento.....	30
2.8.3 Purificación.....	30
2.8.4 Inoculación.....	30
2.8.5 Incubación.....	31
2.8.6 Identificación.....	31
2.8.7 Descripción.....	32

3. Resultados y discusión.....	33
3.1 Observación en campo	33
3.1.1 Hongo fitopatógeno de mayores pérdidas económicas en el cultivo...33	
3.2 Identificación de signos y síntomas.....	34
3.3 Macro y microestructuras de los hongos.....	37
3.4 Ciclo de vida de (<i>Colletotricum lindemuthianum</i>).....	45
3.4.1 Descripción del ciclo de vida del patógeno.....	45
Conclusiones.....	46
Recomendaciones.....	48
Glosario.....	49
Referencias Bibliográficas.....	51
Anexos.....	52

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1 Clasificación taxonómica del fréjol.....	6
CUADRO 2 Clasificación taxonómica (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>).....	9
CUADRO 3 Coordenadas geográficas de lugar.....	23
CUADRO 4 Coordenadas geográficas laboratorio.....	23
CUADRO 5 Condiciones climáticas.....	24
CUADRO 6 Aspectos físicos.....	24
CUADRO 7 Límites.....	27
CUADRO 8 Análisis Edo climáticas.....	27
CUADRO 9 Operacionalización de las variables.....	37

ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN N°1 Signos y síntomas (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>).....	34
IMAGEN N°2 Signos y síntomas (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>).....	35
IMAGEN N°3 Signos y síntomas (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>).....	35
IMAGEN N°4 Signos y síntomas (<i>Colletotrichum lidemuthianum</i>).....	35
IMAGEN N°5 Signos y síntomas (<i>Colletotrichum lidemuthianum</i>).....	36
IMAGEN N°6 Reproducción en laboratorio (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)...	38
IMAGEN N°7 Reproducción en laboratorio (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)...	39
.....	
IMAGEN N°8 Reproducción en laboratorio (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)...	40
.....	
IMAGEN N° 9 Reproducción en laboratorio (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)...	41
.....	
IMAGEN N°10Reproducción en laboratorio (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)....	42
.....	
IMAGEN N°11Reproducción en laboratorio (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)...	43
.....	
IMAGEN N°12 Reproducción en laboratorio (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)...	44
.....	

RESUMEN

La presente investigación “CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS DE FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*)” se realizó en el Sector Panyatug, Cantón Pangua, Provincia de Cotopaxi localizada a N 1°12'0”S 79°6'0” a 1800 msnm, con un T° de 18°C y una Hr del 12 % con el objetivo de caracterizar morfológicamente al hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*). Mediante la identificación de los signos y síntomas en campo. Para caracterizar su macro y microestructuras e describir el ciclo de vida en condiciones de laboratorio y elaborar una guía didáctica del hongo en estudio. Para el desarrollo de esta investigación se visitó el lugar donde se tomó muestras de hojas y vainas infectadas con características similares posteriormente se etiqueto y se transportó al laboratorio. Dentro del laboratorio para su reproducción se realizó lo siguiente: se elaboró el agar en un lapso de 3 horas, se tomó 3mm de tejido enfermo se desinfecto con una solución de 2.1 de clorox luego se inoculo en el medio de cultivo y se selló con papel para film. Para su incubación se requirió una T° de 21°C con una Hr del 70% con su característica estructural que son: micelio aéreo algodonoso de color blanquecino y en su etapa final se tornó a un color café. Las microestructurasson: hifas septadas, hialinas y ramificadas de manera irregular de 15 µm, conidióforos rectos 20 µm, conidios de 1.8 µm de forma elipsoidales redondeadas o ligeramente ahusadas y ápices cónicos, ligeramente puntiagudos, hialinos unicelulares esto se dio a los 5 días de haber realizado la investigación. Luego de los resultados obtenidos se elaboró un guía didáctica para precedente que impulsen en futuras investigaciones.

ABSTRACT

This research "MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI INTO BEAN CROPS (*PHASEOLUS VULGARIS*) AT PANYATUG SECTOR, PANGUA CANTON IN COTOPAXI PROVINCE 2015" was held at Panyatug Sector, Pangua Canton, Cotopaxi Province located N 1 ° 12'0 "S 79 ° 6'0" to 1800 m with a T ° of 18 ° C and 12% RH in order to characterize morphologically the phytopathogenic OF fungus greatest impact on bean crop (*Phaseolus vulgaris*) by identifying the signs and symptoms in the field. To characterize the macro and microstructures and describe the life cycles on laboratory conditions and develop a teaching guide of the fungus on the study. For the development of this research, the researcher visited the place where samples of infected leaves and pods are made with similar characteristics; later, it was labeled and transported to the laboratory. At the laboratory to its reproduction the following is performed: agar is prepared in a period of 3 hours, was taken 3mm diseased tissue and it was disinfected with a solution of 2.1 Clorox; then, it was inoculated into the culture and it was sealed with paper parafilm. For, incubation it was required a T ° of 21 ° C with 70% RH with its structural feature which are: cottony-white aerial mycelium and in its final stage it turned to a brown color. The microstructures are: hyaline and branched "septadas" hyphae irregularly of 15 microns, straight conidiophores 20 microns, conidia of 1.8 microns in shapes: ellipsoidal, rounded or slightly tapered, conical apex slightly pointed, unicellular hyaline; this occurred after 5 days when the research was done. After the results obtained, the researcher did an educational guide to precedent that encourages further research that was developed.

INTRODUCCIÓN

El fréjol constituye un importante rubro en la economía de los agricultores, como para la sostenibilidad alimentaria en América Latina y particularmente en Ecuador. El patógeno que más afectan la productividad de las plantaciones y aumentan los costos de producción. Es (*Colletotrichum lindemuthianum*).

En el Ecuador en las zonas productoras de fréjol, la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*,) ocasiona pérdidas en rendimientos que oscilan entre 38 y 95%. Permitiendo una pérdida de cada 10 toneladas sembradas se pierde 7 toneladas y cuando la enfermedad no es controlada a tiempo se estima una pérdida casi de 100% del cultivar.

El hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) causa la antracnosis del fréjol, una enfermedad muy grave para el productor del fréjol. Temperaturas entre 13 y 25 °C y una humedad relativa alta favorecen la enfermedad, la cual puede ser devastadora y causar la pérdida completa de la producción de grano en las variedades susceptibles aísala de los tejidos vegetales que presenten síntomas típicos de la enfermedad, principalmente del tallo, de las hojas de las vainas. En las hojas, las lesiones siguen las nervaduras y son muy visibles en el envés

JUSTIFICACIÓN

La presente investigación se realiza en el cultivo de fréjol, en el Ecuador representa el 38% del área total, cultivado en todo el país, ya que es un producto indispensable para la alimentación humana, y parte de los procesos agroindustriales caracterizado, por la practica en casi todas las regiones del país.

La presencia de este hongo fitopatógeno puede ocasionar una pérdida del 90 % de productividad, motivo por el cual se propone la siguiente investigación , que pretende brindar una base de información que servirá al agricultor para tomar decisiones oportunas y tener una guía para el control de enfermedades producidas por hongo fitopatógeno, mediante el reconocimiento de los signos, síntomas y el ciclo de vida lo cual permitirá reducir los costos e incrementar la producción, elaborando una guía didáctica para un mejor conocimiento del patógeno lo cual coadyuvara a un adecuado conocimiento de la enfermedad para obtener un producto de mejor calidad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno la producción en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*), en el Sector Panyatug, Cantón Pangua - Cotopaxi. 2015

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo del fréjol (*Phaseolus vulgaris*)
- Identificar signos y síntomas del hongo fitopatógeno del fréjol (*Phaseolus vulgaris*) 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 sus macro, micro estructuras y ciclo de vida del hongo fitopatógeno (*Colletotrichum lindemuthianum*) en condiciones del laboratorio?

CAPÍTULO I

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. EL CULTIVO DE FRÉJOL

Los estudios arqueológicos indican que el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), es originario del continente americano. Se han encontrado evidencias, con antigüedad de 5000 a 8000 años, en algunas regiones de México, Estados Unidos y Perú. Existe un acuerdo relativo que indica a México como su lugar de origen, que también se disputa el Perú, por encontrarse allí prototipos de las especies silvestres de los cinco grupos de fréjoles más cultivados. (INFOAGRO, 2008)

Hay evidencias que señalan que en toda Mesoamérica se sembraban los cultivos de fréjol, maíz, calabaza y ají, que constituyeron la principal fuente alimenticia de las culturas que habitaron esta región, desde hace más de 8.000 años. (INFOAGRO, 2008)

Se dice que al principio del siglo XVI, fueron los españoles quienes llevaron a Europa las primeras semillas de fréjol. Años después los portugueses lo difundieron en varios países africanos. (INFOAGRO, 2008)

El fréjol, es la especie más importante para el consumo humano. Se cultiva prácticamente en todo el mundo, en 129 países de los cinco continentes, se reporta la producción de fréjol, esta leguminosa ha sido de suma importancia en la alimentación mundial, ya que en la mayoría de los países es cultivada y se ha llegado a obtener buenas producciones. (INFOAGRO, 2008)

En el Ecuador en el 2010 se produjo 39,725 t/año, es decir el 0.2% de la producción mundial (SICA, 2010), Además de ser considerado un producto básico y de exportación, constituye una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. (INFOAGRO, 2008)

1.2 Clasificación Botánica

Es una Planta dicotiledónea anual. Pertenece a la familia de las leguminosas, muy apreciada por el alto valor nutricional de su semilla. (INFOAGRO, 2008)

CUADRO 1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL FRÉJOL

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Subclase:	<i>Rosidae</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia:	<i>Faboideae</i>
Tribu:	<i>Phaseoleae</i>
Subtribu:	<i>Phaseolinae</i>
Género:	<i>Phaseolus</i>
Sección:	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>P. vulgaris</i>

FUENTE: (INFOAGRO, 2008)

1.3 ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DE FRÉJOL

Las enfermedades del fréjol son más importantes que las plagas, causando serias pérdidas en temporadas especialmente en aquellos lluviosas, cuando hacen inviernos muy “crudos”; favoreciendo la dispersión y ataque de los diferentes hongos fitopatógenos. (ARAUJO, 2009)

1.3.1 Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*)

La antracnosis causada por el hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) es probablemente la enfermedad del fréjol común de mayor importancia económica a nivel mundial. Se puede decir que este es el problema de hongos patógenos más crítico que afecta la producción de esta leguminosa.

En algunos países la antracnosis es endémica en las zonas productoras de fréjol ubicadas en clima medio y frío moderado, donde ocasiona pérdidas en rendimientos que oscilan entre 38 y 95%.

1.3.1.1 Signos y síntomas

Los primeros síntomas de la enfermedad se pueden observar en plántulas muy pequeñas en su desarrollo. En el envés de las hojas primarias, las nervaduras muestran lesiones de color café oscuro. Esta enfermedad puede afectar cualquier parte de la planta. Los síntomas de la antracnosis ocurren en todas las partes aéreas de la planta, menos en la flor. Cuando se siembra semilla infectada, los primeros síntomas generalmente se observan en los cotiledones como pequeñas lesiones de color café oscuro a negro. Estas pueden aumentar en tamaño convirtiéndose en pequeños chancros deprimidos en los que muchas veces el hongo produce esporulación. (PERALTA, 2013)

En el hipocotilo los síntomas iniciales se presentan como manchas longitudinales y después como lesiones ovaladas y deprimidas. En el follaje los síntomas inicialmente aparecen en el envés de las hojas como lesiones pequeñas de color púrpura oscuro a rojo ladrillo, localizadas a lo largo de las nervaduras. (PERALTA, 2013)

Cuando la enfermedad es severa, se forman manchas necróticas en los tejidos adyacentes a las nervaduras y eventualmente las lesiones se notan también en el haz de las hojas. Las lesiones similares, pero más ovaladas, deprimidas y de coloración más oscura, ocurre en los peciolo, en las ramas, en los tallos y aun en los meristemas apicales. Cuando los síntomas son muy severos, las hojas se muestran un poco retorcidas y la planta parece de menor tamaño, con apariencia raquítica, como si estuviera afectada por un virus. En el hipocotilo ocurren también chancros profundos que hacen que la planta se quiebre en el sitio de la lesión. (PERALTA, 2013)

Los síntomas de la antracnosis en las vainas son muy definidos y fáciles de reconocer. Inicialmente se notan como pequeñas manchas o lesiones redondas de color rojo-púrpura. Estas aumentan en tamaño y profundidad paulatinamente llegando a ser chancros de forma circular y profundos, redondeados de un borde púrpura oscuro, el cual, muchas veces está rodeado de un borde rojo ladrillo. Bajo condiciones de la enfermedad, el patógeno produce en el centro del chancro abundante esporulación que se manifiesta como masas gelatinosas de esporas de color rosado-amarillento. Con el tiempo las masas de esporas se secan, apareciendo como gránulos de color café oscuro o negro. Cuando la infección es severa, las vainas jóvenes se deforman por las lesiones y produce poca semilla o no la produce. La semilla infectada puede ser de menor tamaño mostrar manchas que generalmente son pequeñas, semi-redondas y oscuras. En algunos casos, estas lesiones también llegan a tener apariencia de chancro. (PERALTA, 2013)

1.3.1.2 Epidemiología

Es muy frecuente en localidades con climas frescos a fríos y alta humedad relativa mayor de 92%. Es favorecido por temperatura entre 13 y 26 °C, con una óptima alrededor 17-18°C, y lluvias moderadas a intervalos frecuentes, las lluvias acompañadas de vientos son muy importantes para la diseminación de las esporas del patógeno a corta distancia, de una planta a otra o de un surco a otro. La antracnosis es frecuente en localidades con elevaciones superiores a 1000 msnm. Rara vez ocurre en lugares con clima seco y caliente. La semilla infectada es el medio más común de diseminación del patógeno. (PERALTA, 2013)

El hongo presenta una alta variabilidad genética, lo cual se manifiesta en la existencia de muchas razas fisiológicas del patógeno, las cuales difieren en su grado de patogenicidad. La semilla y los residuos de cosecha infectados son las fuentes principales de inóculo para causar epidemias. El hongo puede sobrevivir como micelio dentro de la testa de la semilla y como esporas entre los dos cotiledones. En residuos de cosecha puede sobrevivir hasta por dos años. (PERALTA, 2013)

CUADRO 2 taxonomía del hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*)

REINO	<u>Fungi</u>
FILO	<u>Ascomycota</u>
CLASE	<u>Sordariomycetes</u>
ORDEN	<u>Phyllachorales</u>
FAMILIA	<u>Phyllachoraceae</u>
GENERO	<u><i>Colletotrichum</i></u>
ESPECIE	<i>C.lindemuthianum</i>

FUENTE: (PERALTA, 2013)

1.4 Hongos fitopatógenos

Manifiesta que los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos eucarióticos, esporógenos, sin clorofila. Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que tienen quitina, celulosa, o ambos componentes. (HERRERA, 1994)

1.4.1 Características generales

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

1.4.2 Estructuras somáticas

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

1.4.3 Hongos como patógenos en las plantas

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

1.4.4 Inducción al desarrollo miceliar

Utilizar un trozo del hospedante para inducir al desarrollo miceliar aquellos hongos biótrofos para que el hongo crezca y esporule sobre medios de cultivos recomendables para hongos que esporule poco en el tejido, tales como hongos de la raíz. (AGRIOS, 2007)

Este método es el más usado cuando se quiere tener a un hongo en cultivo puro.

- Lavar el material enfermo con agua corriente y secar.
- Seleccionar el tejido vegetal afectado procurando que los trocitos queden de 0.3 a 0.5 cm de longitud.
- Enjuagar los trocitos en 3 pasos de agua destilada y secarlos perfectamente, al secar bien, disminuyen las contaminaciones pasar 4 a 5 secciones a una caja Petri con PDA, sellar la caja con cinta adhesiva e incube de 20 a 25°C.

1.4.5 Lavado de tejidos afectados.

Partes subterráneas: deben lavarse bajo agua corriente, con la ayuda de un cepillo suave. Para casos difíciles como de algunos ficomicetos patógenos sensibles a desinfectantes, se alarga el proceso de lavado para eliminar el uso de desinfectantes. Se colocan porciones de las raíces lavadas en un frasco tapado con una malla o gasa y se deja caer un chorro de agua sobre este durante dos o más horas. (FRENCH & HEBERT, 1980)

Partes aéreas: los órganos aéreos son generalmente difíciles de mojar. Una sumersión instantánea en alcohol etílico 70% antes de introducir en agua o el uso de detergente líquido como “Tween” (unas 2-3 gotas por litro) generalmente resuelve el problema. Los tejidos aparentemente limpios no necesitan lavado, excepto el que se hace durante la desinfección. (FRENCH & HEBERT, 1980)

1.4.6 Identificación de hongos.

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

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

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

1.5 Signos y síntomas de hongos patógenos en la planta.

Los síntomas que producen los hongos en sus hospedantes son de tipo local o general y pueden aparecer por separado en hospedantes distintos, en un mismo hospedante aparecer uno después de otro. En general, los hongos producen una necrosis local o general o la muerte de los tejidos vegetales que infectan, hipertrofia e hipoplasia

o atrofia de plantas completas o de sus órganos, e hiperplasia o crecimiento excesivo de ellas o de algunos de sus órganos. (AGRIOS, 1999)

Según (AGRIOS, 1999) los síntomas necróticos más comunes son los siguientes:

- Ahogamiento o secadera: Muerte rápida y colapso de plántulas muy jóvenes que se cultivan en el campo o en el almácigo.
- Antracnosis: Lesión necrótica que se asemeja a una úlcera profunda y que se produce en el tallo, hojas, frutos o flores de las plantas hospedantes.
- Cancro: Herida localizada o lesión necrótica; con frecuencia sumida bajo la superficie del tallo de una planta leñosa.
- Decaimiento: Crecimiento deficiente de las plantas; las hojas son pequeñas, quebradizas, amarillentas o de color rojo; las plantas muestran cierto grado de defoliación y muerte descendente.
- Manchas foliares: Lesiones localizadas en las hojas de los hospedantes que constan de células muertas y colapsadas.
- Muerte descendente: Necrosis generalizada de las ramitas de las plantas que se inicia en sus puntas y avanza hacia su base.
- Pudrición basal del tallo: Desintegración de la parte inferior del tallo.
- Pudrición de la raíz: Pudrición o desintegración de todo el sistema radical de una planta o parte de él.
- Pudriciones blandas y pudriciones secas: Maceración y desintegración de frutos, raíces, bulbos, tubérculos y hojas carnosas de las plantas.
- Sarna: Lesiones que se producen sobre el fruto, hojas, tubérculos y otros órganos de las plantas hospedantes, por lo común ligeramente realizadas o bien profundas y agrietadas, lo cual les da una apariencia costrosa.
- Tizón: Coloración café general y extremadamente rápida de las hojas, ramas, ramitas y órganos florales de una planta, que dan como resultado la muerte de estos órganos.

(AGRIOS, 1999) también manifiesta que los síntomas que se asocian a la hipertrofia o hiperplasia y distorsión de los órganos de las plantas incluyen:

- Agallas: Porciones alargadas de las plantas que por lo común están llenas del micelio del hongo.
- Enchinamiento foliar: Deformación, engrosamiento y enchinamiento de las hojas.
- Hernia de las raíces: Raíces alargadas en forma de huso o mazo.
- Verrugas: Protuberancias en forma de verruga que se forman sobre los tubérculos y los tallos.

Además. (AGRIOS, 1999 indica que de los síntomas que ya se han mencionado, pueden añadirse otros grupos de síntomas:

- Marchitamiento: Por lo común, es un síntoma secundario generalizado en el que las hojas o los retoños de las plantas pierden su turgencia y se cuelgan debido a las alteraciones que sufre el sistema vascular de la raíz o del tallo.
- Mildiu: Zonas necróticas o cloróticas que aparecen sobre las hojas, tallo y frutos de una planta y que por lo común se cubren con el micelio y los cuerpos fructíferos del hongo.

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

Por ejemplo, en los mildius, lo que se observa con mayor frecuencia son los signos representados por las esporas y el crecimiento veloso y blancuzco del micelio del hongo sobre las hojas, frutos o tallos de la planta. (AGRIOS, 1999)

1.5.1 Calidad de la muestra

Este aspecto es de suma importancia puesto que con frecuencia las muestras tomadas no llegan al lugar de destino con la calidad requerida para poder realizar una labor investigativa eficiente. Al tomar la muestra de la planta enferma no se deben seleccionar las partes u órganos que manifiestan estado avanzado de desarrollo de la enfermedad tales como: tubérculos en estado avanzado de descomposición o ramas totalmente necrosadas, sino aquellas partes que manifiesten un proceso de desarrollo intermedio de la enfermedad, en las que el agente parasitario permanece activo y su observación se facilita. Igualmente, en casos de avanzado desarrollo de los síntomas, la presencia de organismos secundarios entorpece gravemente el proceso de diagnóstico. (HERRERA, 1994)

1.5.2 Recomendaciones para toma de muestras - sanidad vegetal

La muestra debe recogerse en bolsas de plástico limpias, debidamente codificadas y manteniendo la boca de la bolsa abierta para evitar putrefacciones si la muestra debe ser enviada por correo, se envolverá en papel de periódico para absorber la humedad de la misma. Si la muestra es de semillas, podrán recogerse en bolsas de plástico, botes de cristal o sobres de papel limpios, con su correspondiente código de identificación. (INIAP, 2009)

1.6 Métodos de aislamiento

Para lograr el aislamiento del agente causal de una determinada sintomatología o enfermedad, en primer lugar, se debe establecer la causa que originó dichos trastornos, es decir permite llegar a diagnosticar la naturaleza del agente causal. No obstante, es

muy común cuando se utilizan técnicas o métodos para el aislamiento del agente causal, que más de un organismo sea obtenido. (HERRERA, 1994)

Las técnicas y métodos de laboratorio empleados para el diagnóstico de microorganismos fitopatógenos requieren personal calificado, equipos e instrumentos de precisión, reactivos y cristalería variada, así como una alta laboriosidad. El procedimiento a seguir está determinado en gran medida por la naturaleza del posible agente causal. (HERRERA, 1994)

1.6.1 Aislamiento de hongos

El aislamiento de los hongos fitopatógenos se puede realizar frecuentemente con cierta facilidad, ya que sobre el tejido enfermo de una planta suelen encontrarse solamente las estructuras de los organismos causantes, sin la presencia de otros microorganismos contaminantes. Sin embargo en la mayoría de los casos se requiere de métodos específicos de aislamiento, los cuales dependen principalmente de la naturaleza del hongo en cuestión del sustrato o planta hospedante en que se desarrolló. Tal es el caso de la mayoría de los hongos fitopatógenos del suelo. Un caso particular de esta naturaleza son los hongos de la clase Ascomycetes que raramente producen sus cuerpos fructíferos sobre medios artificiales. El aislamiento de los hongos productores de micelio aéreo esporógeno resulta exitoso simplemente transfiriendo directamente el micelio o masas de esporas formadas sobre el tejido de la planta, sobre un medio determinado. Cuando el crecimiento del micelio o la formación de esporas no es apreciable sobre el tejido de la planta hospedante se emplea la técnica conocida como cámara húmeda, que consiste en tomar porciones o pedazos de dicho tejido, lavarlo bajo un chorro de agua corriente durante 10 o 15 minutos para remover de la superficie las esporas de otros hongos saprofitos y colocarlos luego sobre papel de filtro humedecido dentro de placas de Petri e incubar dentro de varias horas a temperatura entre 26 y 30 °C. Para el aislamiento de hongos presentes en el interior de la planta (haces vasculares, frutos, tubérculos, etc.) debe procederse a la desinfección externa con los productos antes descritos, cortar el tejido con un bisturí o escalpelo estéril y extraer porciones afectadas y colocarlas o sembrarlas en un medio apropiado que favorezca el crecimiento de las estructuras vegetativas o reproductoras. El ajuste del pH en los medios empleados

para el aislamiento debe garantizar valores bajos (alrededor de 5.5) que impidan el crecimiento de bacterias. (HERRERA, 1994)

1.6.2 Aspectos a contar en el estudio de los hongos en laboratorio

Los hongos son capaces de crecer en cualquier medio de cultivo, sin embargo para evitar su contaminación por bacterias, los medios de cultivo deben presentar altas concentraciones de soluto y bajo pH. (HERRERA, 1994)

1.6.3 Medios de cultivos usados en el aislamiento de hongos

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

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

Este medio de cultivo se puede preparar con papas naturales o con el producto comercial deshidratado. Para preparar este medio de cultivo es a partir de papas naturales se procede de la siguiente manera se lavan de 200 a 300 gramos de papas no es necesarios pelarlas, rebanarlas y hervirlas hasta que estén suaves y exprimirlas a través de tres capas de materia delgada. Reciba el filtrado en un matraz añada 20 gr de dextrosa y 20 gr de agar afore a un litro. Esterilice los medios 20 minutos a 15 libras de presión. Cuando el medio este casi frío (40°C) viértalo en las cajas Petri los conidios formados en PDA no son consistentes en tamaño y forma además de que son menos confiables para utilizarse con fines de investigación. (CIAMPI, 2002)

1.7 Estructuras reproductivas.

1.7.1 Hongos inferiores y pseudohongos

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

- 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. (HERRERA,1994)
- Clase: Zigomycetes: Esta clase de hongos produce esporas asexuales no móviles contenidas en cuerpos fructíferos denominados esporangios. Sexualmente producen esporas denominadas zigosporas. (HERRERA,1994)

1.7.2 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. (HERRERA,1994)
- Estructuras representativas de la clase Basidiomycetes: La clase basidiomycetes se caracteriza por tener micelio tabicado y reproducirse sexualmente mediante la producción de basidiosporas. (HERRERA,1994)

- 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. aún. Estos hongos se reproducen de forma asexual formando esporas denominadas conidios. Estos conidios pueden producirse en forma libre o dentro de cuerpos fructíferos. (HERRERA,1994)

CAPÍTULO II

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Materiales

2.1.1 Recursos humanos

Universidad Técnica de Cotopaxi

Unidad Académica Caren

Carrera de Ing. Agronómica

Laboratorio de Microbiología

Autor: Néstor Alfonso Vizúete Guato

Director de tesis: Ing. Mg. Guadalupe López

Miembros del tribunal:

Ing. Jorge Kaslin

Ing. Agr. Santiago Jiménez

Ing. Agr. Emerson Jácome

2.1.1 Materiales De Campo

- Muestra de hoja de fréjol (*Pasheolus vulgaris*)
- Muestra de vaina de fréjol (*Pasheolus vulgaris*)
- Tijeras
- Fundas de papel
- Fundas de plástico
- Bisturí
- Cámara
- GPS

2.1.2 RECURSOS TECNOLOGICOS

EQUIPOS:

- Cámara de crecimiento o incubadora
- Balanza de precisión
- Estufa de 2 quemadores
- Estereoscopio
- Refrigeradora
- Cámara de flujo laminar
- Autoclave
- Cuenta colonias
- Microondas
- Desecador con mallas

2.1.3 MATERIAL DE LABORATORIO

- Micro tubos
- Goteros de plástico
- Papel aluminio
- Pizeta
- Aguja de disección
- Asa de siembra
- Reposeros plásticos con tapa
- Cajas Petri
- Tarrinas de ½ lt trasparente
- Tanque de gas
- Cinta adhesiva transparente de 1,5 cm de ancho
- Papel absorbente
- Parafilm de laboratorio
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Algodón
- Pinzas
- Bisturi
- Tijeras con punta
- Vaso de precipitación de 50-100-500-1000 ml
- Erlenmeyer de 500-1000 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml

2.1.4 REACTIVOS

- Agua destilada
- Dextrosa o sacarosa
- Agar
- Alcohol antisépticos

2.2 UBICACIÓN DEL ENSAYO EN CAMPO

La presente investigación se realizó Panyatug Cantón Pangua el mismo que se encuentra ubicado al Norte con la provincia de Bolívar, al Sur Ramón Campaña, al Este La Mana y al Oeste Pinilopata.

CUADRO 3 COORDENADAS GEOGRÁFICAS

Ubicación	ECUADOR
Coordenadas	
Latitud sur	1°12'0"
Longitud oeste	79°6'0"
Altitud	1800msnm

Fuente: El investigador

2.2.1 UBICACIÓN DEL ENSAYO EN LABORATORIO

La investigación en laboratorio se realizó se llevó a cabo en la Provincia de Cotopaxi, Cantón Latacunga, Parroquia La Matriz, Avenida Eloy Alfaro la misma que se encuentra ubicado en la parte norte del Cantón Latacunga.

CUADRO 4 COORDENADAS GEOGRAFICAS DEL LABORATORIO

Ubicación	Ecuador
Coordenadas	56° 56' 00" S 78° 37' 00" W
Altitud	2650 msnm
Temperatura	13°C

Fuente: El investigador

2.3 CARACTERÍSTICAS DEL LUGAR

CUADRO 5 CONDICIONES CLIMÁTICAS

Condiciones edafoclimáticos	
Temperatura anual media (°C)	18°C
Humedad Relativa (%)	12%
Precipitación anual (mm)	529.8

Fuente: GAD municipal de Pangua

CUADRO 6 ASPECTOS FÍSICOS

País	Ecuador
Provincia	Cotopaxi
Capital	Latacunga
Cantón	Pangua
Ubicación	Este del cantón

Fuente: GAD municipal de Pangua

CUADRO 7 LÍMITES

NORTE	Provincia de Bolívar
SUR	Barrio Ramón Campaña
ESTE	La Mana
OESTE	Barrio Pinilopata

Fuente: GAD municipal de Pangua

2.4 DISEÑO METODOLÓGICO

2.4.1 Investigación Descriptiva

Esta investigación se realizó mediante revisiones de materiales bibliográficos ya que se necesita ser descrito sigilosamente para recopilar información de las características morfológicas que presenta el hongo permitiendo identificar al patógeno que causa más pérdidas económicas.

La investigación se direcciono en un diseño no experimental, pues no se realizó la manipulación de ninguna variable, es decir no se cambió la realidad del cultivo de fréjol al contrario lo que se intenta con la investigación es mejorarla, gracias a la Caracterización morfológica de hongo fitopatógeno.

2.5 Método

2.5.1 Métodos lógicos

2.5.1.1 Descriptivo analítico

Utilizamos este método en la investigación para describir el hongo fitopatógeno de mayor pérdida económica mediante la bibliografía consultada y la muestra recogida en el cultivo para analizarla y poder confirmar los signos y síntomas en campo y su morfología (formas y estructuras) en el laboratorio del hongo identificado.

2.5.1.2 Deductivo.

Para el avance de la investigación se empleó este método porque nos permito recopilar la información de las características morfológicas que presenta el patógeno permitiendo identificar al hongo fitopatógeno de mayor pérdida económica en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

2.5.1.3 Comparativo.

Es un procedimiento donde se realizó una búsqueda sistemática de similitudes con el objeto de estudiar su parentesco entre la identificación de los hongos y para encontrar el patógeno de mayor pérdida en el cultivo y con su forma de reproducción.

2.6 TÉCNICAS

Se utilizó la técnica de observación la misma que nos ayudó a identificar al hongo, por la presencia de los signos y síntomas característicos que presentan en el cultivo. Se utilizó un cuaderno de campo para los apuntes indispensables.

Se utilizó la técnica de fichaje lo cual se realizó el levantamiento de la información tanto en selección de la nuestra enferma y la entrevista realizada al agricultor en campo, en laboratorio se analizó con profundidad las características morfológicas que presentan el patógeno.

2.7 METODOLOGIA

2.7.1 Reconocimiento del lugar

Se realizó un viaje al Sector Panyatug perteneciente al Cantón Pangua Provincia de Cotopaxi donde se eligieron las mejores muestras de la parte de la planta afectada por el hongo para el procedimiento en el laboratorio tomando en cuenta el ciclo de vida del patógeno

2.7.2 Diagnóstico del sector escogido

Basándose en el análisis agroclimático del sitio a través de observaciones y con la ayuda de un GPS se determinó lo siguiente.

CUADRO 8 ANÁLISIS AGROCLIMÁTICOS

Altitud	1800 msnm
Temperatura	18 °C
Suelo	Arcilloso
PH	8 alcalino
Humedad relativa	12%
Coordenadas	
Latitud norte	1°12'0"
Longitud sur	79°6'0"

Fuente: directa el investigador

2.7.3 Diagnóstico del cultivo

Se Identificó la planta hospedante y mediante la información otorgada por el productor, se obtuvo el tipo de suelo, fertilización y aplicación de fungicidas. Se observó los signos y síntomas de la enfermedad (antracnosis) como manchas de color café oscuro con bordes de color rojizo, chancros, marchitamiento, y en laboratorio con el microscopio trinocular nos permitió observar la presencia de esporas, cuerpos fructíferos del hongo.

2.7.4 Toma de muestras

El método utilizado en esta actividad es por cuotas, lo cual consistió en un número de individuos que reúnen las características homogéneas para su elección en determinadas condiciones.

2.7.4.1 Procedimientos en la toma de muestras

Se extrajeron plantas afectadas utilizando un bisturí o tijeras 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 en una hielera para evitar la deshidratación de las muestras.

2.7.5 Preparación de los materiales en laboratorio para la propagación del hongo

a) Preparación de medio de cultivo

Materiales:

- 2 vasos de precipitación 100ml
- 1 vaso de precipitación de 1000 ml
- 2 matraz de 500 ml
- 1 varilla de agitación
- Cocina eléctrica
- 1 olla
- 1 cuchillo
- 1 balanza digital
- Tamiz
- 1 cuchara de cocina
- 7 papeles filtro
- Papel aluminio
- Papel absorbente
- 5 cajas Petri
- Papel para film de laboratorio

Reactivos:

- 30 gr. de agar
- 35 gr. de glucosa
- 3,5 gr. de levadura
- 350 gr. de papa
- 955 ml. de agua destilada

Equipos

- Autoclave

b) Metodología de la elaboración del agar papa dextrosa

1. Se peló y se lavó las papas seguidamente se procedió a cortarlas en pedazos pequeño para que se nos facilite el pesaje en la pesa digital hasta obtener los 350 gr.
2. Seguidamente colocamos las papas en la olla con 800 ml, de agua destilada para la cocción que se realizó en la estufa eléctrica.
3. Retiramos de la estufa y procedimos a tamizar el contenido en un vaso de precipitación de 1.000ml, medimos la cantidad de agua que sobro y a esto le añadimos la cantidad que perdió de la cocción la cual fue de 200ml.
4. Seguidamente para diluir la levadura y la glucosa ocupamos 8ml de agua destilada caliente.
5. Colocamos en el vaso de precipitación de 100ml a baño maría y agregamos 30gr de agar y la solución disuelta 80ml de glucosa y levadura.
6. Mezclamos la solución con la varilla de agitación por un tiempo de 2 minutos hasta obtener el resultado deseado.
7. La solución obtenida vertimos en 2 matrices de 500ml equitativamente, procedemos a tapar con algodón y papel absorbente en forma de corcho y le recubrimos con papel aluminio.
8. Colocamos los matrices en la autoclave para su respectiva esterilización con una temperatura de 120 ° C durante 1 hora.
9. Se esperó que se enfrié durante 30 minutos y se procedió a poner la solución en las cajas Petri en una forma equitativa en la base de la misma.

2.7.6 Aislamiento

Se procedió a tomar porciones de tejido enfermo, posteriormente se lavó en agua corriente, luego se los seco a los tejidos con papel absorbente, y por último se desinfecto en una solución 2:1 de cloro, se lavó dos veces con agua destilada estéril y se eliminó excesos de agua, colocamos al interior de una caja Petri estéril que contenga papel filtro esterilizado, este material lavado, desinfectado y seco se coloca en cajas con PDA y/o Jugo v8 agar solidificado. Se incuba a 24°C y se observa durante los siguientes 5 días, para caracterizar al patógeno que se desarrolla durante este tiempo de observación.

2.7.7 Purificación

Se cortó puntas de micelio del borde de la colonia en crecimiento, mediante agujas de disección flameadas. Esta pequeña porción del hongo y agar se depositaron en otras cajas con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtienen cultivos puros.

2.7.8 Inoculación

Se procedió a inocular el hongo fitopatógeno en el medio de cultivo, bajo condiciones controladas de esterilidad y asepsia. Se esterilizaron los materiales a utilizar.

Para este proceso realizamos un raspado del medio de cultivo, luego se procedió a la siembra de esporas o haustorios y por ultimo realizamos el cierre hermético de la caja Petri con papel Parafilm.

2.7.9 Incubación

Para la incubación la caja Petri se colocó en la incubadora a 24°C y 70% de humedad relativa, durante 5 días aproximadamente según tengamos el desarrollo de los micelios del hongo.

2.7.10 Identificación

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 colocamos una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procede a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 40x.

Con la ayuda del bisturí estéril se cuadricula el medio de cultivo de la caja Petri con PDA en cuadros de aproximadamente 1 cm², este paso se realizó en el interior de una campana de flujo laminar preparada para trabajar bajo condiciones asépticas.

1. Dentro de la cámara de flujo laminar, con la ayuda de un bisturí estéril, uno de los cuadros de PDA se transfirió al portaobjetos que está en la cámara de microcultivo; este portaobjetos debe de estar sobre el triángulo de vidrio.
2. Con la aguja de disección estéril o con un aza bacteriológico estéril se lleva el inóculo a las orillas superiores e inferiores del cuadro de PDA.
3. Se colocó el cubre objetos sobre el cuadro de PDA inoculado, procurando que quede bien centrado.
4. Se agregó 2ml de agua estéril, en el fondo de la cámara de micro cultivo para mantener la humedad, sin mojar el área de crecimiento del hongo.
5. Se selló la caja Petri del micro cultivo con el papel parafilm y se rotulo.
6. El crecimiento del hongo se lo observo cada 24 horas.

2.7.11 Descripción

Para esto se utilizó el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas

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 realización las placas fijas se procedieron de la siguiente manera:

- Se prepararon las cajas petri con las cepas de hongos aislados, una en cada caja Petri.
- Se tomaron un trozo de cinta masking transparente de seis cm. De largo y se fijaron en el cuerpo fructífero, tomando directamente de la caja Petri, donde se encuentran las cepas puras.
- Se observaron al microscopio con el objetivo adecuado y se procedió a tomar fotografías microscópicas de las diferentes estructuras con una cámara.
- Se creó un archivo con las fotografías tomadas de las cepas y luego se realizó los postulados de Koch y cumplió con el cuarto ítem.
- Se realizó un cuadro comparativo con los hongos re-aislados, para ver si eran el mismo hongo que se inoculó.

CAPÍTULO III

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Observación en campo

3.1.1 Determinación del hongo fitopatógeno de mayor pérdidas económicas en el cultivo Fréjol (*Phaseolus vulgaris*)

La antracnosis causada por el hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) es probablemente la enfermedad del fréjol común de mayor importancia económica a nivel mundial. Se puede decir que este es el problema de hongos patógenos más crítico que afecta la producción de esta leguminosa merma el rendimiento de 20 a 30% total de la cosecha

En el Ecuador en las zonas productoras de fréjol, la antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*,) ocasiona pérdidas en rendimientos que oscilan entre 38 y 95%. Permitiendo una pérdida de cada 10 toneladas sembradas se pierde 7 toneladas y cuanto la enfermedad no es controlada a tiempo se estima una pérdida casi del 100% del cultivo.

Mediante observación y apoyados en la revisión bibliográficas la investigación realizada, sector Panyatug, en la provincia de Cotopaxi cantón, Pangua se pudo determinar que el hongo Fitopatógeno de mayor pérdida económica en el cultivo de fréjol (*Phaseolus vulgaris*) es (*Colletotrichum lindemuthianum*) Antracnosis por que produce una pérdida del 38 % del total de su producción

3.2 Identificación signos y síntomas del hongo fitopatógeno en el cultivo (*Colletotrichum lindemuthianum*) de fréjol (*Phaseolus vulgaris*)

Los síntomas producidos por la infección ocasionada por (*Colletotrichum lindemuthianum*) antracnosis. La semilla infectada con la presencia de manchas de color café oscuro los residuos de cosecha son las fuentes primarias de inóculo que originan en la epidermis.



Imágenes N° 1 Visita al campo signos y síntomas (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Antracnosis
B: Manchas de color café oscuro
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015

Según (PERALTA, 2013) los síntomas por la infección ocasionada por (*Colletotrichum lindemuthianum*). La semilla infectada posee manchas de color café oscuro y son los de la cosecha la fuente primaria de inóculo del patógeno que se origina en la epidermis.

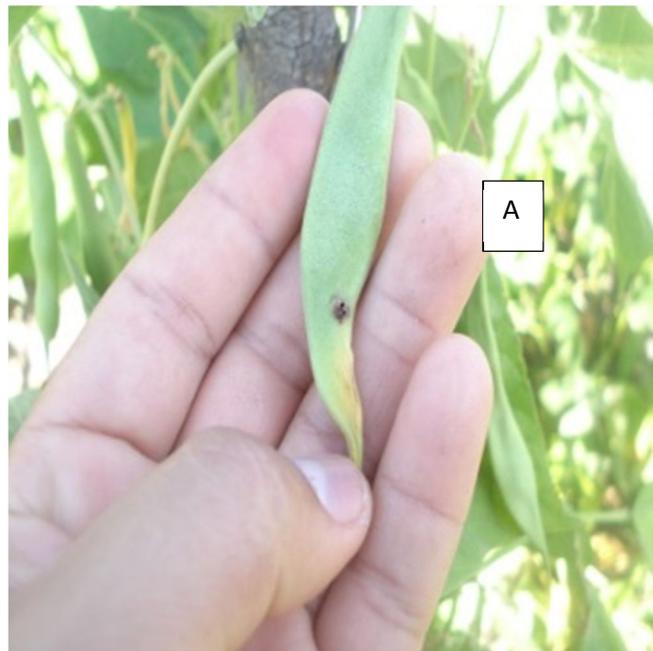
Los primeros síntomas pueden aparecer en las hojas, cotiledones y en todas las nervaduras como lesiones pequeñas de color café oscuro o negro que se presentan en el haz y envés.



Imágenes N° 2 N°3 signos y síntomas (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Lesiones de color café o negro en el haz y envés de la hoja
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

(PERALTA, 2013). Los síntomas inicialmente aparecen en el envés y después en haz de las hojas como lesiones pequeñas de color café oscuro localizadas a lo largo de las nervaduras.

Las infecciones en las vainas más pequeñas se manifiestan en forma de lesiones, de un color entre encarnado y amarillo rojizo, y dan origen a chancros deprimidos, delimitados por un anillo negro, el cual está rodeado a su vez por un bordes de color café rojizo.



Imágenes N°4 signos y síntomas (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Chancros deprimidos por anillos negros con bordes de color café y rojizo
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015

(PERALTA, 2013), afirma en las vainas se notan como pequeñas manchas o lesiones redondas de color entre encarnado y amarillo rojizo dando origen a la formación de chancros deprimidos y el centro un anillo de color negro él está rodeado a su vez por un borde café rojizo.

3.3 Macro y microestructuras del hongo

CUADRO 9 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	INDICE	TÉCNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos/ en el cultivo de fréjol	Talo	Tipo	Observación Microscópica Estereoscópica	Estereoscopio /microscopio
	Reproducción	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Micelio	µm		

La siembra se realizó en 2 cajas Petri de plástico esterilizadas de 9cm de diámetro los mismos que contenían el medio de cultivo realizados con PDA papa dextrosa, para ello se colocó un disco de tejido enfermo de 3 mm de diámetro extraídas (hojas y vainas) del cultivo infectado de una edad de 3 meses, posteriormente la caja fue sellado con papel parafinado (parafilm). Luego se introdujo en la incubadora a un temperatura de 21 a 24°C.

El tipo de reproducción realizada es asexual porque se utilizó muestras extraídas de hojas y vainas infectadas del cultivo en el campo, el mismo que fue realizado, en un laboratorio por un periodo de 5 días.

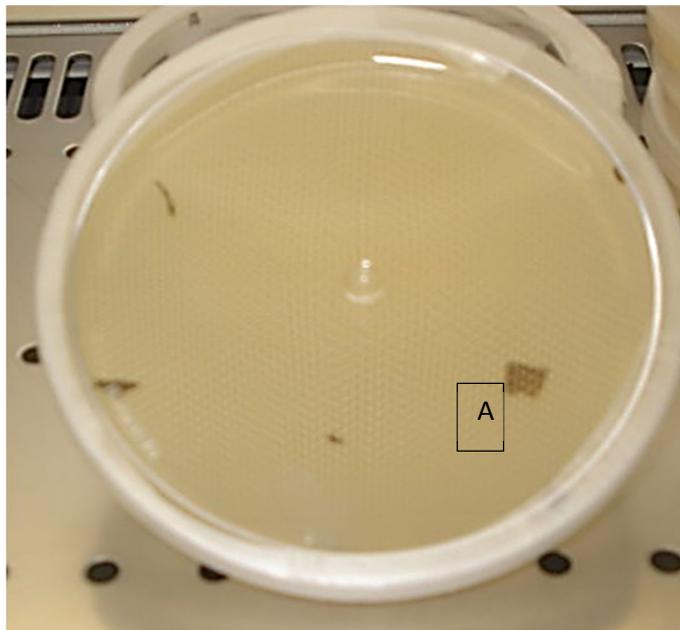


Imagen N°6: Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Tejido enfermo de 5 mm
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015

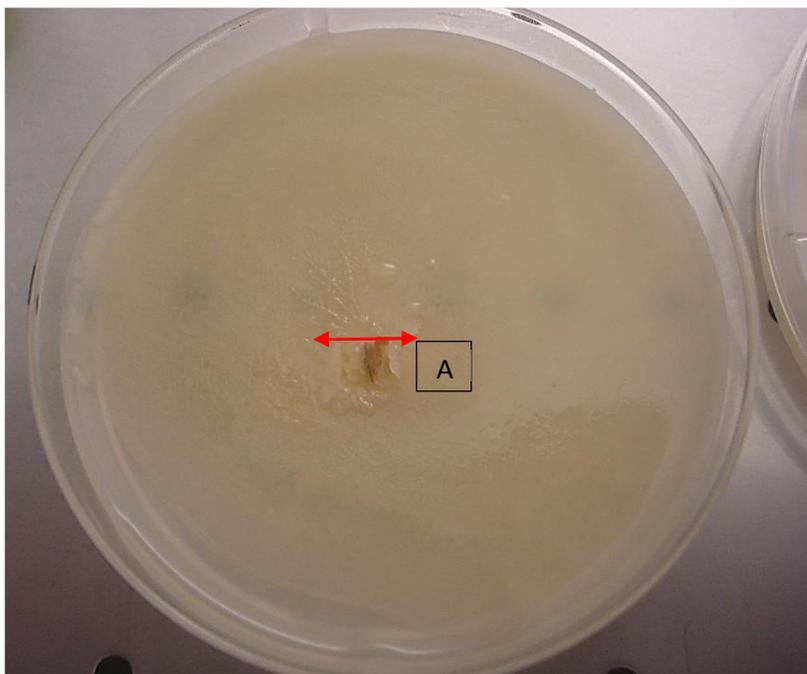


Imagen N°7: Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: micelio algodonoso blanquecino
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

Se obtuvieron colonias del hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) en medio de cultivo PDA utilizando papa destroxa inicialmente se presentó un crecimiento moderado de micelio algodonoso de color blanco con un diámetro de 2 cm a los 2 días después de haber realizado la siembra imagen N°7.

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma que después de dos días realizada la siembra se observó la presencia de micelio algodonoso de color blanquecino de 2cm.

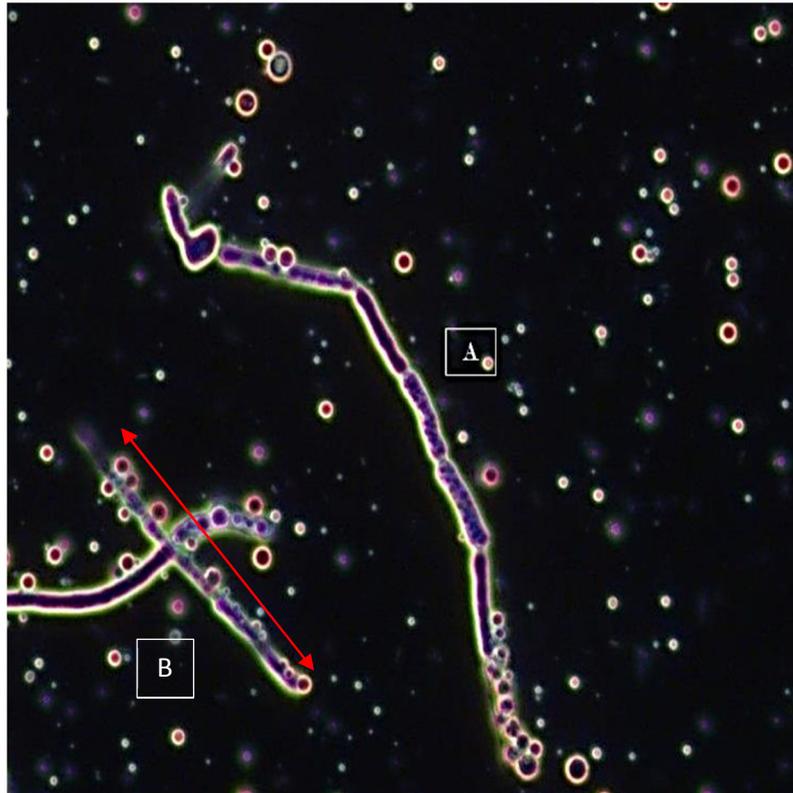


Imagen N°8: Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Hifas
B: Esporas
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

Mediante la observación realizada se pudo determinar hifas 15 μ m septadas, hialinas de manera irregular con presencia de esporas globosas. Imagen N°8

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma que las hifas 15 μ m septadas y hialinas con presencia de esporas globosas.

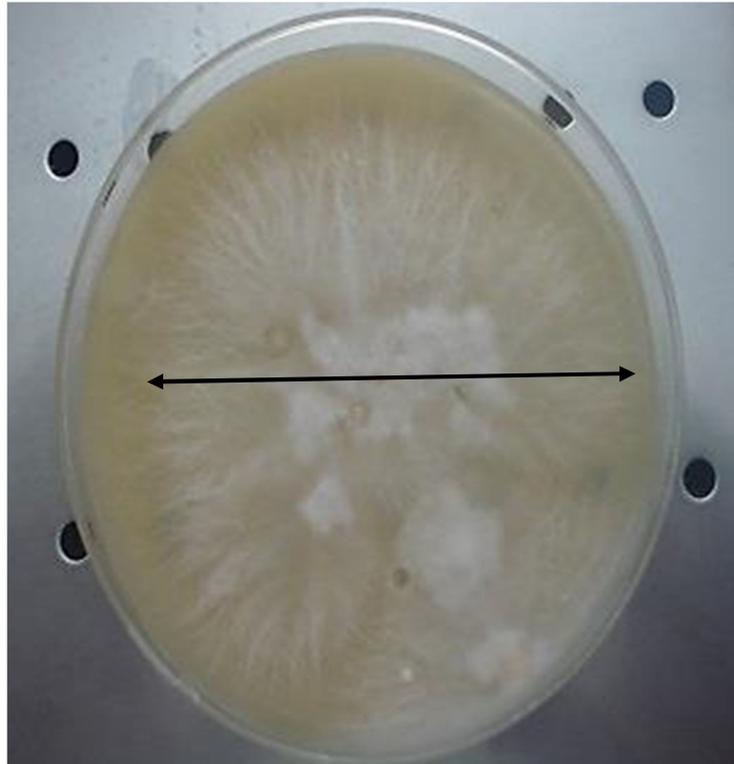


Imagen N°9 reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Micelio algodonoso
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

Se mantiene el micelio algodonoso el color blanquesino en la pigmentación con un diametro de 8 cm esto se dio a los 3 días de haber realizado la siembra .Imagen N°9

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma que despues de los 3 dias de haber realizada la siembra se obsevó la presencia de micelio algodonoso de color blanquecino de 8cm.

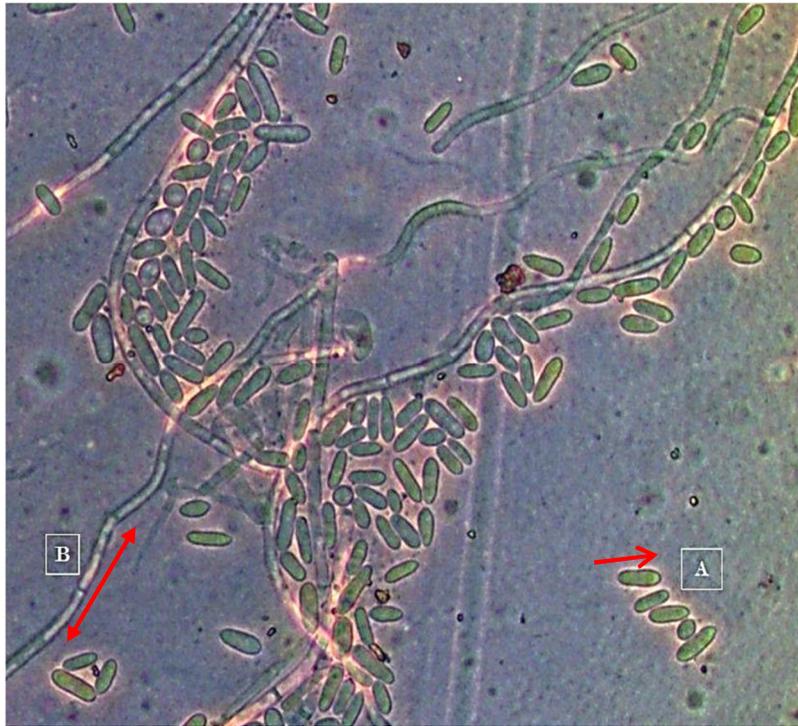


Imagen N°10: Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Conidióforos
B: Conidios
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

Mediante la observación realizada se determinó la presencia de conidióforos semicurvos de 20 μm donde se desarrollan, conidios, solitarios, lisos y globosos de 1.8 μm imagen N°10

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma Conidióforos semicurvos en cada conidióforo 20 μm se desarrollan conidios, solitarios, unicelulares, lisos, globosos de 1.8 μm .

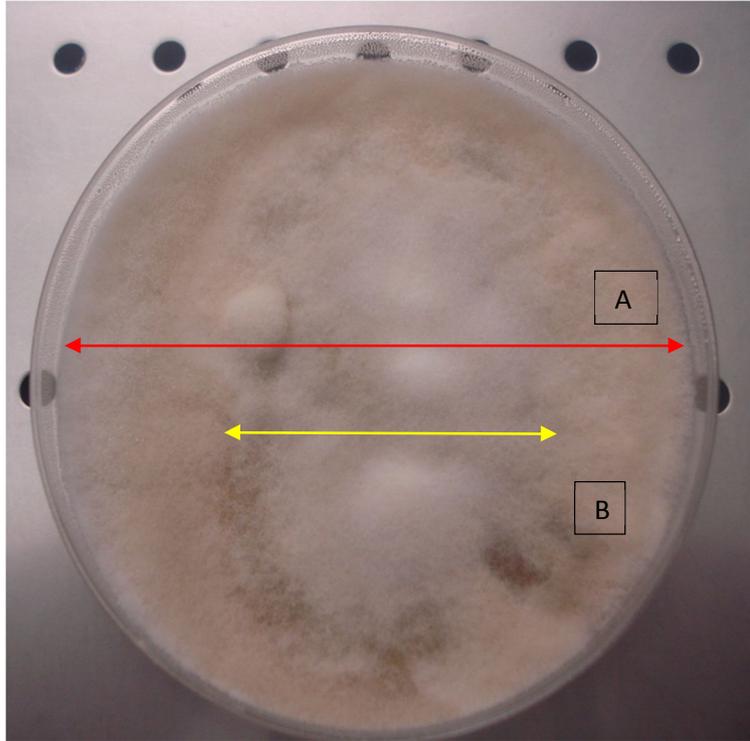


Imagen N°11: Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)
A: Micelio algodonoso de color café
B: Micelio algodonoso de blanquecino.
Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

Mediante la observación realizada se pudo determinar el crecimiento de la colonia micelar de 9 cm. La colonia presentó una pigmentación de color blanquecino en el centro y café a su alrededor, esto se dio a los 5 días. Imagen N°11.

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma que a los 5 días la colonia micelar crece 9 cm, presentando una pigmentación de color café alrededor y en el centro una pigmentación de color blanquecino.

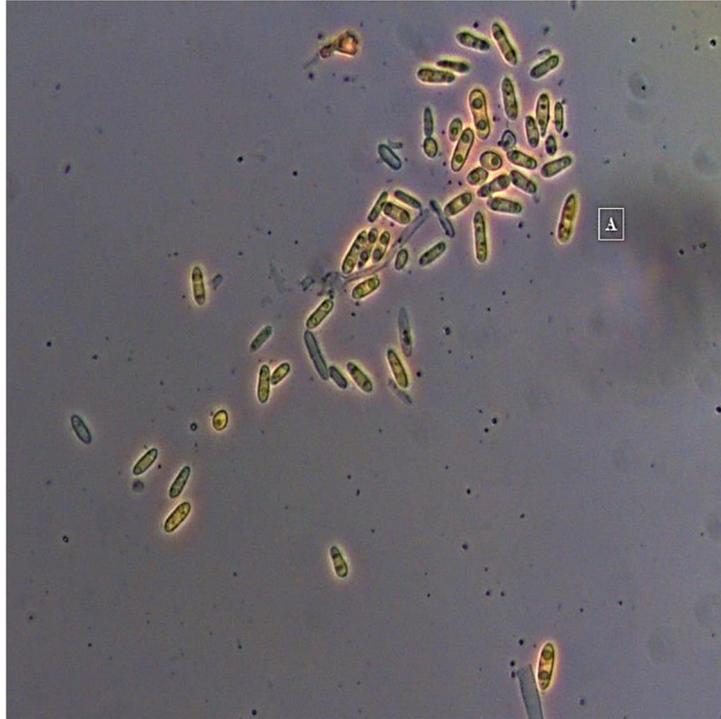


Imagen N°12: Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)

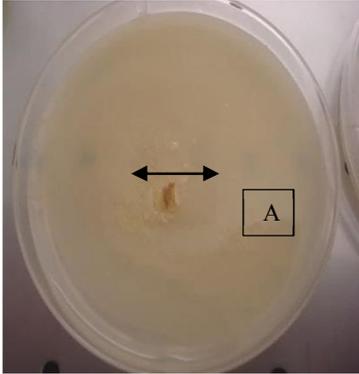
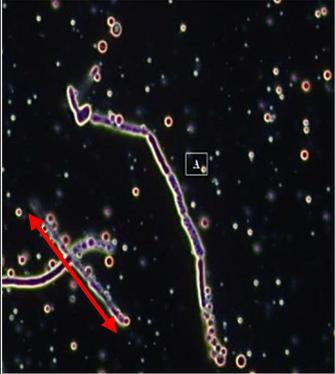
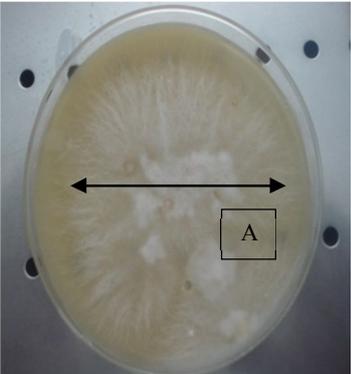
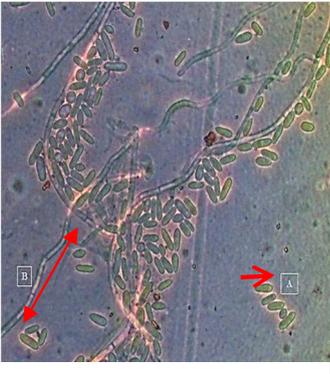
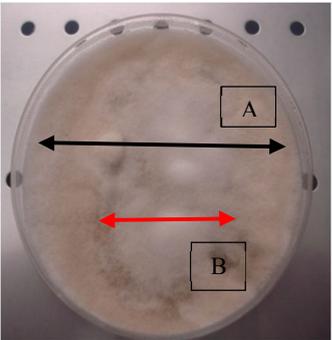
A: conidios

Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

Se pudo observar la presencia de conidios elipcocoidales redondeados o ligeramente ahusadas y ápices cónicos, ligeramente puntiagudos de hialino de 1.8 μm .

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma conidios elipcocoidales de ápices redondeados o ligeramente ahusadas y ápices cónicos, ligeramente puntiagudos, hialinos unicelular.

3.4 Ciclo de vida de (*Colletotrichum lindemuthianum*) en fréjol (*Phaseolus vulgaris*).

ACIVIDAD	TIEMPO TEMPERATURA °C	IMAGEN	OBSERVACION MICROSCOPICA	AUMENTO Y ACTIVIDAD
A: Micelio algodonoso blanquecino	2 días a 21 °C			40X A: Hifas 15 µm B: Esporas
A: Micelio algodonoso blanquecino de 8 cm	3 días 21 °C			40X A: Conidióforos 20 µm B: Conidios 1.8 µm.
A: Micelio algodonoso de color café B: Micelio algodonoso de color blanquecino.	5 días 21 °C			40 B: Conidios 1.8 µm.

3.4.1 Descripción del ciclo de vida del patógeno

Los conidios, en condiciones de elevada humedad ($> 70\%$) y temperatura moderada ($15 - 22\text{ }^{\circ}\text{C}$), al entrar en contacto con la parte aérea de la planta pueden germinar y producir una estructura para el anclaje y penetración del hongo en el tejido de la planta. Posteriormente, comienzan a desarrollarse las hifas y forman un micelio compacto que se alimenta de células del huésped (planta de judía) apareciendo las lesiones características. Los primeros ataques suelen ocurrir en zonas de baja exposición a la radiación solar, como el envés de las hojas, o en zonas próximas al suelo.

Con tiempo, en el centro de las lesiones pueden desarrollarse unas masas y forman los conidios esporas que rompen, se dispersan los conidios con la ayuda de gotas de agua y del viento principalmente.

Este proceso, produce nuevas infecciones de plantas colindantes, re-infecciones en la planta o simplemente facilita la conservación en el medio a la espera de una oportunidad para germinar. Los conidios pueden sobrevivir varios años en el suelo, en los restos de la cosecha (hojas, vainas, tallos infectados) y en los materiales usados para el tutorado del cultivo. Además, las hifas pueden sobrevivir en forma latente dentro de la testa de la semilla (piel) aunque no se manifiesten síntomas claros. De ese modo, las semillas constituyen un mecanismo importante de propagación de la enfermedad en el espacio y el tiempo de 5 días

CONCLUSIONES

- ✓ Mediante la visita, y la bibliografía consultado se pudo identificar que el hongo que causa mayor impacto económico (*Colletotrichum lindemuthianum*) causante de enfermedad de la antracnosis del fréjol común es el mayor problema de hongos patógenos y el más crítico.

- ✓ Mediante la observación realizada en campo se pudo constatar que los signos y síntomas característicos del hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) son manchas circulares de color café oscuro que se presenta en la semilla del fréjol, en la vaina nuestra manchas circulares en forma de chancros de color negro o café oscuro en las hojas presenta lesiones de color café oscuro o negro tanto en el haz y en envés. Presentando similares características que han mencionado las citas bibliográficas mencionadas anteriormente.

- ✓ En la siembra realizada en el laboratorio mediante el uso del cultivo PDA papa destroxa se observó el desarrollo del hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) con su característica estructural que son: micelio aéreo algodonoso de color blanquecino y en su etapa final se tornó a un color café. Las microestructuras que presento el hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) **son:** hifas septadas, hialinas y ramificadas de manera irregular de 15 μm , conidióforos rectos 20 μm , conidios de 1.8 μm de forma elipsoidales redondeadas o ligeramente ahusadas y ápices cónicos, ligeramente puntiagudos, hialinos unicelulares.

- ✓ En la investigación realizada en laboratorio se pudo observar que el hongo se desarrolla normalmente en una temperatura de 21 °C y que su ciclo de vida se cumplió a los 5 días después de haber realizado el cultivo.

- ✓ Luego de la investigación realizada se pudo elaborar una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo en estudio para dar a conocer las macroestructuras y ciclo de vida del hongo investigado.

RECOMENDACIONES

- ✓ Para la identificación correcta del hongo se debe llevar material bibliográfico para poder comparar los signos y síntomas del patógeno.
- ✓ Para visualizar de mejor manera las características micro estructurales del hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) se recomienda utilizar el microscopio trinocular con el lente 40X, utilizando una gota de azul de metileno en la muestra, no se recomienda el uso agua destilada porque presenta burbujas que impide observar de forma adecuada al hongo.
- ✓ Se recomienda que la presente investigación sirva como fuente de información, para el estudio del hongo y determinar los factores que favorecen al desarrollo, para de esta manera poder garantizar menor porcentaje de infestación en el cultivo.

GLOSARIO

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

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

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.

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

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

Enfermedad: cualquier mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante, que resulta de la irritación continúa por un agente patogénico

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.

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.

Hifa: ramificación simple de un micelio.

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.

Síntoma: reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de una enfermedad o factor ambiental y que lleva al desarrollo de síntoma.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. AGRIOS, G. (1999). Fitopatología . Mexico: LIMUSA.
2. AGRIOS, G. (2005). Plant Pathology. Nueva York: Academic Press.
3. AGRIOS, G. (2007). Fitopatología. Mexico: LIMUSA.
4. CALZADA, B. (2002). Frutales nativos. Lima, Perú: El Estudiante.
5. CIAMPI, L. (2002). Universidad Austral de Chile, Introducción a la patología vegetal. Valdivia, Chile. Nuova Firenze. 232p.
6. CULLISON, W. (2003). Soil microbiology. Department of Crop and Soil Environmental Sciences
7. ECHANDI ,(2001). Laboratory guide to identification of the major species. Ferry Lane, Kew y Surrey. Inglaterra. Commonwealth Mycological Institute. 58 p.
8. FRENCH, E., & HEBERT, T. (1980). Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica: IICA.
9. HERRERA, L & MAYEA, S. (1994). Fitopatología General. La Habana, Cuba: Felix Varela.
10. HUARAL. (2003) Manejo del cultivo de fréjol
11. INFOAGRO. (2008). Leguminosas/Cultivo de fréjol 2014, de <http://www.infoagro.com/leguminosa/ fréjol.htm>.
12. INFOJARDIN. (2005). Cultivo fréjol <http://www.articulos.infojardin.com/leguminosa/2005/cultivo- fréjol.htm>
13. KENEDA.(2004). Fitopalogia general, Universidad Católica Agropecuaria del Tópico. Seco.topic 5 und
14. OLIVIERA .(2000) Manejo de Hongos Fitopatogenos. macro y microestructuras Mexico: Universidad Autónoma de Chapingo.
15. MURILLO (2012). Catalogo de variedades del frejol . Quito : miscelanea .
16. PERALTA, M. M. (2013). Manual agricola de frejol y otras leguminosas .Quito miscelanea.



**Universidad
Técnica de
Cotopaxi**

UNIDAD ACADÉMICA DE RECURSOS AGROPECUARIOS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**GUÍA DIDÁCTICA DE LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE
(*Colletotrichum lindemuthianum*) EN EL CULTIVO DE FRÉJOL (*Phaseolus vulgaris*)**

Autor: Néstor Alfonso Vizuete Guato

ÍNDICE

Introducción

Fundamentación

Objetivo

Ubicación

Bloque I. Metodología

Bloque II. Resultados

Material de consulta sugerido

INTRODUCCIÓN:

En el Ecuador en las zonas productoras de fréjol, los hongos fitopatógenos son los culpables de grandes pérdidas económicas por ocasionar daños en el cultivo , en el sector de Panyatug perteneciente al cantón Pangua de la provincia de Cotopaxi, no es la excepción al tener muchos problemas fitosanitario, el principal hongo fitopatógeno que causa mayor pérdida económica en el cultivo es (*Colletotrichum lindemuthianum*), más conocido en la zona por sus agricultores como Antracnosis, por lo cual en la presente Guía Didáctica se redactan los pasos más prácticos para la reproducción de dicho hongo en condiciones de laboratorio, con el objetivo de aislar, propagar y estudiar el fitopatógeno para poder a futuro recomendar un control adecuado, teniendo ya muy claro el ciclo de vida, y la morfología del patógeno.

FUNDAMENTACIÓN:

Los estudios arqueológicos indican que el fréjol común (*Phaseolus vulgaris*), es originario del continente americano. Se han encontrado evidencias, con antigüedad de 5000 a 8000 años, en algunas regiones de México, Estados Unidos y Perú. Existe un acuerdo relativo que indica a México como su lugar de origen, que también se disputa el Perú, por encontrarse allí prototipos de las especies silvestres de los cinco grupos de fréjoles más cultivados. (INFOAGRO, 2008)

El fréjol, es la especie más importante para el consumo humano. Se cultiva prácticamente en todo el mundo, en 129 países de los cinco continentes, se reporta la producción de fréjol, esta leguminosa ha sido de suma importancia en la alimentación mundial, ya que en la mayoría de los países es cultivada y se ha llegado a obtener buenas producciones. (INFOAGRO, 2008)

En el Ecuador en el 2010 se produjo 39,725 t/año, es decir el 0.2% de la producción mundial además de ser considerado un producto básico y de exportación, constituye una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. (INFOAGRO, 2008).

Es una planta dicotiledónea anual, perteneciente a la familia de las leguminosas

Raíz. Órgano de color pardo que se va adelgazando hacia su extremo libre, es la raíz principal que se ramifica en gran cantidad de raíces laterales.

Tallo. Herbáceo que alcanza hasta 0.5 metros de altura, de él parten tallos secundarios o ramas.

Hojas. Trifoliadas, verdes vellosas y alternas. Con la nervadura reticulada.

Flores. Se presentan situadas en racimos y salen de las axilas de las hojas. Son hermafroditas

Vainas. Varían en su amaño y color, que van desde el verde al rojo y casi negro. Donde se encuentra de 3 a 5 semillas.

Síntomas: en las semillas presenta manchas de color café oscuro, en las hojas manchas circulares de café oscuro o negras en las nervaduras de haz y envés, en las vainas se manifiestan en formas de lesiones de un color encarnado y amarillo dando origen a chancros rodeados por un borde de color rojizo.

Diseminación: Las esporas son diseminadas por el viento e insectos.

Sobrevivencia: Persiste asociado a tejidos enfermos aparentemente al estado de conidias.

Control. En cultivos de frejol con problema de antracnosis, incorporar en el suelo los residuos de esa cosecha por medio de un barbecho profundo, meses antes de la siguiente siembra. Hacer rotaciones de frejol con otros cultivos no hospedantes de esta enfermedad Usar semilla que no esté contaminada (semilla certificada) fechas de siembra que escapen a la infección La siembra final del campo debe quedar con una densidad de plantas satisfactoria sin que vaya a existir una sobrepoblación. Esta serie de medidas deben ser tenidas en cuenta antes de la siembra para así prevenir la aparición de la enfermedad. (PERALTA, 2013)

Morfología. Las principales características morfológicas de (*Colletotrichum lindemuthianum*), son: Hifas septadas, hialinas y ramificadas de manera irregular con presencia de esporas de 15 μm . Conidióforos septados, macronematoso de 20 μm . Conidios, solitarios, unicelulares, lisos, globosos de 1.8 μm , sobre cortas lenticela. (OLIVERIA, 2000)

OBJETIVO:

La presente guía didáctica sobre la caracterización morfológica del hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) tiene como finalidad complementar los conocimientos sobre la morfología del patógeno para fomentar el autoaprendizaje en el aula.

UBICACIÓN:

Tabla 1. Ubicación del laboratorio.

Sitio:	Salache Bajo
Parroquia:	Eloy Alfaro
Cantón:	Latacunga
Provincia:	Cotopaxi
Coordenadas cuadrícula mercator utm:	N: 9888.749,37. E: 764.660,386.
Altitud:	2757,59 msnm.

Fuente: el investigador

BLOQUE I. METODOLOGÍA:

Tabla 2. Recolección de la muestra en campo y tratamiento en laboratorio.

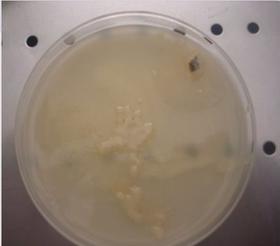
	<p>En cultivares de fréjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>) ubicados en sector Panyatug del Cantón Pangua de la Provincia de Cotopaxi, a una altura de 1800 m.s.n.m, se tomó muestras de frutos que presentaban signos y síntomas de estar afectados por (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>)</p>
	<p>Utilizando protocolos de recolección de material en campo se recolecto los órganos (hojas y vainas) enfermos, luego fueron almacenados en fundas tetrapac para ser transportados hacia el laboratorio</p>
	<p>En un refrigerador a una temperatura entre 6 y 8°C fueron almacenadas las muestras tomadas en campo en las fundas de tetrapac, esto con la finalidad de que el patógeno se mantenga vivo. Las muestras deben estar rotuladas para evitar que se mesclen, tomando en cuenta que el tiempo de almacenado no sea mayor a 8 días.</p>

Tabla 3. Preparación del medio de cultivo, papa - destroza - agar (PDA),

	<p>Primero.- pesamos 350 gr. de papa pelada picada en cuadritos, poner en una olla para cocinarlas por 15 minutos con 800 ml de agua con un pH de 6.5 que lo bajamos con ácido cítrico, esto para evitar la propagación de bacterias.</p>
	<p>Segundo.- pasamos por el colador la sustancia obtenida para liberarla de impurezas, la regresamos a fuego lento completando con agua lo que se evaporo, procedimos a añadir 30 gr. de agar, 30 gr. glucosa y 3,5 gr. de levadura.</p>
	<p>Tercero.- una vez que ya tuvimos una solución homogénea procedimos a trasladarla a un Erlenmeyer lo tapamos bien con papel aluminio para evitar que se derramé lo colocamos en el Autoclave por un lapso de 60 min con T°120 de para esterilizarlo.</p>
	<p>Cuarto.- una vez que obtuvimos el medio de cultivo esterilizado procedimos a ponerlo en cada caja Petri con mucho cuidado para evitar contaminaciones, fue necesario esperar de 5 a 10 minutos para que se gelatinice.</p>

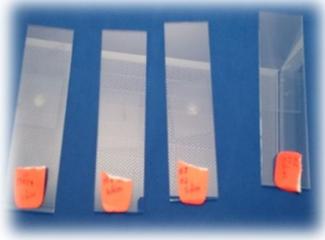
Fue
nte
: El
inv
esti
gad
or

Ta
bla
4.
Sie
mb
ra y
cult
ivo
del
hon
go

	<p>Las cajas Petri con el medio de cultivo PDA fueron trasladadas a la cámara de flujo laminar al igual que las muestras para ahí realizar la inoculación, con la ayuda de aza de siembra para evitar que se contamine el trabajo.</p>
	<p>Con un bisturí se procedió a cortar un pedazo de tejido contaminado de 3 mm y lo desinfectamos con una solución de 2:1 de clorox y lo colocamos en el centro de cada caja Petri con ayuda de una pinza y aza de siembra, de inmediato sellamos las cajas con parafilm y etiquetamos.</p>
	<p>Las cajas Petri ya sembradas las colocamos en la incubadora a una temperatura de 22°C y con una Hr del 70% para que el hongo se propague de una manera más rápida.</p>
	<p>En esta etapa tuvimos que estar pendientes de las muestras observándolas cada 24 horas de una manera minuciosos para observar todo los cambios que suceda en las cajas, con la colonia del hongo obtenidas.</p>

Fuente: El investigador

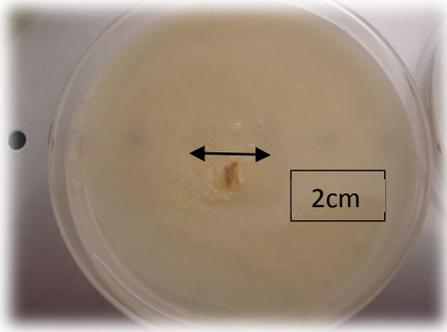
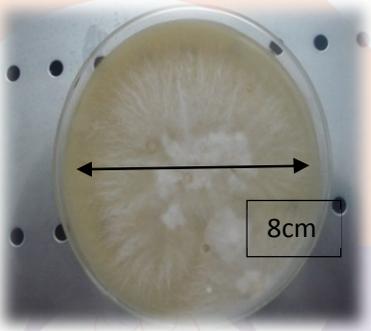
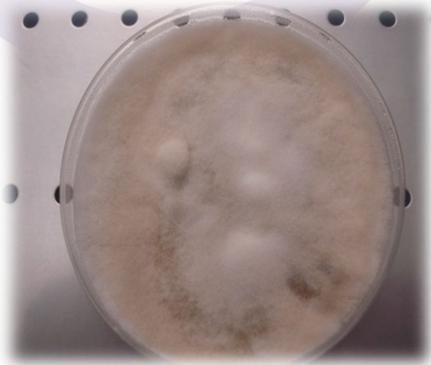
Tabla 5. Identificación y Aislamiento

	<p>Se llevó las cajas Petri a la cámara de flujo laminar en donde las abrimos para coger muestras con la ayuda de un bisturí y lo colocamos en el porta objetos, la mejor manera de coger las muestras y para que sea observado.</p>
	<p>Observamos al microscopios para poder diferenciar las estructuras de los diferentes hongos que se propagaron en la caja hasta encontrar utilizando los lentes de 40x y 100x.</p>
	<p>Se diferencia la caja Petri que contenga(<i>Colletotrichumlindemuthianum</i>) Preparamos nuevamente medio de cultivo PDA, llevamos a la cámara de flujo laminar para volver a sembrar. Ya todo en la cámara de flujo laminar se obtiene una porción de micelio y se lo siembra en la caja Petri con el medio de cultivo, la llevamos a la incubadora y continuamos con las observaciones cada 24 horas.</p>

Fuente: el investigador

BLOQUE II. RESULTADOS:

Tabla 5 Macroestructuras de hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*)

	<p>Se obtuvieron colonias del hongo (<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>) en medio de cultivo PDA utilizando papa dextrosa inicialmente se presento un crecimiento moderado de micelio algodonoso de color blanco con un diametro de 2 cm a los 2 dias despues de haber realizado la siembra</p>
	<p>Se mantiene el micelio algodonoso el color blanquesino en la pigmentación con un diametro de 8 cm esto se dio a los 3 dias .</p>
	<p>Mediante la observacion realizada se pudo determinar del crecimiento colonia miclear de 9cm de la colonia con una pigmentacion de color café a esto se dio a a los 5 dias</p>

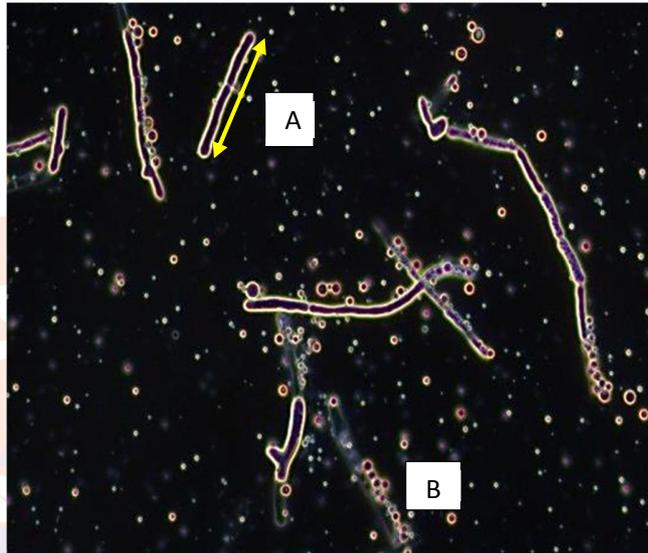
Fuente: el investigador



9cm

Microestructuras observadas en el Microscopio Trinocular CX31

La imagen fue obtenida con ayuda de un microscopio con el lente de 40, en campo oscuro Ph1 y con intensidad de luz de 5.



Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)

A: hifas de 15 μm

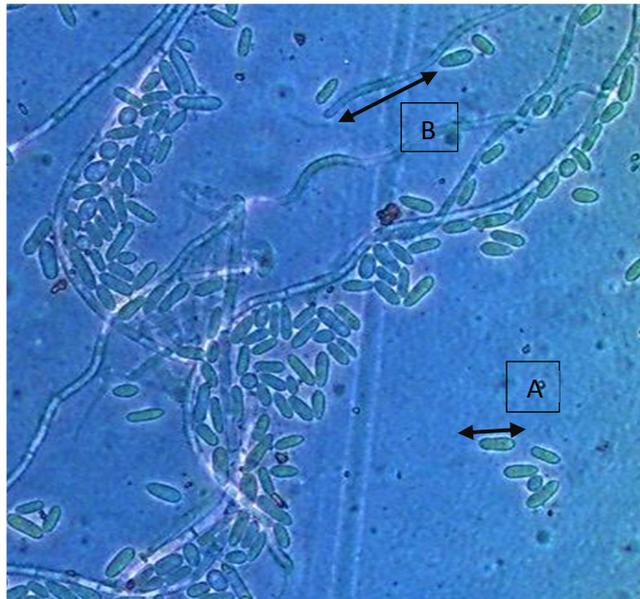
B: esporas

Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015.

Mediante la observación realizada se pudo determinar hifas 15 μm septadas, hialinas y ramificadas de manera irregular con presencia de esporas globosas

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma hifas septadas y hialinas de 15 μm con presencia de esporas globosas.

La imagen fue obtenida con ayuda de un microscopio con el lente de 40x, en campo oscuro Ph2 y con una intensidad de luz de 5.



Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)

A: conidióforos de 20 μm

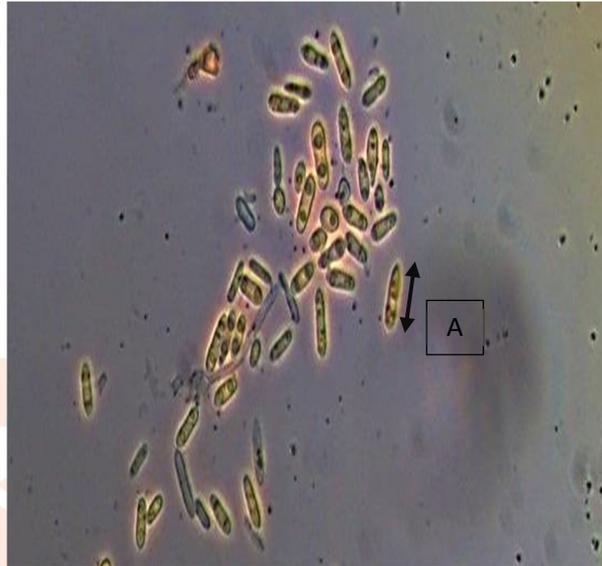
B: conidios de 1.8 μm

Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015

Mediante la observación realizada se determinó la presencia de conidióforos de 20 μm semicurvos donde se desarrollan, conidios, solitarios, lisos y globosos de 1.5 μm .

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma Conidióforos semicurvos 20 μm de El ápice de cada conidióforo finaliza en donde se desarrollan conidios, solitarios, unicelulares, lisos, globosos de 1.5 μm , sobre cortas lenticelas.

La imagen fue obtenida con ayuda de un microscopio con el lente de 40x, en campo oscuro Ph2y con intensidad de luz de 5.



Reproducción en laboratorio (*Colletotrichum lindemuthianum*)

B: conidios de 1.8 μm

Elaborado por: VIZUETE, Néstor, 2015

Se pudo observar la presencia de conidios de 1.8 μm de forma elipsoidal redondeada o ligeramente ahusada y ápices cónicos, ligeramente puntiagudos, hialinos unicelulares.

Corroborando lo observado (OLIVERIA, 2000) afirma conidios 1.8 μm elipsoidales de ápices redondeadas o ligeramente ahusadas y ápices cónicos, ligeramente puntiagudos, hialinos unicelulares

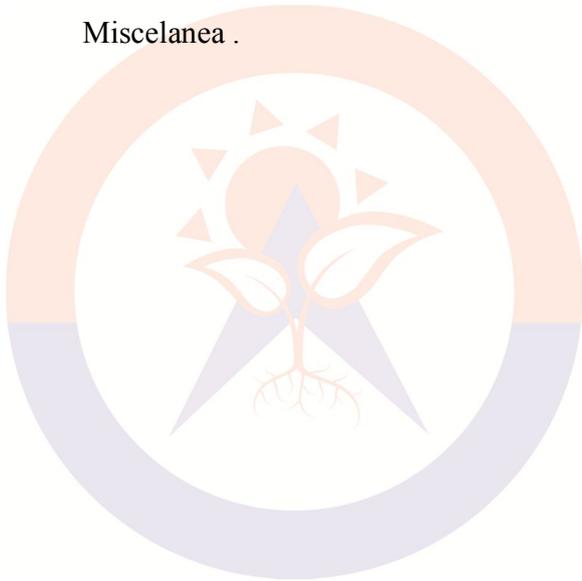
MATERIAL DE CONSULTA SUGERIDO:

AGRIOS, G. (1999). Fitopatología 2 ed. Mexico: Limusa.

OLIVERIA. (2000). Manejo de hongos fitopatógenos, macro y microestructuras. México: Universidad Autónoma de Chapingo

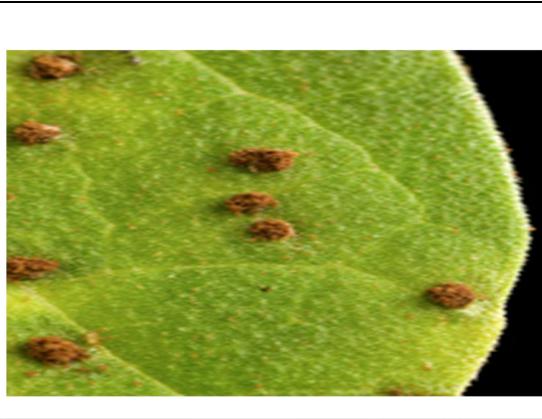
INFOAGRO. (2008). Leguminosas/Cultivo de fréjol 2014, de <http://www.infoagro.com/leguminosa/fréjol.htm>.

PERALTA, M. M. (2013). Manual agrícola de fréjol y otras leguminosas. Quito : Miscelánea .



Ingeniería
Agronómica

ANEXO N 2 Enfermedades del fréjol

<p>Mancha angular: Es una enfermedad causada por hongo y se trasmite por semilla, la planta puede ser atacada desde las dos semanas de germinada hasta el llenado de vaina (sexta semana). Los síntomas se ven más en hojas y vainas y tallos, en hojas son pequeñas manchas de color gris o café de forma cuadrada o triangular con bordes amarillentos, estas manchas crecen y se unen, en plantas adultas ocurre amarilla miento y se caen, las vainas presenta manchas café o rojizas circulares con un borde más oscuro.</p>	
<p><i>Uromyces appendiculatum</i>. Roya, los primeros síntomas aparecen en las hojas como manchas largas de color gris a negro. Luego el área infectada se llena de anillos concéntricos alrededor de la mancha contenida de picnidios negros. El oscurecimiento de los nódulos es característico de la infección en los tallo sesto puede rodear el tallo y matar la planta. Bajo infecciones severas, caídas de hojas prematuras pueden ocurrir (La infección de la flor puede llevar a la pudrición de las vainas y causar chancros extensivos. Las infecciones de las vainas pueden resultar en infección de semillas, que pueden ser transmitidas al siguiente cultivo.</p>	
<p><i>Sclerotium rolfsii</i> Sacc. Tizon. Cerca del suelo se notan lesiones oscuras y acuosas, que avanzan hacia las raíces. Sobre estas lesiones se observa una masa de color blanco con estructuras redondas (tamaño de la cabeza de un alfiler). Este último síntoma la diferencia la marchitez por <i>Fusarium</i>.</p>	
<p><i>Fusarium oxysporum</i>. Marchitez. En el campo observan plantas pequeñas y marchitas, con las hojas inferiores amarillentas (distribuidas en focos). La enfermedad causa una maduración temprana de la planta. Las raíces presentan color café rojizo a café oscuro. En un corte se observa el tejido interno de color café o rojizo oscuro. La base del tallo se puede cubrir con una felpa de color anaranjado claro o rosado.</p>	

ANEXOS N° 3 Campo visita al sitio de recolección de muestras.



Sitio de recolección



monitoreo del cultivo



Planta infectada



recolección de la muestra

ANEXO 4 Laboratorio Equipos



Incubadora



Cámara de flujo laminar



Autoclave



Estereoscopio



Microondas y
Destilador de agua



Cocina eléctrica

ANEXO N ° 5 Pasos realizados en la caracterización morfológica de hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*) Preparación del agar papa destroxa



Limpeza y cocion de papas 350 gr



se utilizo 30 gr agar



35 gr. de glucosa



3,5 de levadura



Mezcla la preparacion por 2 minutos

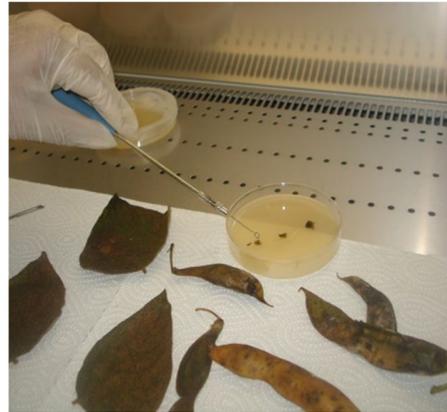


Desifeción del agar por 1 hora

ANEXO N° 6 Siembra del hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*)



Muestras infectadas



siembra del tejido



Sellado de la muestra

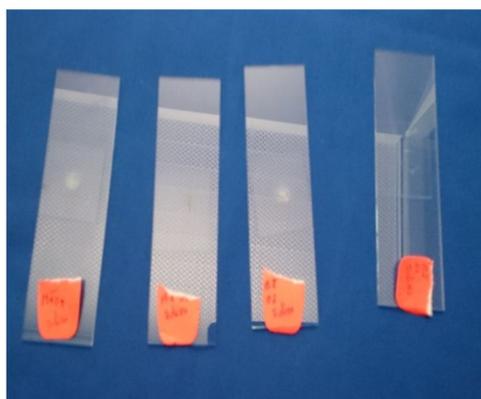


tejido sembrado

ANEXO N° 7 MACROESTRUCTURAS (*Colletotrichum lindemuthianum*)



Macroestructura de hongo (*Colletotrichum lindemuthianum*)

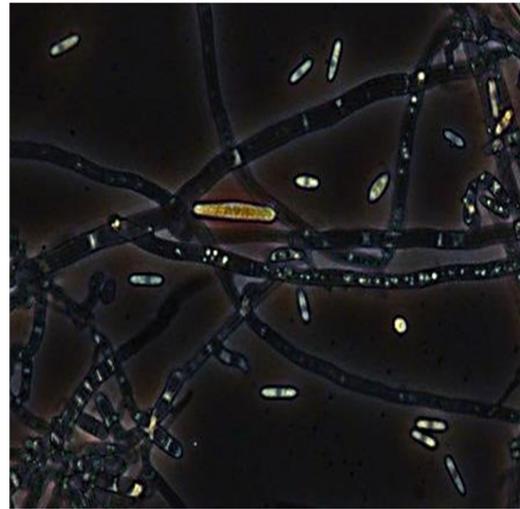
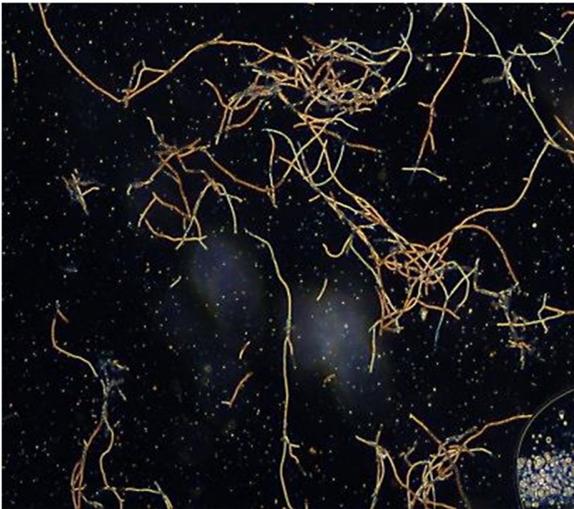


Muestra de micelio para ser observado en microscopio

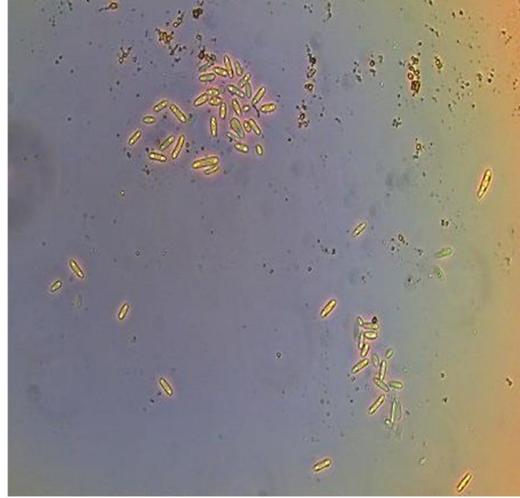
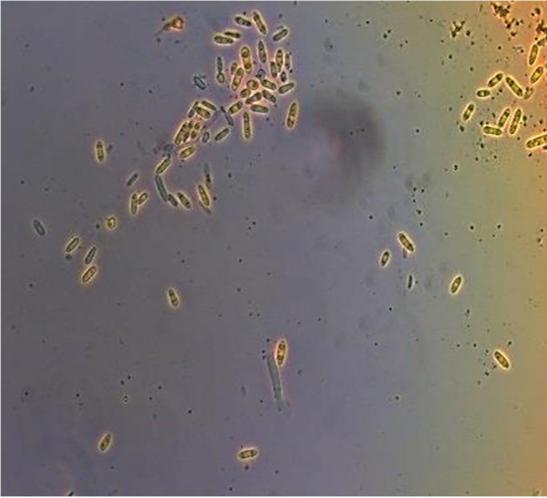
ANEXO N°6 Identificación microestructuras (*Colletotrichum lindemuthianum*)



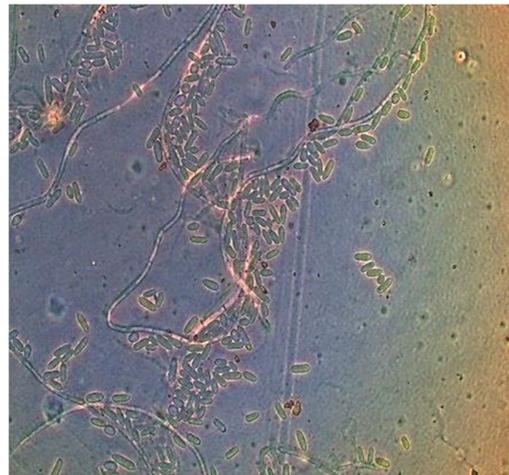
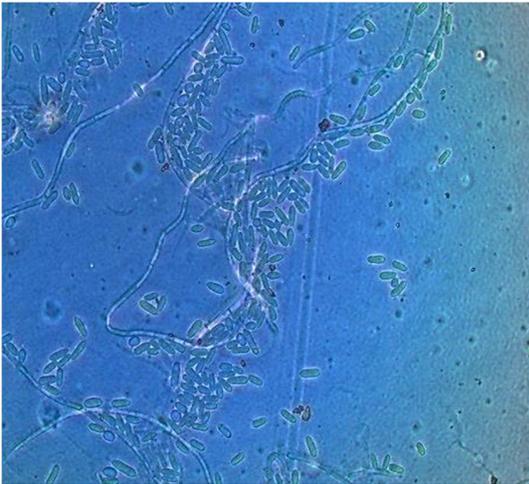
Observación realizada en microscopio



Microestructuras observadas con el lente 40X (*Colletotrichum lindemuthianum*)



Microestructuras observadas con el lente 40X (*Colletotrichum lindemuthianum*)



Microestructuras observadas con el lente 40X (*Colletotrichum lindemuthianum*)

