

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO

TÍTULO:

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS
FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ALCACHOFA (*Cynara
scolymus*), SECTOR ANCHILIVI - COTOPAXI. 2014”.**

Tesis de Grado presentado previo a la obtención del Título de **Ingeniero Agrónomo**

Autor: Sr. Oswaldo Antonio Miño Gallardo

Director: Ing. Mg. Guadalupe de las Mercedes López Castillo

Asesor Técnico: Ing. Agr. Santiago Jiménez

Latacunga – Ecuador

2015



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

Latacunga – Ecuador

AUTORÍA

Los criterios emitidos en el presente trabajo de investigación **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus*), SECTOR ANCHILIVI – COTOPAXI. 2014”**, son de exclusiva responsabilidad del autor.

.....
Miño Gallardo Oswaldo Antonio
C.I. 0503835043



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES
Latacunga – Ecuador

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 Directora del Tema de Tesis **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus*), SECTOR ANCHILIVI – COTOPAXI. 2014”**, debo confirmar que el presente trabajo de investigación fue desarrollado de acuerdo con los planteamientos requeridos

.....
Ing. Mg. Guadalupe de las Mercedes López Castillo

C.I 180190290-7

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 ALCACHOFA (*Cynara scolymus*), SECTOR ANCHILIVI – COTOPAXI. 2014**”

De autoría del egresado **Oswaldo Antonio Miño Gallardo** CERTIFICAMOS que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones al presente documento.

Aprobado por:

Ing. Guadalupe López Mg.

DIRECTORA DE TESIS

Ing. Karina Marín Mg.

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. David Carrera

SECRETARIO DEL TRIBUNAL

Ing. Santiago Jiménez

OPOSITOR

AGRADECIMIENTO

Al terminar una etapa más de formación en mi vida, elevo mi plegaria de agradecimiento al Padre todopoderoso por darme el don de la vida, a mis progenitores, hermana y familia que han estado apoyándome constantemente desde siempre.

Extiendo un profundo sentimiento de gratitud a la Universidad Técnica de Cotopaxi, institución noble que me abrió las puertas cuando aún soñaba en convertirme en un exitoso profesional y así contribuir al desarrollo y adelanto de mi patria; a mis queridos formadores quienes constantemente me brindaron y ofrecieron herramientas sólidas sobre el conocimiento científico durante el periplo académico y no descuidaron ni un momento mi formación como ser humano, a mis compañeros de aula con quien compartí momentos inolvidables mi eterna gratitud.

Y finalmente quiero dejar constancia de mi profundo agradecimiento a la Ing. Mg. Guadalupe López, Ing. Karina Marín, Ing. Santiago Jiménez, Ing. David Carrera quienes con esfuerzo y ahínco me acompañaron en el desarrollo y cristalización de este trabajo investigativo previa a mi investidura de profesional.

Oswaldo A. Miño G.

DEDICATORIA

Cuando comencé a trajinar en este mundo Dios puso en mi camino a esos bellos ángeles terrenales Patricio y Nelly, mis padres quienes me han apoyado constantemente disfrutando mis éxitos y llorando mis tropiezos, mi hermana Erika parte importante en mi vida. Para ustedes dedico este trabajo como muestra de amor y gratitud.

Oswaldo A. Miño G.

ÍNDICE

CONTENIDO

AUTORÍA.....	i
AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DEDICATORIA.....	v
ÍNDICE.....	vi
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	13
JUSTIFICACIÓN.....	14
OBJETIVOS.....	15
PREGUNTAS DIRECTRICES.....	16
CAPITULO I.....	17
1. MARCO TEÓRICO.....	17
1.1 Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>).....	17
1.2. Clasificación taxonómica.....	17
1.3. Descripción botánica.....	18
Raíz.....	18
Tallo.....	18
Hojas.....	18
Flores.....	18

Frutos.	18
1.4. Enfermedades de interés comercial del cultivo de alcachofa.....	19
1.4.1. Enfermedad en Estudio (<i>Alternaría cinerariae</i>)	19
1.5. Hongos fitopatógenos	21
1.6 Aislamiento de hongos fitopatógenos a partir de plantas enfermas	23
1.6.1. Purificación de cepas.....	26
1.7. Identificación de hongos	28
1.8. Delimitación de la zona de muestreo	29
1.9. Pasos para la recolección de muestras	29
1.9.1. Recomendaciones para toma de muestras - sanidad vegetal.....	33
1.10 Pasos para el aislamiento de patógenos.	34
1.11. Medios de cultivos usados en el aislamiento de hongos	36
1.11.1. Métodos de conservación de hongos.....	37
1.11.2. Las técnicas, más usuales de conservación.....	38
1.12. Pasos para la identificación de los hongos fitopatógenos.	39
1.12.1. Clasificación de los hongos fitopatógenos	40
1.12.2 Estructuras reproductivas	50
1.13. Observaciones de hongos.....	51
CAPITULO II	53
2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	53
2.1. OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES.....	53
2.2. DISEÑO METODOLÓGICO.....	53
2.2.1. Tipo de investigación.....	53
2.2.2. Investigación Descriptiva.....	53
2.2.3. Métodos.....	54

2.2.3.1. Método descriptivo analítico.....	54
2.2.3.2. Método deductivo	54
2.2.3.3. Método comparativo	55
2.2.4. Técnicas.....	55
2.2.4.1. Observación	55
2.2.4.2. Fichaje.....	55
3. METODOLOGÍA	56
3.1. En campo	56
• Delimitación del Lugar de Recolección	56
3.2. Toma de Muestras.....	57
3.2.1 Procedimiento en la Toma de Muestras.....	57
3.2.2 Aislamiento	57
3.2.3. Purificación	58
3.2.4. Inoculación.....	58
3.2.5. Incubación.....	59
3.2.6. Identificación	59
3.2.7. Descripción	60
4. MARCO ADMINISTRATIVO.	61
4.1. Materiales.....	61
• Institucionales	61
• Recursos humanos.....	61
• Recursos Tecnológicos.....	62
4.2. Equipos	62
• Material de laboratorio	62
• Material de aseo	63
• Reactivos	64
• Materiales de campo.....	64
• Materiales de Oficina	64
CAPITULO III	65
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65

3.1 Determinación del hongo Fitopatígeno de Mayor Importancia en la Producción de Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>).	65
3.2 Identificación de signos y síntomas del hongo alternaría en el Cultivo de la Alcachofa (<i>Cynara scolymus</i>).	67
3.3 Caracterización de Macro y Microestructuras del Patógeno.	68
3.3.1. Talo	69
3.3.2. Micelio	70
3.3.3. Conidiofóro	71
3.3.4. Ascosporas	73
3.4 Descripción del ciclo de vida del Patógeno en Condiciones de Laboratorio.	74
3.5 Elaboración de una Guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo (<i>Alternaría cinerariae</i>).	75
CONCLUSIONES:	76
RECOMENDACIONES:	77
GLOSARIO:	78
BIBLIOGRAFÍA	81
ANEXOS	84
Anexo 1. Fotografías de los Materiales y Equipos Utilizados en la Investigación.	84
Anexo 2. Preparación del Medio de Cultivo.	88
Anexo 3. Plantación de alcachofa de donde se obtuvo las muestras del hongo	91
Anexo 4. Cultivo del Hongo	92
Anexo 5. Visita de los miembros del tribunal para observar y ratificar el trabajo realizado en el Laboratorio.	96
Anexo 6. Costos de la Investigación	97

Anexos 7. Guía didáctica de la caracterización morfológica de la (<i>Alternaria cinerariae</i>).....	98
--	----

INDICE DE CUADROS

Cuadro n° 1 Clasificación taxonómica.....	17
cuadro n° 2. Estadísticas de la producción de alcachofas	66

INDICE DE TABLAS

TABLA N° 1 Ubicación Política del lugar de recolección.....	56
TABLA N° 2 Ubicación Geográfica del lugar de recolección	56
TABLA N° 3 Condiciones Edafoclimáticas del lugar de recolección.....	56
TABLA N° 4 Identificación de Signos y Síntomas	67
TABLA N° 5 Caracterización de Macro y Microestructuras	68
TABLA N° 6 Ciclo de Vida Del Hongo en Laboratorio	74

INDICE DE IMÁGENES

IMAGEN N° 1 Talo del Hongo Fitopatógeno (<i>Alternaria cinerariae</i> o peste negra) A. Talo	69
IMAGEN N° 2 Micelio del Hongo Fitopatógeno, A. Hifa, B. Septo o Tabicación	70
IMAGEN N° 3 A. Conidioforo, B. Conidio	72
IMAGEN N° 4 A. Ascospora	73

INDICE DE GRAFICOS

GRÁFICO N° 1 Alternariosis o peste negra.....	19
---	----

RESUMEN

La presente investigación con el tema “**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ALCACHOFA (*Cynara scolymus*), SECTOR ANCHILIVI – COTOPAXI. 2014**”, se realizó en un laboratorio de fitopatología, el objetivo fue caracterizar morfológicamente el hongo que causa mayor impacto en la producción de alcachofa (*Cynara scolymus*), en el sector Anchilivi, cantón Salcedo, provincia de Cotopaxi.

El trabajo realizado mediante técnicas de aislamiento en laboratorio para posteriormente observarle al hongo (*Alternaria cinerariae*), en el microscopio electrónico y así analizar sus estructuras y luego ratificarlo con la bibliografía existente.

Los aspectos fundamentales de esta investigación son; La determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción de Alcachofa (*Cynara scolymus*), la cual se determinó gracias a la revisión y discusión bibliográfica, logrando identificar signos y síntomas del hongo en campo, la técnica utilizada fue la observación directa en el cultivo comparando y ratificando con la fuente citada, permitiéndonos con esto realizar la caracterización de macro y micro estructuras como : Talo, Micelio, Hifa, Septo, Conidióforo, Ascospora, llegando a obtener fotografías digitales con la utilización de un microscopio trinocular y una cámara científica, las mismas que con ayuda de claves taxonómicas existentes se logró ratificar la presencia del agente causal que es la (*Alternaria cinerariae*), y se pudo describir su ciclo de vida en condiciones controladas realizando la siembra y el aislamiento del patógeno con el uso de cajas Petri en un medio de cultivo papa- dextrosa- agar, la cual permaneció en la cámara de incubación por el tiempo de cuatro días a una temperatura de 22°C.

El resultado de esta investigación ha sido consolidado en una guía didáctica de las características morfológicas del hongo (*Alternaria cinerariae*), para difundir los resultados obtenidos.

ABSTRACT

The present research with the theme "MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF MUSHROOMS FITOPATÓGENOS IN THE CULTIVATION OF ARTICHOKE (*Cynara scolymus*), SECTOR ANCHILIVI - COTOPAXI. 2014", was carried out in a fitopatología laboratory, the objective was to characterize the mushroom that causes the greatest impact in the artichoke production morphologically (*Cynara scolymus*), in the sector Anchilivi, canton Salcedo, County of Cotopaxi.

The Work carried out by means insolation techniques in laboratory and then observe to the mushroom (it would *Alternate cinerariae*), in the electronic microscope to analyze their structures and then to ratify it with the existent bibliography.

The fundamental aspects of this research are; The determination of the Mushroom fitopatógenos greater impact in the production of Artichoke (*Cynara scolymus*), which was determined by the revision and bibliographical discussion, achieving identify signs and symptoms of the mushroom in field, the technique used was the direct observation in the cultivation comparing and ratifying with the mentioned source, allowing us with this to carry out the macro and micro structures as: Talo, Micelio, Hifa, Septo, Conidióforo, Ascospora, ending up obtaining digital pictures with the use of a microscope Trinocular and a scientific camera, the same as using existing taxonomic key achieved confirm the presence of the agent which is (it would *Alternate cinerariae*), and it could describe its life cycle under controlled conditions carrying out the sowing and isolation of the pathogen with the use of boxes Petri in a means of cultivation potato - dextrosa - agar, and it remained in the incubation camera for the time of five days to a temperature of 22°C.

The result of this research has been consolidated in a didactic guide of the morphological characteristics of the mushroom (it would *Alternate cinerariae*), to diffuse the results.

INTRODUCCIÓN

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

Este problema de investigación afecta directamente a la población que se dedica a la producción, comercialización y al consumo de este producto acarreando pérdidas económicas ya que se requiere la utilización de agroquímicos para su control y también traen consecuencias negativas para el medio ambiente y su entorno. Las causas del problema básicamente son la desinformación sobre el tema y esto se da porque en nuestro medio no existen referencias bibliográficas sobre los hongos fitopatógenos de mayor impacto económico que afecta al cultivo de alcachofa, los recursos que contamos son los implementos de un laboratorio de microbiología para realizar la identificación, aislamiento y purificación del hongo fitopatógeno.

La limitada información sobre los hongos fitopatógenos y los altos porcentajes en pérdidas en las cosechas provocadas por el ataque de enfermedades causan problemas a los agricultores del sector de Anchilivi, razón por la cual se debe encontrar a los agentes causales de las enfermedades para dar alternativa en el manejo de enfermedades causadas por hongos en este cultivo.

JUSTIFICACIÓN

La presente investigación nace de las necesidades de saber que hongo fitopatógeno existen para apoyar al agricultor en el conocimiento de los mismos ayudando a bajar costos de producción y para disminuir la contaminación ambiental. Este tema de investigación es importante porque conociendo a cabalidad la estructura los hongos fitopatógenos los agricultores y los consumidores de la alcachofa (*Cynara scolymus*) sabrán cómo combatir este mal para evitar problemas económicos ambientales y sociales.

El aporte social de la investigación es dotar de información nueva y necesaria a la población y a los agricultores para que tengan un conocimiento claro y preciso de los hongos fitopatógenos que existen en el cultivo de alcachofa (*Cynara scolymus*) y por lo tanto prevenir de posibles alteraciones en la salud.

Con una adecuada descripción morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de alcachofa (*Cynara scolymus*) reduciremos históricamente las técnicas convencionales de obtener productos contaminados y así el agricultor obtendrá una mayor producción y comercialización para de esta manera aumentar los ingresos económicos teniendo un producto de alta calidad para la exportación.

OBJETIVOS

GENERAL.

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción en el cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus.*), sector Anchilivi. Cotopaxi. 2014.

ESPECÍFICOS

- Determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo
- Identificar signos y síntomas del hongo de mayor impacto a la Alcachofa (*Cynara scolymus*) 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

PREGUNTAS DIRECTRICES

- ¿Se reconocerá signos y síntomas del principal hongo fitopatógeno en el cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus*) en base a la observación Realizada?
- ¿Cuáles es el principal hongo fitopatógeno que afectan a la Alcachofa (*Cynara scolymus*) en el sector de Anchilivi?
- ¿Determinar cuáles son las características de los hongos fitopatógenos encontrados?

CAPITULO I

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 ALCACHOFA (*Cynara scolymus*)

Se tienen noticias de esta planta desde la Antigüedad, aunque se cree que las informaciones sobre la misma están referidas al cardo silvestre (*Cynara scolymus*), de la que derivan los actuales cultivares. Se trata de una planta originaria del Norte de África y Sur de Europa. Durante la época romana se habla de ella como planta cultivada, y a lo largo de los siglos se van cultivando las variedades locales, que son la base de los cultivares actuales (FONNEGRA, 2007).

1.2. Clasificación taxonómica

CUADRO N° 1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Reino	Plantae
División	Magnoliopsida
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Cynara
Especie	C. scolymus

Fuente: (TERRANOVA, 1995)

1.3. Descripción botánica

Raíz.

El sistema radicular es grueso y carnoso, se inserta en un rizoma (tallo hipogeo, horizontal, radiforme con yemas y raíces). (NARVAEZ, 2002).

Tallo.

Son erguidos, gruesos, ramificados y acanalados longitudinalmente, su presencia no es notoria hasta el inicio de la floración. (INFOAGRO, 2003).

Hojas.

Son de tipo aserrado, con bordes provistos de grandes dientes, también pueden ser de tipo oblonga o lobada. (INFOAGRO, 2003).

Flores.

La alcachofa, pertenece a la familia asteraceae cuya característica principal es la de presentar las flores agrupadas a manera de inflorescencia denominada capítulo o cabezuela. (CULTIVOS CONTROLADOS, 2002).

Frutos.

Son aquenios (fruto seco), de forma oblonga, de color grisáceo con manchas pardas o negruzcas, pesando de 600 a 610 gramos. (INFOAGRO, 2003).

1.4. Enfermedades de interés comercial del cultivo de alcachofa.

La presencia de enfermedades en el cultivo de Alcachofa se relaciona con las características climáticas del área de producción. A continuación se detallan las principales enfermedades que afectan al cultivo (GAVIOLA, 2013).

1.4.1. Enfermedad en Estudio (*Alternaria cinerariae*)



GRÁFICO N° 1 Alternariosis o peste negra

Fuente: (LATORRE, 1988)

Taxonomía.-

Reino: Fungí. Phylum: Ascomycota Clase: Deothideomycetes. Orden: Pleosporales. Familia: Pleosporaceae. Género: Alternaria.

Síntomas.-

Los primero síntomas ocurren en las hojas más viejas éstas presentan pequeñas lesiones irregulares de color café oscuro en cuyo interior se forman anillos concéntricos evidentes, debido a los esfuerzos que hace la planta para detener el avance de la infección; las lesiones pueden crecer hasta alcanzar 1.5 cm de diámetro o más. Típicamente, las lesiones se rodean de un color amarillo por la producción de

toxinas, y cuando las lesiones son numerosas se pueden unir, destruir al tejido foliar, y afectar la producción, así como la calidad. (LATORRE, 1988).

Diseminación.-

Se dispersa como conidias transportadas por el viento.

Sobrevivencia.-

Muy posiblemente sobrevive en forma epífita en la Alcachofa u otros cultivos.

Aislamiento.-

El aislamiento del hongo se realizó en cámara estéril con una cámara de flujo laminar marca Microflow, seleccionando bajo lupa binocular secciones muy pequeñas del tejido enfermo y sembrando la porción deseada con ayuda de aguja de disección, previamente flameada, en media de cultivo agarpapadextrosa (PDA), incubando las cajas en condiciones de laboratorio a 22°C. (UNAMUNDO, 1942).

Purificación.-

Los hongos aislados se purificaron haciendo repiques sucesivos de trocitos jóvenes de micelio en places Petri. (CONTRERAS, 1980).

Condiciones predisponentes.-

Temperaturas elevadas, entre 20 y 30° C (ópt. 22° C), elevada humedad relativa (cercana al 80 %). 24 horas de hoja mojada y heridas favorecen las infecciones. (CONTRERAS, 1980).

Control.-

Se sugiere algún fungicida aplicado al follaje tan pronto como se observe los primeros síntomas.

1.5. HONGOS FITOPATÓGENOS

Los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos eucarióticos, esperécenos, sin clorofila. (HERRERA, 1994).

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 clorofila y dependen de una planta hospedera para obtener su alimento. Son más grandes que las bacterias y se identifican con mayor facilidad, algunas de las estructuras que producen se pueden ver a simple vista y sirven en su identificación. (HERRERA, 1994).

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).

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 septados 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).

Los hongos atacan las plantas hospederas susceptibles a través del movimiento de sus estructuras reproductivas. Las esporas se diseminan fácilmente por medios mecánicos, corrientes de aire y el agua, por ejemplo: los hongos se transfieren fácilmente de los sustratos o suelos contaminados a las plantas o partes de estas, por lo que es necesario eliminarlas ya que son fuente de inóculos (transmisores de la enfermedad). (HERRERA, 1994).

Los fungicidas se utilizan para el control de enfermedades causadas por hongos, los hay específicos y de amplio espectro, de contacto y sistémicos (se traslocan por el interior de la planta). (HERRERA, 1994).

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 necrótrofos, en una parte de su ciclo vital requieren una planta huésped pudiendo crecer sobre tejido muerto o producir la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto. Muchas infecciones empiezan con una fase biotrófica que se convierte más tarde en necrotrófica. Algunos hongos son simbioses facultativos, creciendo tanto libres como asociados a plantas, y otros son simbioses obligados, creciendo sólo si están asociados a plantas. (HERRERA, 1994).

1.6 AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATÓGENOS A PARTIR DE PLANTAS ENFERMAS

El aislamiento consiste en el proceso de separación de microorganismos a partir de su sustrato natural (planta) para hacerla crecer en medio de cultivo artificial. El aislamiento y cultivos persiguen distintos fines, el más común en un laboratorio de fitopatología es para diagnosticar la causa de una enfermedad desconocida, sin embargo, puede tener objetivos didácticos o de investigación sobre taxonomía,

fisiología y genética microbiana. Es común también cuando se quiere tener cepas puras, en la evaluación de productos químicos in vitro. (LÓPEZ, 1979)

El cultivo de microorganismos tiene enormes ventajas que contribuyen al conocimiento de la biología de estos. Sin embargo, hay que considerar que al cultivar un organismo: a) puede ocurrir mutaciones, b) se puede perder parcial o totalmente su patogenicidad, c) los hongos puede o no formar cuerpos fructíferos en medios artificiales; estos cuerpos pueden presentar variación, d) existen hongos que no se pueden cultivar (parásitos obligados) y otros que requieren medios complejos para su desarrollo. (LÓPEZ, 1979).

Aislamiento del Patógeno de las hojas

En caso de que la infección de las hojas de una planta avance en forma de tizón o mancha foliar fungosa y en caso de que las esporas del hongo aparezcan sobre su superficie, algunas de esas esporas deben depositarse sobre una caja de Petri que contenga medio de cultivo o bien deben recolectarse con la punta de una aguja estéril o un escalpelo y colocarse sobre la superficie del medio de cultivo. Si el hongo crece en cultivo, al cabo de unos cuantos días aparecerán colonias de micelio aisladas debido a la germinación de las esporas. Éstas se resiembran en placas separadas y de esta forma se asegura que algunas de ellas contengan al patógeno libre de cualquier tipo de contaminante. indica que el método más común para aislar a los patógenos de las hojas infectadas y de otros órganos de la planta es aquel en el que se seleccionan varios cortes pequeños de 5 a 10 mm² a partir del borde de la lesión infectada, a fin de que contenga tejidos enfermos y tejidos al parecer sanos (AGRIOS, 2005).

Aislamiento del patógeno de raíces, tubérculos, raíces carnosas y frutos de hortalizas que se encuentran en contacto con el suelo.

Para el aislamiento, la tierra que se encuentra impregnada en el tejido debe separarse y deben colocarse en una solución de Clorox, varios cortes de tejido obtenidos del borde de las lesiones. Se seleccionan uno por uno los cortes de tejidos en la solución, se sumergen o lavan en agua estéril y se colocan en cajas de Petri que contengan agar. Si el patógeno ha penetrado profundamente en el tejido sano, puede usarse el método descrito anteriormente para tallos y frutos, que consiste en desgarrar los especímenes primero por la parte sana y después por la zona infectada, tomando porciones de tejido del borde de la pudrición (la cual no ha sido expuesta), y colocarlos directamente en el medio de cultivo. (AGRIOS, 2005).

Inducción al desarrollo miceliar

Para que el hongo crezca y esporule sobre medios de cultivos recomendables para los hongos que crecen alrededor del hospedante y 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.

Desinfectar los Muestra.

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 de Petri con PDA, selle la caja con cinta adhesiva e incube de 20 a 25 °C. (AGRIOS, 2007).

Lavado de tejidos afectados.

Partes subterráneas: deben lavarse bajo agua corriente, con la ayuda de un cepillo suave. Para casos difíciles como de algunos Ficomicetes 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, y otros, 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 liquido 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, y otros, 1980).

1.6.1. PURIFICACIÓN DE CEPAS

Es raro que al hacer una siembra o aislamiento, se obtenga solo al hongo deseado, normalmente también microorganismos contaminantes, de los cuales es necesario apartar al organismo de interés. Este proceso se denomina purificación y normalmente consiste en cortar puntas de micelio del borde de la colonia en crecimiento, mediante agujas de disección flameadas. Esta pequeña porción del hongo y agar se depositan en otras cajas con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtienen cultivos puros. (AGRIOS, 2007),

Es aconsejable hacer aislamientos que la muestra sea fresca (pocas horas) y que se siembre a partir del borde de lesiones en crecimiento activo, de lo contrario la purificación se dificulta, en ocasiones es necesario utilizar medios selectivos con antibióticos y fungicidas para purificar cepas. (AGRIOS, 2007) .

Técnicas de purificación

Las técnicas de purificación más utilizadas para la identificación de organismos patógenos dentro del laboratorio son:

Cultivo de punta de hifa

Siembre una porción de hongo en su medio de cultivo en el centro de una placa de un medio con bajo contenido nutricional o en medio agar agua con 3% de agar; adicionándole una sustancia bacteriostática apropiada. En cuanto se desarrollen hifas separadas en el medio, ubique una punta con un microscopio estereoscópico a 80-120 x, o con el objetivo 10x de un microscopio compuesto al cual hayan quitado los objetivos restantes. Corte la hifa detrás de la célula terminal con un bisturí del uso oftálmico desinfectado en alcohol y flameado (sin sostener en una llama). También puede utilizar una navaja de afeitar mantada en una vara de madera o vidrio. Corte un bloque de agar rectangular que contenga la hifa y transfiera a una placa o a un tubo de medio inclinado para que crezca. (FRENCH, y otros, 1980).

Desinfección

Los tejidos enfermos contienen normalmente diversidad de organismos que invaden los tejidos muertos por el patógeno. Estos contaminantes dificultan el aislamiento por lo que generalmente es necesaria una desinfección previa a la siembra. (AGRIOS, 2007).

Entre los desinfectantes más usuales se tiene al:

Hipoclorito de sodio. El desinfectante más usado es el blanqueador de uso doméstico (cloralex), basta mezclar una parte de esta sustancia en 5 partes de agua destilada para obtener el producto deseado ya que el blanqueador viene al 5-6 %, es decir que normalmente se usa hipoclorito al 1-2 %, el tiempo de exposición varía de 30 a 90 segundos; el material viejo o muy contaminado se puede tratar por 2 a 3 minutos siempre que no se elimine el patógeno. (AGRIOS, 2007).

1.7. 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. (CALZADA, 2002),

En cuanto a estructuras vegetativas se debe analizar:

Plasmodio: Se refiere al cuerpo o soma vegetativo de algunos hongos inferiores, el cual está constituido por una masa multinucleada, 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).

1.8. DELIMITACIÓN DE LA ZONA DE MUESTREO

Recolección de muestras de plantas infectadas en el cultivo de alcachofa (*Cynara scolymus*) en el sector de Anchilivi.

1.9. PASOS PARA LA RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Muestreo por cuotas

También denominado en ocasiones “accidental”. Se asienta generalmente sobre la base de un buen conocimiento de los estratos de la población y/o de los individuos más “representativos” o “adecuados” para los fines de la investigación. Mantiene por lo tanto, semejanzas con el muestreo aleatorio estratificado, pero no tiene el carácter de aleatoriedad de aquel. En este tipo de muestreo se fijan una “cuotas” que consisten en un número de individuos que reúnen unas determinadas condiciones. Una vez determinada la cuota se eligen los primeros que se encuentren que cumplan esas características, según (CARASCO, 2008).

Observaciones de muestras

Para la observación de los hongos fitopatógenos se emplean diversas técnicas de preparación de las muestras. Su selección depende de la detención de estructuras como: trozos de micelio, conidios.

En estos casos con un simple raspado de la superficie afectada puede tomarse material para la observación microscópica. Para esta preparación debemos auxiliarnos de instrumentales especializados como pinzas, agujas, escalpelos. (HERRERA, 1994).

Signos y síntomas de hongos patógenos en la planta

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

Los síntomas necróticos más comunes son los siguientes:

Manchas foliares. Lesiones localizadas en las hojas de los hospedantes que constan de células muertas y colapsadas.

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.

Cancro. Herida localizada o lesión necrótica; con frecuencia sumida bajo la superficie del tallo de una planta leñosa.

Muerte descendente. Necrosis generalizada de las ramitas de las plantas que se inicia en sus puntas y avanza hacia su base.

Pudrición de la raíz. Pudrición o desintegración de todo el sistema radical de una planta o parte de él.

Ahogamiento o secadera. Muerte rápida y colapso de plántulas muy jóvenes que se cultivan en el campo o en el almácigo.

Pudrición basal del tallo. Desintegración de la parte inferior del tallo.

Pudriciones blandas y pudriciones secas. Maceración y desintegración de frutos, raíces, bulbos, tubérculos y hojas carnosas de las plantas.

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.

Sarna. Lesiones que se producen sobre el fruto, hojas, tubérculos y otros órganos de las plantas hospedantes, por lo común ligeramente realzadas o bien profundas y agrietadas, lo cual les da una apariencia costrosa.

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.

Los síntomas que se asocian a la hipertrofia o hiperplasia y distorsión de los órganos de las plantas incluyen:

Hernia de las raíces. Raíces alargada en forma de huso o mazo.

Agallas. Porciones alargadas de las plantas que por lo común están llenas del micelio del hongo.

Verrugas. Protuberancias en forma de verruga que se forman sobre los tubérculos y los tallos.

Enchinamiento foliar. Deformación, engrosamiento y Enchinamiento de las hojas.

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.

Roya. Muchas lesiones pequeñas, por lo común de color rojizo, que aparecen sobre las hojas o el tallo de las plantas.

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, esporoforos, 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 blanquizco del micelio del hongo sobre las hojas, frutos o tallos de la planta, mientras que los síntomas consiste en lesiones necróticas o cloróticas que aparecen sobre las hojas, frutos y tallos, crecimiento deficiente de la planta, etc. (AGRIOS, 1999).

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 aun 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. (AGRIOS, 1999)

La conservación y el almacenamiento de las muestras hasta su llegada al laboratorio deben tenerse muy en cuenta; para ello se aconseja el empleo de envases que no acumulen excesiva humedad y eviten la proliferación de organismos secundarios, así como mantener las muestras, de ser posible bajo temperaturas que inhiban el desarrollo de microorganismos. (AGRIOS, 1999)

El empleo de técnicas de herborización natural le permite en algunas circunstancias y por algunas enfermedades causadas por hongos, conservar las muestras inalterables durante largo tiempo, como ocurre en numerosas enfermedades foliares. (HERRERA, 1994).

1.9.1. 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).

Representatividad de la muestra

Una muestra representativa es la parte o partes de la afectada que presenta la manifestación o manifestaciones (síntomas y signos) principales de la enfermedad que se pretende identificar. Si la afección en las hojas, el tallo, los frutos por las raíces deben tomarse estos órganos de la planta de manera que se represente la situación real que ocurre en el campo. En ocasiones cuando se tienen dudas sobre este punto, se aconseja tomar la planta en su totalidad con muestras a analizar. Esta última situación es frecuente encontrarla en plantas anuales como hortalizas, leguminosas, cereales, etc. (HERRERA, 1994).

1.10 PASOS PARA EL AISLAMIENTO DE PATÓGENOS.

El microorganismo debe aislarse en cultivo puro y deben establecerse sus características físicas. (CHARLES, 2008).

Para la ejecución del segundo postulado se debe plantear la necesidad de la asociación constante de un agente biótico con el hospedero enfermo, para proceder luego a su aislamiento, su caracterización y su cultivo in vitro en ausencia de otros microorganismos (purificación). (CHARLES, 2008),

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, por lo que irreversiblemente se debe complementar una serie de postulados establecidos por el

bacteriólogo alemán Roberto Koch y que son conocidos hoy en día como los postulados de Koch. (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).

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 un organismo causantes, sin la presencia de otros microorganismos contaminantes. Como ejemplo de este tipo de situación puede citarse el caso de los mildius y carbones, que fructifican profundamente sobre tejidos afectados. Las royas, que fructifican también abundantemente, son difíciles de aislar in vitro. 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 y del sustrato o planta hospedante en que se desarrolló. Tal es el caso de la mayoría de los hongos fitopatógenos del suelo. El autor antes mencionado indica que en otras ocasiones numerosos hongos que producen estructuras reproductoras sobre el sustrato natural que parasitan no lo hacen en medios artificiales, por lo que para su identificación hay que prescindir de métodos de aislamientos. El aislamiento de los hongos productores de micelio aéreo esporogeno 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 20 y 30 °C. En caso de que determinados microorganismos saprofitos crezcan a mayor velocidad y cubran la superficie del tejido enmascarando el verdadero agente causal, debe procederse a la desinfección superficial con hipoclorito de sodio al 1%, antes de colocar en la cámara húmeda dos pedazos del tejido enfermo. Para el aislamiento de hongos presentes en el interior de la planta (haces vasculares, frutos, tubérculos) 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).

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).

1.11. MEDIOS DE CULTIVOS USADOS EN EL AISLAMIENTO DE HONGOS

Los medios de cultivo utilizados habitualmente que se encuentran en el mercado son:

Otros medios de cultivos como agar harina de avena (OA), agar clavel (CLA), agar arena, agar nutriente sintético (SNA), medio de agar extracto de malta (AEM),

se suelen utilizar en laboratorios especializados. La temperatura habitual de incubación de los hongos es entre 20 y 28 °C. (MANZÓN, 2005).

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. (MANZÓN, 2005).

AGAR AGUA ACIDIFICADO (AAA) O “Triple A”. Apropiado para aislar algunos hongos radiculares, vasculares y foliares. La acidez y la carencia de contenido nutritivo inhiben el crecimiento de bacterias. Los hongos se extienden en crecimiento ralo pero comúnmente “rápido” utilizando el tejido sembrado como fuente de nutrición. (MANZÓN, 2005).

AGAR PAPA SACAROSA ACIDIFICADO (APSA). Este medio, que inhibe la multiplicación de las bacterias, es de uso generalizado para el aislamiento de los hongos a partir de tejidos enfermos. Si se reduce a la mitad la cantidad de azúcar, generalmente se produce un crecimiento más ralo y fácil de observar, y una esporulación más rápida, factores que facilitan la identificación de hongos. (MANZÓN, 2005).

1.11.1. MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE HONGOS

La gran diversidad genética del Reino Fungí ha creado la necesidad de establecer estrategias de conservación a largo plazo, dichas estrategias no se deben restringir a coleccionar y conservar el germoplasma, sino que debe incluir un manejo eficiente del material para documentar, caracterizar y evaluar la variabilidad (FERNÁNDEZ, y otros, 2005).

Para el establecimiento de una estrategia de conservación de hongos. Se debe considerar que: todos los cultivos se mantengan vivos y puros, que cada cepa permanezca estable morfológicamente y genéticamente. Además, se debe tomar en cuenta los objetivos de la conservación, las metodologías propuestas y los recursos económicos disponibles, por último, es importante considerar que cada cepa debe conservarse al menos por dos métodos de preservación, uno de los cuales debe ser a largo plazo.

1.11.2. LAS TÉCNICAS, MÁS USUALES DE CONSERVACIÓN

Cultivos en cuñas de agar

También llamado tubos con agar inclinado.

Consiste en simular las condiciones naturales para lograr un desarrollo completo del hongo. Esto se logra mediante la preparación de medios de cultivo estériles a base de agar, con la adición de nutrientes como los jugos vegetales y extractos naturales, así como también compuestos sintéticos de composición conocida. (KIRSOP, 1991).

Los tubos llenos con medio de cultivo esterilizado, todavía líquido, se colocan en una posición inclinada, de tal forma que se forme una capa de aproximadamente 3 cm y una superficie inclinada de iguales dimensiones. El medio de cultivo se deja solidificar en la posición lograda. (MERCK, 2007).

1.12. PASOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS FITOPATÓGENOS.

Observaciones de Hongos

Para la observación de hongos fitopatógenos se emplean diversas técnicas de preparación de las muestras. Su selección depende de la detección de estructuras tales como: trozos de micelio, conidios, cuerpos fructíferos. En estos casos con un simple raspado de la superficie afectada puede tomarse material para la observación microscópica. Para esta preparación debemos auxiliarnos de instrumentales especializados como pinzas, agujas, escalpelos, etc. (HERRERA, 1994).

Cuando no se observa ningún tipo de estructuras sobre la superficie de las partes afectadas deben procederse a la realización de preparaciones del tejido para localizar en el interior de estos el agente causal. Para ello se dispone de varios métodos a seguir según las características del tejido de la planta hospedante y que puede ser: cortes histológicos, disgregación de tejidos, extracción de estructuras de parásitos, etc. (HERRERA, 1994).

Observaciones Microscópicas

Las primeras observaciones que se deben realizar en el estudio de la sintomatología pueden llevarse a cabo mediante el empleo de lentes de aumentos comprendido entre 5 y 20x, ya sea manuales o de soporte para determinar las características macroscópicas de los síntomas, en especial lo referente a configuración, coloración, presencia de cuerpo o estructura del posible organismo patógeno. Es también aconsejable la observación por microscopio binocular dotado de iluminación, superiores a los lentes y lupas. En estas observaciones se pueden determinar la presencia de cueros fructíferos (en el caso de los hongos), como son acérvulos. Además de los micelios, conidios y otras formas. Con frecuencia no se observa ningún tipo de estructura que permita dar un indicio sobre la etiología de la

enfermedad, por lo que llegado a este punto el especialista debe discernir según los datos obtenidos y por su propia experiencia, que vía debe continuar, definiendo qué tipo de determinaciones de laboratorio debe realizarse. Para ello hay que tener en cuenta la posible naturaleza del agente causal. (HERRERA, 1994).

1.12.1. CLASIFICACION DE LOS HONGOS FITOPATOGENOS

Los hongos que producen enfermedades en las plantas constituyen un grupo diverso y, debido a su abundancia y diversidad, aquí solo se presentaran una clasificación superficial de algunos de los géneros fitopatógenos más importantes. Los hongos pertenecen al reino (Fungi). (HERRERA, 1994).

Hongos Inferiores

Clase: Myxomycetes (mohos mucilaginosos). Carecen de micelio. Su forma es un plasmodio amorfo y desnudo.

Orden: Physarales. Forman un plasmodio saprofita que produce cuerpos fructíferos costrosos que contienen esporas. Producen zoosporas.

Género: fuligo, mucílago y physarum producen mohos mucilaginosos en plantas de poca altura.

Orden: Plasmodiophorales. Los plasmodios se forman en el interior de las células de las raíces y tallos de las plantas. Producen zoosporas.

Géneros: Plasmodiophora. *P. brassicae* produce la hernia de las crucíferas.

Polymyxa. *P. graminis* parasita al trigo y a otros cereales.

Spongoporas. *S. subterranea* produce la sarna polvorienta de los tubérculos de papa.

Urophlyctis. *U. alfalfae* produce la verruga de la corona de la alfalfa.

Clase: Phycomycetes (hongos algaceos); hongos inferiores verdaderos.

Subclase: Chytridiomycetes.- Tiene un micelio redondeado o alargado que carece de septos.

Orden: Chytridiales. Tienen pared celular pero carecen de un micelio verdadero; la mayoría de ellos forman un rizomicelio y producen zoosporas.

Géneros: *Olpidium*. *O. brassicae* parasita las raíces de la col y de otras plantas.

Physoderma. *P. maydis* produce la mancha parda del maíz.

Synchytrium. *S. endobioticum* produce la verruga de la papa.

Urophlyctis. *U. alfalfae* produce la verruga de la corona de la alfalfa.

Subclase: Oomycetes (mohos acuáticos, royas blancas y mildius). Tienen un micelio alargado. Producen zoosporas en zoosporangios. Las oosporas se forman por la fusión de gametos morfológicamente distintos.

Orden: Saprolegniales. Tienen un micelio bien desarrollado. Las zoosporas se forman en largos zoosporangios cilíndricos que se encuentran fijos al micelio, forman oosporas.

Género: *Aphanomyces* ocasiona la pudrición de la raíz de varias hortalizas.

Orden: Peronosporales. Los esporangios (por lo común, zoosporangios) se forman en las puntas de las hifas y quedan libres. Forman oosporas.

Familia: Pythiaceae.

Géneros: *Phythium* produce el ahogamiento de las plántulas, pudriciones de semillas y raíces y el tizón algodonoso de los céspedes.

Phytophthora. *P. infestans* produce el tizón tardío de la papa y otras especies producen la mayoría de las pudriciones de la raíz.

Familia: Albuginaceae (royas blancas).

Género: *Albugo*. *A. candida* produce la roya blanca de las crucíferas.

Familia: Peronosporaceae (mildius)

Género: *Plasmopara*. *P. Vitícola* produce el mildiu de vid.

Peronospora. *P. nicotianae* produce el mildiu (moho azul) del tabaco.

Bremia. *B. lactucae* produce el mildiu de la lechuga.

Sclerospora. *S. graminicola* produce el mildiu de las gramíneas.

Pseudoperonospora. *P. cubensis* produce el mildiu de las cucurbitáceas.

Subclase: *Zigomycetes* (Mohos del pan). Hongos terrestres. Producen esporas asexuales no móviles en esporangios. No forman zoosporas. Su espora de resistencia es una zigospora que se forma por la fusión de un par de gametos morfológicamente idénticos.

Orden: *Mucorales* producen zigosporas. Las esporas asexuales no móviles se forman en esporangios terminales.

Géneros: *Rhizopus* produce la pudrición blanda de los frutos y hortalizas.

Choanephora. *C. cucurbitarum* produce la pudrición blanda de la calabaza.

Hongos Superiores

Clase: *Ascomycetes* (hongos de saco). Producen grupos de ocho esporas asexuales, denominadas ascoporas, en el interior del asca.

Subclase: *Hemiascomycetes*. Con ascas desnudas que no se forman en ascoporas.

Orden: Taphrinales. Las ascas se forman a partir de células ascogenas binucleadas.

Género: Taphrina. Produce el enrizamiento de las hojas del durazno, abolsamiento del ciruelo, la verruga foliar del roble, etc.

Subclase: Euascomycetes. Las ascas se forman en ascocarpos.

Serie: Pyrenomycetes (hongos periteciales). Las ascas se forman en cuerpos fructíferos totalmente cerrados (cleistotecios) o en cuerpos fructíferos que presentan una abertura (peritecios).

Orden: Erysiphales (cenicillas). El micelio y los cleistotecios se forman sobre la superficie de la planta hospedera.

Géneros: Erysiphe produce la cenicilla de las gramíneas, cucurbitáceas, etc.

Microsphaera; una especie produce la cenicilla de la lila.

Podosphaera. P. leucotricha produce la cenicilla del manzano.

Sphaerotheca. S. pañosa produce la cenicilla del rosal y del durazno.

Umicinula. U. necator produce la cenicilla de la vid.

Orden: Sphaeriales. Los peritecios poseen paredes firmes y colores oscuros.

Géneros: Ceratocystis. C. ulmi produce la enfermedad del olmo holandés.

Diaporthe produce el tizón de la vaina del fríjol, la melanosis de los cítricos y la pudrición del fruto de la berenjena.

Endothia. E. parasitica produce el tizón del castaño.

Glomerella. G. cingulata produce muchas antracosis y la pudrición amarga del manzano.

Gnomonia produce la antracosis o mancha foliar de varias plantas.

Rosellinia produce las enfermedades de la raíz de la vid y de los árboles frutales.

Valsa produce el cáncer del durazno y de otros árboles.

Xylaria produce el cáncer de los árboles y la pudrición de la madera.

Orden: Hypocreales. Los peritecios son de colores claros, rojos o azules.

Géneros: Claviceps. C. purpúrea produce el cornezuelo del centeno.

Gibberella ocasiona la pudrición del pie o tallo del maíz y de pequeños granos.

Nectria produce el cáncer del tallo y ramas de los árboles.

Serie: Pseudosphaeromycetes (hongos ascostromaticos). Presentan estromas en forma de peritecio que presentan ascas en cavidades separadas o en grandes cavidades.

Orden: Myriangiales. Con cavidades dispuestas a varios niveles y que contienen ascas individuales.

Género: El signo produce las antracnosis de la vid y de la frambuesa y la sarna de los cítricos.

Orden: Dothideales. Con cavidades dispuestas en una capa basal, las cuales contienen muchas ascas. Los peritecios carecen de pseudoparafisas.

Géneros: Dibotryon. D. morbosum produce la nodulación negra de las ramas en cerezos y ciruelos.

Dothidella. D. ulmi ocasiona la mancha foliar de los árboles del caucho.

Gugnardia. G. bidwelli produce la pudrición negra de las uvas.

Mycosphaerella produce las manchas foliares de muchas plantas.

Orden: pleosporales. Con cavidades dispuestas en una capa basal, las cuales contienen muchas ascas. Los peritecios presentan pseudoparafisas.

Géneros: *Ophiobolus*. *O. graminis* produce la enfermedad del pie de trigo.

Phylospora. *P. obtusa* produce la pudrición negra de la manzana.

Venturia. *V. inaequalis* ocasiona la roña de la manzana.

Serie: Discomycetes (hongos de copa). Las ascas se forman en la superficie de apotecios carnosos en forma de copa o de plato.

Orden: Helotiales. Las ascas liberan sus esporas a través de una perforación apical o circular.

Géneros: *Coccomyces*. *C. hiemalis* produce la mancha foliar del cerezo.

Diplocarpon. *D. rosae* produce la mancha negra de las rosas.

Lophodermium produce el tizón de las agujas del pino.

Monilinia. *M. fructicola* produce la mancha parda de los frutos de hueso.

Rhytisma. *R. acerium* produce la mancha alquitranada de las hojas del arce.

Sclerotinia. *S. sclerotiorum* produce la pudrición blanda aguanosa de las hortalizas.

Orden: pezizales. Las ascosporas se liberan a través de una estructura en forma de tapa o capsula que se localiza en la punta del asca.

Género: pseudopeziza. *P. medicaginis* produce la mancha foliar de la alfalfa.

Clase: Fungi imperfecta o Deuteromycetes (hongos asexuales). Carecen de estructuras o reproducción sexuales o no se sabe que las presenten.

Orden: Sphaeropsidales. Las esporas asexuales se forman en picnidios.

Géneros: *Ascochyta*. *A. pisi* produce el tizón del tallo de la frambuesa.

Cytospora ocasiona el cáncer del durazno y otros árboles. (*Valsa* representa su etapa sexual).

Diplodia. *D. zeae* produce la pudrición del talo y la mazorca del maíz.

Phoma. *P. lingam* ocasiona la pierna negra de las crucíferas.

Phomopsis produce al tizón y el cáncer del tallo de varios árboles.

Phyllosticta produce las manchas foliares de muchas plantas.

Septoria. *S. apti* produce el tizón tardío del apio.

Orden: Melanconiales. Las esporas asexuales se forman en un acérvulos.

Géneros: *Colletotrichum* ocasiona la antracnosis de muchas plantas de cultivo.

Coryneum: *C. beijerincki* produce el tizón de los frutos de hueso.

Cylindrosporium produce manchas foliares en muchas clases de plantas.

Gloeosporium muy parecido (si no idéntico) a *Colletotrichum*; produce antracnosis en muchas plantas.

Marssonina ocasiona el tizón de las y hojas del álamo, la quemadura de las hojas de fresa y la antracnosis de los nogales.

Melanconium. *M. fuligenum* produce la pudrición amarga de la vid.

Sphaceloma produce la antracnosis de la vid y de la frambuesa y la sarna de los cítricos del aguacate.

Orden: Moniliales. Las esporas asexuales se forman sobre las hifas (o en su interior) del hongo que se encuentran expuestas libremente a la atmósfera.

Géneros: *Alternaria* produce manchas foliares y tizones en muchas plantas.

Aspergillus produce la pudrición de las semillas almacenadas.

Botrytis. *B. cinerea* produce el moho gris y los tizones de muchas plantas.

Cercospora; una especie de este género produce el tizón temprano del apio.

Cladosporium. *C. fulvum* produce el moho de las hojas del tomate.

Fusarium produce el marchitamiento y la pudrición de la raíz de muchas plantas anuales, así como el cáncer de árboles forestales.

Fusicladium produce la roña de la manzana (venturia representa su etapa sexual).

Graphium. *G. ulmi* produce l enfermedad del olmo holandés

(Ceratocystis representa su etapa sexual).

Helminthosporium produce el tizón de los cereales y enfermedades de los céspedes.

Penicillium produce la pudrición de los frutos y otros órganos carnosos debido a los mohos azules.

Phymatotrichum. *P. omnivorum* produce la pudrición de la raíz del algodónero y otras plantas.

Pyricularia produce el tizón del arroz y la mancha gris foliar de los céspedes.

Strumella produce el cáncer del roble.

Thielaviopsis. *T. básico* la produce la pudrición negra de la raíz del tabaco.

Verticillium produce la marchitez de muchas plantas anuales y perennes.

Orden: Mycelia Sterilla. No se ha observado o es muy poco frecuente la formación de esporas asexuales o sexuales en este grupo de hongos.

Géneros: Rhizoctonia produce las pudriciones de la raíz de la corona de las plantas anuales y mancha parda de los céspedes (su etapa perfecta corresponde a Thanatephorus).

Sclerotium produce las pudriciones de la raíz y del tallo de muchas plantas (su etapa perfecta corresponde a Pellicularia).

Clase: Basidiomycetes (hongos en forma de mazo). Las esporas sexuales, denominadas basidiosporas o esporidios, se forman externamente sobre una estructura (denominada basidio) constituida por una o cuatro células.

Subclase: Heterobasidiomycetes (royas y carbones). El basidio presenta septos y equivale al promicelio de una teliospora. Estas se encuentran solas o se unen a manera de columnas o costras, permaneciendo en los tejidos del hospedero o interrumpiendo a través de su epidermis.

Orden: Ustilaginales. La fecundación se efectúa de esporas, hifas, etc., que sean compatibles. Solo producen teliosporas.

Géneros: *Sphacelotheca*; varias especies de este género producen el carbón volador del sorgo.

Tilletia; varias especies producen el añublo o carbón apestoso del trigo.

Urocystis. *U. cepulae* produce el carbón de la cebolla.

Orden: Uredinales. Las células espermáticas denominadas espermacios o picniosporas fecundan a las hifas receptoras especializadas que contienen los espermagonios (picnios). Producen aeciosporas, uredosporas (esporas repetidoras), teliosporas y basidiosporas.

Géneros: *Cronartium*. *C. ribicola* produce la roya vejigosa blanca del pino.

Gymnosporangium. *G. juniperi-virginianae* produce la roya del manzano cedro.

Melampsora. *M. lini* produce la roya del lino.

Phragmidium; una de sus especies produce la roya de las rosas.

Puccinia; varias especies producen la roya del fríjol.

Subclase: Homobasidiomycetes (hongos de la pudrición de la raíz y de la descomposición de la madera). Basidios sin septos. El basidiocarpo puede o no estar presente. Incluyen las setas, los hongos repisa, los bejines, etc.

Serie: Hymenomycetes. Los basidios se forman en un himenio que se expone al aire antes de que las esporas se desprendan de los esterigmas.

Orden: Exobasidiales. Carecen de basidiocarpos: los basidios se forman sobre la superficie de los tejidos parasitados del hospedero.

Géneros: Corticium; una de las especies produce la enfermedad del filamento rojo de los céspedes.

Exobasidium produce agallas en tallo, hojas y flores de las plantas de ornato.

Orden: polyporales. El himenio reviste las superficies de pequeños poros o tubos.

Géneros: Fomes produce la pudrición del corazón de muchos árboles.

Pellicularia (Sclerotium) produce las pudriciones el tallo y la raíz de muchas plantas.

Polyporus produce las pudriciones del tallo y de la raíz de muchos árboles.

Poria produce las pudriciones de la madera y de la raíz de árboles forestales.

Stereum produce la descomposición de la madera y la enfermedad de la hoja plateada de los árboles.

Thanatephorus (Rhizoctonia) produce pudriciones del tallo y la raíz de muchas plantas anuales y mancha parda de los céspedes.

Typhula; una de sus especies produce el moho nevado o tizón de los céspedes.

Orden: Agaricales. El himenio se localiza sobre barbas irradiantes o laminillas.

Géneros: Armillaria. A. mellea produce pudrición de, las raícesde árboles frutales y forestales.

Lenzites produce la pudrición parda de las coníferas y descomposición de los productos de la madera.

Marasmius produce la enfermedad anular falsa de los céspedes.

Peniophora produce la descomposición del tronco y la madera de pulpa de las coníferas.

Pholiota produce la pudrición parda de la madera de árboles forestales deciduos.

Pleurotus produce la pudrición blanca de la mayoría de los árboles forestales deciduos.

Schizophyllum produce la pudrición blanca de los árboles forestales deciduos.

1.12.2 ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

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 sexualmente 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 producen esporas flageladas, denominadas zoosporas. Estas zoosporas se encuentran contenidas en cuerpos fructíferos denominados zoosporangios.

Clase: Zigomycetes: Esta clase de hongos Produce esporas asexuales no móviles contenidas en cuerpos fructíferos denominados esporangios. Sexualmente producen esporas denominadas zigosporas.

Hongos Superiores

Estructuras representativas de la clase Ascomycetes.

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.

Clase: Basidiomycetes La clase Basidiomycetes se caracteriza por tener micelio tabicado y reproducirse sexualmente mediante la producción de basidiosporas. Estas son producidas exógenamente sobre una estructura llamada basidio. Los basidios pueden ser septados o no.

Clase: Deuteromicetes: 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 18 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.

1.13. OBSERVACIONES DE HONGOS

Para la observación de hongos fitopatógenos se emplea diversas técnicas de preparación de las muestras. Su selección depende de la detención de estructuras tales como: trozos de micelio, conidios, cuerpos fructíferos).

En estos casos con un simple raspado de la superficie afectada puede tomarse material para la observación microscópica. Para esta preparación debemos auxiliarnos de instrumentales especializados como pinzas, agujas, escalpelos, etc. (HERRERA, y otros, 1994).

Cuando no se observa ningún tipo de estructuras sobre la superficie de las partes afectadas deben procederse a la realización de preparaciones del tejido para localizar en el interior de estos el agente causal. Para ello se dispone de varios métodos a seguir según las características del tejido de la planta hospedante y que puede ser: cortes histológicos, disgregación de tejidos. (HERRERA, 1994).

Observaciones microscópicas

Las primeras observaciones que se deben realizar en el estudio de la sintomatología pueden llevarse a cabo mediante el empleo de lentes de aumentos comprendido entre 5 y 20x, ya sea manuales o de soporte para determinar las características macroscópicas de los síntomas, en especial lo referente a configuración coloración presencia de cuerpo o estructura del posible organismo patógeno. Es también aconsejable la observación por microscopio binocular dotado de iluminación, superiores a los lentes y lupas. En estas observaciones se pueden determinar la presencia de cueros fructíferos (en el caso de los hongos). Además de los micelios conidios y otras formas. Con frecuencia no se observa ningún tipo de estructura que permita dar un indicio sobre la etiología de la enfermedad, por lo que llegado a este punto el especialista debe discernir según los datos obtenidos y por su propia experiencia que vía debe continuar, definiendo que tipo de determinaciones de laboratorio debe realizarse. Para ello hay que tener en cuenta la posible naturaleza del agente causal. (HERRERA, 1994).

CAPITULO II

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

CONCEPTUALIZACION	INDICADOR	INDICE	TECNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de alcachofa	Talo	Tipo	Observación	Microscopio
	Micelio	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

Fuente: Autor

2.2. DISEÑO METODOLÓGICO.

2.2.1. Tipo de investigación

2.2.2. Investigación Descriptiva

La metodología descriptiva puntualiza como se ocasionaron los fenómenos a investigar, se ocupa de la descripción de datos y características de una población. Esta investigación se realizó dentro del tipo descriptiva, Porque para su desarrollo necesita ser descrito sigilosamente y para el avance de la investigación se empleará este tipo porque permitirá recopilar información de las características

morfológicas que presentan los Hongos permitiendo Identificar a los Hongos fitopatógenos. Además de ser descriptiva por los resultados que serán procesados y colocados de tal Modo que se puedan analizar y discutir y puntualizar como se ocasionaron los fenómenos a investigar, con el fin de evaluar aspectos relevantes que ayudaran a desarrollar la investigación.

2.2.3. Métodos

2.2.3.1. Método descriptivo analítico

Utilizamos este método en esta investigación porque vamos a describir los hongos fitopatógenos encontrados en la muestra recogida en el cultivo y por ende vamos a analizar la muestra recogida para poder confirmar los hongos fitopatógenos identificados.

2.2.3.2. Método deductivo

Es aquel que parte de hechos o fenómenos generales que permite establecer conclusiones o consecuencias en las que se busca casos particulares sobre la cual se basa una afirmación.

Para el avance de la investigación se empleará este método porque permitirá recopilar información de las característica morfológicas que presentan los Hongos permitiendo Identificar a los Hongos fitopatógenos en el cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus*).

2.2.3.3. Método comparativo

Es un procedimiento de búsqueda sistemática de similitudes con el objeto de estudiar su parentesco.

Sólo tenemos una manera de demostrar que un fenómeno es causa de otro; es comparar los casos en que están simultáneamente presentes o ausentes y buscar si las variaciones que presentan en estas diferentes combinaciones de circunstancias prueban que uno depende del otro.

2.2.4. Técnicas

2.2.4.1. Observación

Consiste en observar desde el lugar de los hechos, todos los sucesos de manera directa y abierta con el propósito de obtener información de primera mano del fenómeno que se investiga.

La observación permitirá conocer la realidad en la que se desarrollan los Hongos, además permitirá observar los signos y síntomas que presenta el cultivo. Como instrumento se utilizará cuaderno de campo con el fin de apuntar todos los sucesos observados.

2.2.4.2. Fichaje

El fichaje consiste en la recolección y organización de la información usando fichas, tradicionalmente en tarjetas como trozos rectangulares de papel.

Observación científica, fichaje, La observación permitirá Conocer la realidad en la que se desarrollan los Hongos, además permitirá observar los signos y síntomas que presentan en el cultivo y poder confirmar en una planta sana.

3. METODOLOGÍA

3.1. En campo

- **Delimitación del Lugar de Recolección**

Las muestras se recolectaron en el sector Anchilivi, que está ubicado en la parte Nororiental de la ciudad de Salcedo.

TABLA N° 1 Ubicación Política del lugar de recolección

País	Ecuador
Provincia	Cotopaxi
Cantón	Salcedo
Barrio	Anchilivi

Fuente: Autor

TABLA N° 2 Ubicación Geográfica del lugar de recolección

Latitud	34° 37' 56.1788" S
Longitud	58° 24' 30.4646" W
Altitud	2800 m.s.n.m

Fuente: Universidad Técnica de Cotopaxi

TABLA N° 3 Condiciones Edafoclimáticas del lugar de recolección

Temperatura anual media (°C)	Fluctúa entre los 13.0 – 19
Humedad Relativa (%)	60
Precipitación anual (mm)	400 – 500
Luminosidad	De 8 a 9 horas diarias

Fuente: (INAMHI).

3.2. Toma de Muestras

Realice la toma de muestras al Azar del hongo Fitopatógeno (*Alternaria cinerariae*) en el cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus*), para trasladar las muestras al laboratorio para su respectiva descripción.

3.2.1 Procedimiento en la Toma de Muestras

Realice la extracción plantas afectadas utilizando un bisturí o tijeras en cada corte se procederá a esterilizar los materiales con alcohol y las muestras vegetales se envasarán en bolsas de papel para que el exceso de humedad sea absorbido por el papel, posteriormente se procederá a colocar en una funda ziplop con su respectiva codificación y se trasladara en una hielera para evitar la deshidratación de las muestras.

3.2.2 Aislamiento

Se Realizó diferentes tipos de aislamientos según se presente el caso tales:

Aislamiento directo. Observe al microscopio de disección el ejemplar enfermo; si encuentra fructificaciones, micelio. Tome una muestra de este material con una aguja de disección estéril y colóquelo directamente sobre el medio de cultivo solidificado. Incube de acuerdo al tipo de hongo.

Cámara húmeda. Cuando la planta presenta micelio y no hay fructificaciones o cuando no se aprecia el crecimiento del patógeno, se recurre al uso de la cámara húmeda. Tome porciones de tejido enfermo y se procedió a lavar en agua corriente, seguido se secó los tejidos con papel absorbente, y posteriormente se desinfecto en una solución 2:1 de cloro, lave dos veces con agua destilada estéril y se eliminara excesos de agua, en el interior de una caja de Petri estéril que contenga papel filtro

esterilizado, finalmente en un dispositivo para cámara húmeda se colocó pequeños trozos del vegetal enfermo lavados desinfectados, secos y cerraremos totalmente la caja, se humedece con agua destilada estéril. Se incuba de acuerdo a las necesidades del hongo, y caracterice el patógeno que se desarrolla durante este tiempo de observación y anotaremos estos resultados en la libreta de laboratorio.

Partes vegetales en medio de cultivo. Procedí a tomar porciones de tejido enfermo a continuación se lavara en agua corriente, se procederá a secan los tejidos con papel absorbente, y por último se desinfectara en una solución 2:1de cloro, se lavan dos veces con agua destilada estéril y se eliminan excesos de agua, colocaremos el interior de una caja de Petri estéril que contenga papel filtro esterilizado, este material lavado, desinfectado y seco se colocó en cajas con PDA. Se incuba a 22°C y se observa se observa durante los siguientes 4 días, caracterice al patógeno que se desarrolla durante este tiempo de observación.

3.2.3. Purificación

Se Procedió al Aislamiento y concentración de partículas virales en forma pura, libre de los componentes celulares.

3.2.4. Inoculación

Se procedió a inocular los posibles hongos fitopatógenos en medio de cultivo, bajo condiciones controladas de esterilidad y asepsia. Se esterilizara los materiales a utilizar.

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

3.2.5. Incubación

Para la incubación la caja Petri se colocó en la incubadora a una temperatura de 22°C y 70% de humedad relativa, durante 4 días aproximadamente según tengamos el desarrollo de los micelios del hongo.

3.2.6. Identificación

Observación microscópica

Técnica de cinta pegante: Se procedió a realizar un doblado de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostendrá con una pinza. Con el lado adhesivo se tomara con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después colocaremos una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procederá a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 20x y 100x.

Montaje por disección: Con un asa estéril (o una aguja de disección), se tomó una pequeña muestra del hongo y se colocará en un portaobjetos con una gota de agua destilada, con el mismo asa se extenderá el micelio, se colocará el cubreobjetos y procederemos a observar al microscopio de 20x y 100x.

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

Dentro de la cámara de flujo laminar, con la ayuda de un bisturí estéril, uno de los cuadros de PDA se transfiere al portaobjetos que está en la cámara de microcultivo; este portaobjetos debe de estar sobre el triángulo de vidrio.

Con la aguja de disección estéril o con un asa bacteriológica estéril se lleva el inóculo a las orillas superiores e inferiores del cuadro de PDA.

Se coloca el cubre objetos sobre el cuadro de PDA inoculado, procurando que quede bien centrado.

Se agregan 2ml de agua estéril, en el fondo de la cámara de microcultivo para mantener la humedad, sin mojar el área de crecimiento del hongo. Los pasos 1-5 se llevan a cabo en el interior de una campana de flujo laminar o en mesas de trabajo en condiciones asépticas.

Se sella la caja Petri del microcultivo con el Parafilm y se rotula.

El crecimiento del hongo se detiene cada 24,

Se repiten los pasos del 1 al 7 para mas microcultivos, y detener su desarrollo a la 48, 72 y 96 horas. Respectivamente.

3.2.7. Descripción

Identificación morfológica de hongos fitopatógenos: Para esto se utilizó el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas. (FINCH, 1985)

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:

Se prepararon las cajas petris con las cepas de hongos aislados.

Se tomó un trozo de cinta masking transparente de seis cm. De largo y se fijó en el cuerpo fructífero, tomando directamente de la caja Petri, donde se encuentran las cepas puras.

Se observó al microscopio con objetivo de adecuados y se procederá a tomar fotografías microscópicas de las diferentes estructuras con una cámara.

Se creó un archivo con las fotografías tomadas de las cepas

Este, se realizó un cuadro comparativo con el hongo re-aislados, para ver si es el mismo hongo que se inoculo.

4. MARCO ADMINISTRATIVO.

4.1. Materiales

- **Institucionales**

Universidad Técnica de Cotopaxi

Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales

Carrera de Ingeniería Agronómica

- **Recursos humanos**

Autor: Miño Gallardo Oswaldo Antonio

Directora de tesis: Ing. Guadalupe López Mg.

Miembros del tribunal:

Ing. Karina Marín Mg.

Ing. Santiago Jiménez

Ing. David Carrera

- **Recursos Tecnológicos**

4.2. 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

- **Material de laboratorio**

Micro tubos

Goteros de plástico

Papel aluminio

Pizeta

Marcadores permanentes

Aguja de disección

Asa de siembra

Reposeros plásticos con tapa

Cajas Petri

Papel absorbente

Parafilm de laboratorio

Portaobjetos

Cubreobjetos

Vaso de precipitación de 50-100-500-1000 ml

Erlenmeyer de 500-1000 ml

Tubos de ensayo de 10 ml

Algodón

Tarrinas de ½ litro transparente

Tanque de gas

Cinta adhesiva transparente de 1,5 cm de ancho

Pinzas

Bisturí

Tijeras con punta

- **Material de aseo**

Pala para basura

Escoba

Trapeadores

Detergente

Limpiones

Lava

Baldes de 10 lts

- **Reactivos**

Agua destilada

Agar

Dextrosa o sacarosa

Alcohol antiséptico

- **Materiales de campo**

Tijeras

Fundas de Papel

Fundas de Plástico

Bisturí

Cámara

GPS

Libro de Campo

- **Materiales de Oficina**

Computadora

Internet

Flash Memory

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Determinación del hongo Fitopatígeno de Mayor Importancia en la Producción de Alcachofa (*Cynara scolymus*).

Se realizó mediante la determinación bibliográfica, que el hongo fitopatígeno de mayor importancia en la producción de alcachofa es la (*Alternaria cinerariae*) conocida como (Alternariosis o peste negra), que afecta las características organolépticas del producto y al ser un producto de exportación necesita una calidad máxima para así poder satisfacer la demanda tanto nacional como internacional.

Típicamente, las lesiones se rodean de un color amarillo pardo por la producción de toxinas, y cuando las lesiones son numerosas se pueden unir, destruir al tejido infectado, y afectar la producción, así como la calidad para ser comercializado. (LATORRE, 1988).

Las exportaciones de la alcachofa fresca han sido esporádicas desde el año 1998 a 1999 es muy escasa, para el año 2000 y 2001 vemos un repunte considerable en las exportaciones que solo se limitó a ser envío de muestras, pero para el año 2002 y 2003 no muestran países destinos ni rubros. (CARPIO, 2007).

Perjuicios e Importancia Económica

La enfermedad afecta componentes del rendimiento (alto porcentaje del producto disminución del poder de comercialización, reducción del peso de los productos manchados), y calidad (productos con coloraciones anormales); además, en los campos de producción de Alcachofa el problema obliga al descarte de muchos lotes, ya que el hongo causal pueden ser transmitidos fácilmente. (CASTAÑON, 2001).

CUADRO N° 2. Estadísticas De la Producción de Alcachofas

Años	Producción TM	% Variación de Producción	Superficie Cultivada Ha	Rendimientos de Hg /Ha
1996	1.118,572		112.251	99.649
1997	1.250,605	11.80	114.819	108.920
1998	1.242,642	- 0.64	121.255	102.482
1999	1.245,239	0. 21	120.837	103.051
2000	1.330,299	6. 83	123.056	108.105
2001	1.303,286	- 2.03	119.847	108.746
2002	1.277,659	- 1.97	121.279	105.349
2003	1.276,847	- 0. 06	123.494	103.393
2004	1.311,289	2.70	120.044	109.234
2005	1.207,805	- 7. 89	122.100	98.919

Fuente: (FAO)

TM: Toneladas Métricas

HA: Hectáreas


HG: Hectogramos (100 Gramos)

Distribución Geográfica de la Producción y Las zonas de perjuicios.

En Ecuador las zonas de producción más representativas y por consecuencia donde más pérdidas existen, se encuentran en Bolívar, Zuleta, Quinche, Yaruquí, Minas, Machachi, Salcedo, Izamba, Pelileo, Cebadas, Biblian, Nabón y San Joaquín, estas zonas de Imbabura, Pichincha, Cotopaxi, Bolívar, Tungurahua, Cañar, Chimborazo y Azuay donde se puede producir alcachofa durante todo el año, ya que cuentan con condiciones ideales por su clima. (CASTAÑON, 2001).

3.2 Identificación de signos y síntomas del hongo alternaría en el Cultivo de la Alcachofa (*Cynara scolymus*).

TABLA N° 4 **Identificación de Signos y Síntomas**

Signos / Síntomas	Bibliografía	Campo	Fotos
Signos	Manchas pardas Relativamente Esféricas	Se Ratifica la Bibliografía (LATORRE, 1988).	

Continuara...

Continúa...

<p>Sintomas</p>	<p>Se caracteriza por el desarrollo de Manchas pardas, relativamente esféricas, las que posteriormente se necrosan, afectando la presentación y la calidad</p>	<p>En la recolección de las muestras para trabajar en laboratorio se ratifica lo que menciona (LATORRE, 1988)</p>	
-----------------	--	---	---

Fuente: Autor

3.3 Caracterización de Macro y Microestructuras del Patógeno

TABLA N° 5 Caracterización de Macro y Microestructuras

CONCEPTUALIZACION	INDICADOR	INDICE	TÉCNICAS	INSTRUMENTO
<p>Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de alcachofa</p>	Talo	Tipo	Observación	Microscopio
	Micelio	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

Fuente: Autor

3.3.1. TALO

Se utilizó un microscopio olympus con cuatro lentes de 5x, 10x, 20x, 100x. Con el lente de 100x, en campo claro, poniendo en el microscopio en luz del día, gama1, Ganancia 4.5, exposición 500 se captó la imagen en donde se observa las características Básicas del Talo.

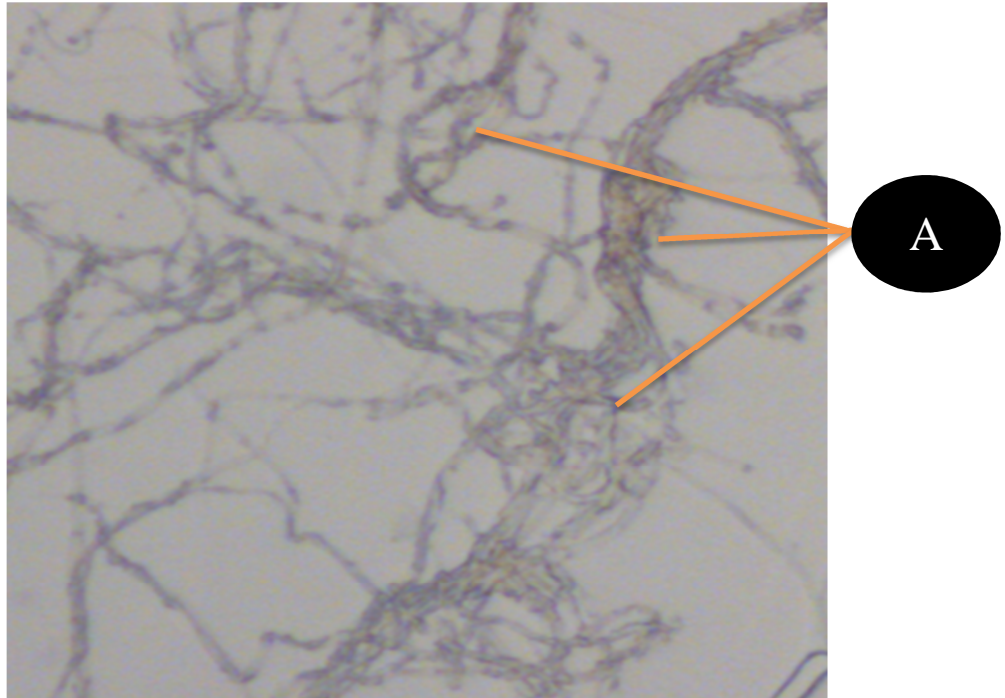


IMAGEN N° 1 Talo del Hongo Fitopatógeno (*Alternaria cinerariae* o peste negra) A. Talo

Talo Micelial Septado (Filamentoso), Hifas septados (SANDOVAL, 2013).

Talo Homotrico formados por filamentos simples o con ramificaciones equivalentes entre sí, sin partes bien diferenciadas las cuales se extienden por el medio de cultivo. (BARRENO, 1997).

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)

En la Imagen N°1 podemos observar Claramente un talo Homotrico filamentoso simples sin partes bien diferenciadas que se extienden por el medio de cultivo. Lo mismo que manifiesta la bibliografía.

3.3.2. MICELIO

Se utilizó un microscopio olympus con cuatro lentes de 5x, 10x, 20x, 100x. Con el lente de 100x, en campo oscuro, y el microscopio en luz del día, gama 1.6, Ganancia 5.7, exposición 500 se captó la imagen en donde se observa el Micelio.



IMAGEN N° 2 Micelio del Hongo Fitopatígeno, A. Hifa, B. Septo o Tabicación

El Micelio: Muchos de los hongos poseen cuerpo filamentoso provisto 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.

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).

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. (AGRIOS, 1995).

Las hifas pueden ser septados 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)

En la Imagen N°2 podemos observar Claramente un micelio tabicado o con septas con las partes bien diferenciadas. Lo mismo que manifiesta la bibliografía.

3.3.3. CONIDIOFÓRO

Se utilizó un microscopio olympus con cuatro lentes de 5x, 10x, 20x, 100x. Con el lente de 20x, en campo oscuro Ph1, poniendo en el microscopio en luz del día, gama 2, Ganancia 4.7, exposición 500 se captó la imagen en donde se observa el Conidióforo.

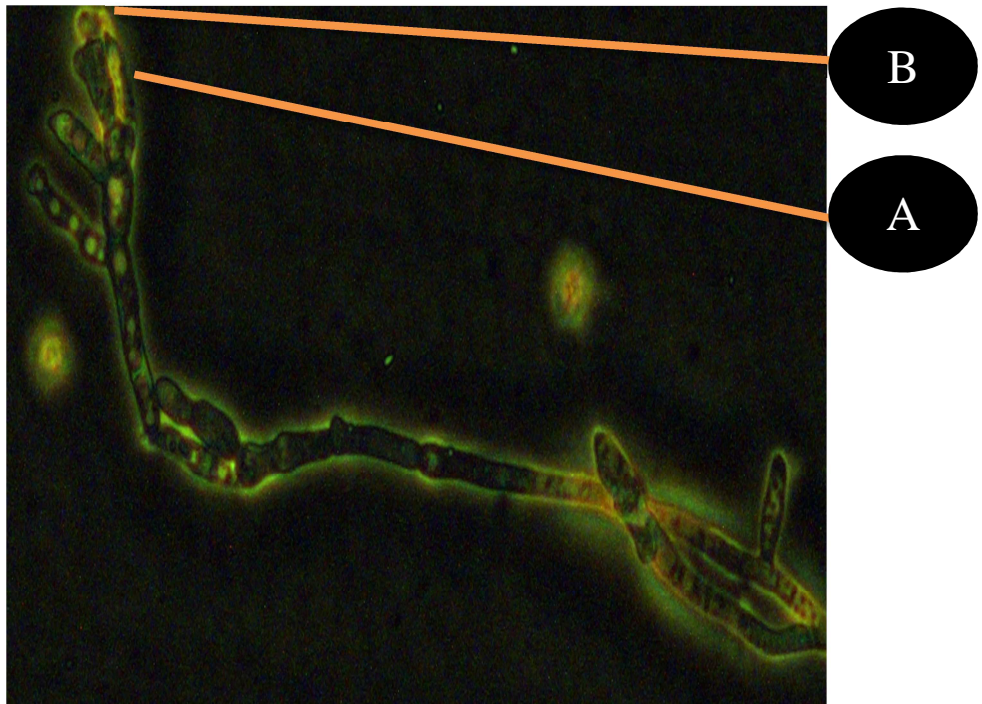


IMAGEN N° 3 A. Conidioforo, B. Conidio

Sinema es un grupo de conidióforos a menudo unidos por la base y parcialmente en la parte superior. Los conidios se forman en el ápice pero también pueden hacerlo a lo largo del mismo. Es normal que los conidióforos estén ramificados en la parte superior. (GONZÁLEZ, 1989)

Es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidias. Se localizan en el extremo de las hifas las cuales levantan las conidiofora en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia. (GONZÁLEZ, 1989).

En la Imagen N°3 podemos observar un grupo de Conidioforos y conidios ramificados los cuales se encuentran en la parte superior para poder esparcir las esporas en el aire. Lo comprobamos con la bibliografía citada.

3.3.4. ASCOSPORAS

Se utilizó un microscopio olympus con cuatro lentes de 5x, 10x, 20x, 100x. Con el lente de 100x, en campo Claro, poniendo en el microscopio en luz del día, gama 1.6, Ganancia 5.7, exposición 500 se captó la imagen en donde se observa la Ascospora.

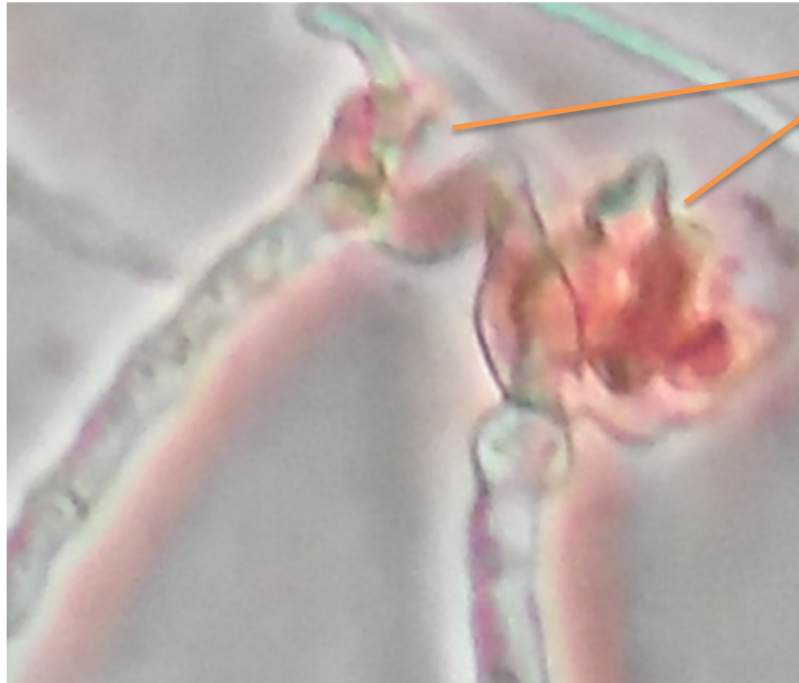


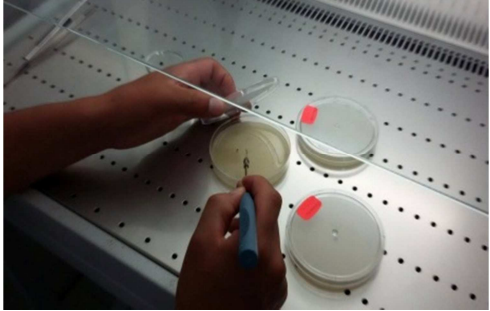
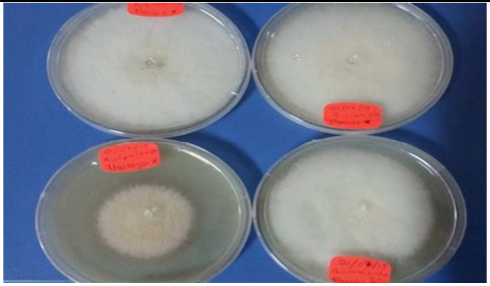
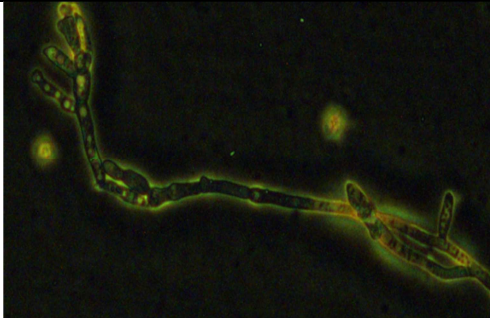
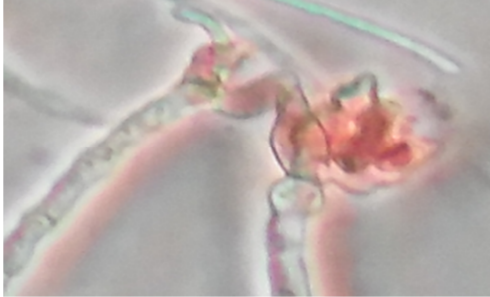
IMAGEN N° 4 A. Ascospora

Esporas asexuales se forman sobre estructura de sostén (Conidiosporo). Las esporas asexuales se forman directamente de una célula progenitora (Hifas). (GALINDO, 2013).

En la Imagen N°4. Podemos observar que la espora esta al final de una estructura que la sostiene y el tipo de espora esta entre esteliforme y Espinulada.

3.4 Descripción del ciclo de vida del Patógeno en Condiciones de Laboratorio

TABLA N° 6 Ciclo de Vida Del Hongo en Laboratorio

Actividad	Tiempo (horas / días)	Temperatura (°C)	Gráfico
Siembra del Hongo	15 min	22°C	
Aislamiento y Reproducción (Producción de Micelio)	48 h (2 días)	22°C	
Producción de Conidias y Conidióforos	72h (3 días)	22°C	
Producción de Ascosporas	96h (4 días)	22°C	

Fuente: Autor

3.5 Elaboración de una Guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo (*Alternaria cinerariae*).

Se elaboró una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo en estudio para fortalecer la investigación. Y de esta manera poder difundir los resultados obtenidos.

La guía didáctica se encuentra en el anexo número 6 y está estructurada de la siguiente manera: Caratula, Índice, Introducción, Fundamentación, Objetivo, Ubicación del Laboratorio, Distribución de bloques, Material de consulta sugerida.

CONCLUSIONES:

- El hongo Fitopatógeno de mayor importancia en la Producción de Alcachofa (*Cynara scolymus*), en el Sector de Salcedo Provincia de Cotopaxi es la (*Alternaria cinerariae*) o peste negra, esto se realizó mediante la valoración bibliográfica y Observando directamente la plantación afectada.
- La identificación de signos en el cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus*) son manchas pardas relativamente esféricas en las hojas y presentando síntomas de necrosis, esto se lo realizo en dos etapas, La primera fue bibliográficamente y la segunda se ratificó en campo mediante fotografías para la toma de muestras, en donde se pudo observar el daño que causa este hongo al cultivo.
- Se caracterizó morfológicamente las estructuras del patógeno como: Talo, Micelio, Hifa, Septo, Conidióforo, Ascospora, mediante la utilización de claves taxonómicas, observación microscópica y toma de fotografías.
- El ciclo de vida del Patógeno en condiciones controladas el cual tuvo una duración de 4 días a una temperatura de 22°C esto se lo realizo atraves de la utilización de Equipos de Laboratorio como un Microscopio Trinocular, una cámara digital y otra cámara científica.
- Se elaboró una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo (*Alternaria cinerariae*), para consolidar y difundir los resultados obtenidos.

RECOMENDACIONES:

- Realizar una investigación de campo profunda con una observación clara y precisa del cultivo en estudio para determinar la enfermedad que afecta la especie.
- Para la identificación de signos y síntomas es necesario recorrer el cultivo y observar detenidamente para comparar y ratificar con la literatura citada.
- Mantener los protocolos para el uso correcto del laboratorio y poder realizar la investigación y terminar con un resultado satisfactorio
- Para una observación precisa de las estructuras del hongo es indispensable enfocar con los lentes de 20x y 100x manipulando el microscopio Trinocular entre el campo claro y campo oscuro.
- Difundir los resultados obtenidos a través de una guía didáctica de la investigación, de este modo podemos sintetizar el trabajo realizado consolidándolo de una manera clara y precisa, pudiendo así difundir los resultados obtenidos.

GLOSARIO:

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.

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).

Conidioforos.- 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.

Fitopatógenos.- Termina 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.

Micelio.- Hifa o masa de hifas que constituyen el soma de un hongo.

Hifa.- Ramificación simple de un micelio.

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

Conidio.- Espora asexual de un hongo formada en el extremo de un conidióforo.

Cuerpo fructífero.- Estructura compleja de los hongos que contienen esporas.

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.

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.

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.

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

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

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.

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

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

BIBLIOGRAFÍA

AGRIOS, G. 2007. *Fitopatología*. Mexico : LIMUSA.

AGRIOS, G. 1999. *Fitopatología 2 ed.* Mexico : LIMUSA. 273 p.

AGRIOS, G.. 1995. *Fitopatología*. México : Uyhea.

BARRENO, E. 1997. *Caracteres Táxonomicos*. s.l. : McGrau-Hill. 53-53.

CALZADA, B. 2002. *Frutales nativos*. Lima, Perú : El Estudiante.

CARASCO. 2008.

CARPIO, M. 2007. *Producción y Comercialización de la Alcachofa*. Guayaquil : s.n.

CASTAÑÓN, M. 2001. *FITOPATOLOGÍA*. s.l. : Cabral - 2131.

CHARLES, V. 2008. *Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología*. Medellin - Colombia : Revista "Agronomía Colombiana" de la Universidad Nacional de Colombia. Vol. 26.

CONTRERAS, N. 1980. *Etiología de La Mancha Parda*. Venezuela : Apdo. 178.

CULTIVOS CONTROLADOS. agropecuaria, Revista. 2002. 26, Ecuador : s.n., 2002, Vol. 4. 20-26.

<http://www.estadistica.mat.uson.mx/Material/elmuestreo.pdf>.

FAO, Organización de las Naciones unidas para la Agricultura y la Alimentación. Estadísticas de la producción de Alcachofas.

FERNÁNDEZ, C. 2005. *La coleccion de cultivos de hongos del instituto de medicina tropical "Pedro Kouri". Funciones y Retos*. s.l. : Revista Cubana de Medicina. Vol. 57.

FINCH, H.C. 1985. *Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina*. México : Trillas.

FONNEGRA, R. 2007. *Plantas medicinales aprobadas en Colombia*. Colombia : Universidad de Antioquia .

FRENCH, E y HEBERT, T. 1980. *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica : IICA.

Fuente.: [En línea] <http://www.infoagro.com/hortalizas/alcachofa.htm>.

GALINDO, T. 2013. *Micología*. Cuenca : s.n.

GAVIOLA, J. 2013. *Manual de Producción de Zanahoria*. Buenos Aires : Ediciones INTA. 978-987-679-199-1.

GONZÁLEZ, L. 1989. *Introducción a la Fitopatología*. .

HERRERA, M. 1994. *Fitopatología General*. La Habana Cuba : Felix Varela. 290,291 p.

INAMHI. 2014. *Anuario meteorológico Nro. 51-2011*. Quito, Ecuador : s.n., 2014.. Red estaciones meteorológicas. Salcedo : s.n.

INFOAGRO. 2003. [En línea] 2003. [Citado el: 15 de 06 de 14.] <http://www.infoagro.com/hortalizas/alcachofa.htm>.

INIAP. 2009. *Sanidad Vegetal: Recomendaciones para la toma de muestras*. Quito, Ecuador : s.n., 2009.

KIRSOP, B. 1991. *Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods*. San Diego - California : Academic Press Inc., 1991. segunda edición 308 p..

LATORRE, B. 1988. *Enfermedades de las Plantas Cultivadas*. Chile : Casillas 114-D, 1988.

LÓPEZ, A. 1979. *Manejo de Hongos Fitopatogenos*. Mexico : Universidad Autónoma de Chapingo.

MANZÓN, R. 2005. Infecciones causadas por el género *Fusarium*, Servicio de micología. *Centro Nacional de Micología*. [En línea] 2005. www.seimc.org/control/revciones/micologia/fusarium.htm..

MERCK. 2007. Indicaciones generales para el empleo de medio de cultivos deshidratados. [Citado el: 10 de junio de 2012.] <http://www.merck.de/serviet/PB/menu/1660270/index.html>..

NARVAEZ. 2002. Alcachofa manual para la producción. s.l. : segunda edición, págs. 5-19.

SANDOVAL,M. 2013. *Descrpción de los Hongos*. México : s.n.

TERRANOVA. 1995. Producción agrícola, pág. 298. *Produccion Agricola 2*. Santa Fe, Colombia : Edición Agropecuaria.

UNAMUNDO, L.M. 1942. Anales del Jardín Botánico. *Contribución al Estudio de los Hongos Microscopicos*. Cuenca.

ANEXOS

RESPALDO FOTOGRAFICO

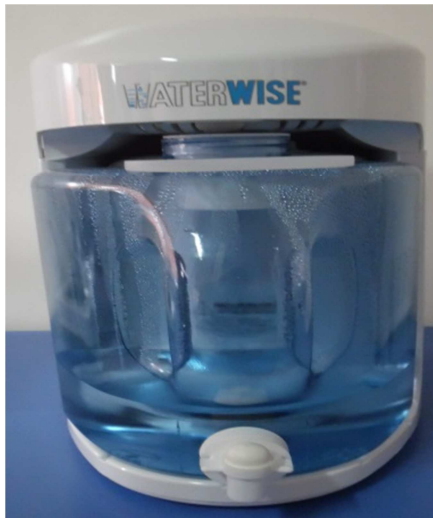
Anexo 1. Fotografías de los Materiales y Equipos Utilizados en la Investigación

Fotografía 1. Cámara Húmeda



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 2. Destilador de Agua waterwise 9000



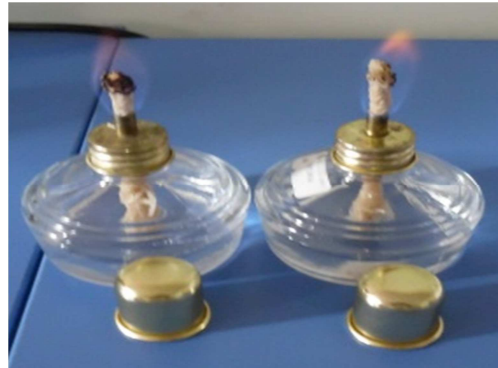
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 3. Cocina Eléctrica



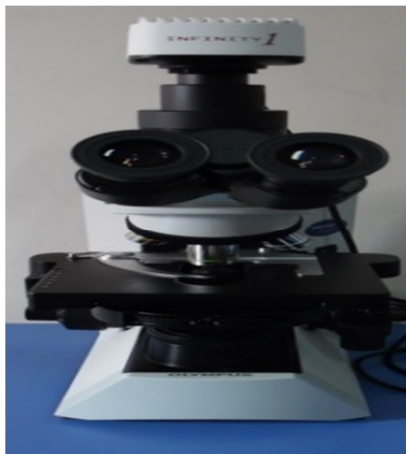
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 4. Mecheros



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 5. Microscopio Trinocular CX 31 con cámara científica infíniti 1-2 CB



Tomada: Miño, Oswaldo

Fotografía 6. Incubadora IN 110



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 7. Autoclave semiautomática 2540 – 23 litros



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 8. Implementos necesarios para la asepsia y manipulación



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 9. Cámara de Flujo laminar



Tomada por: Miño, Oswaldo

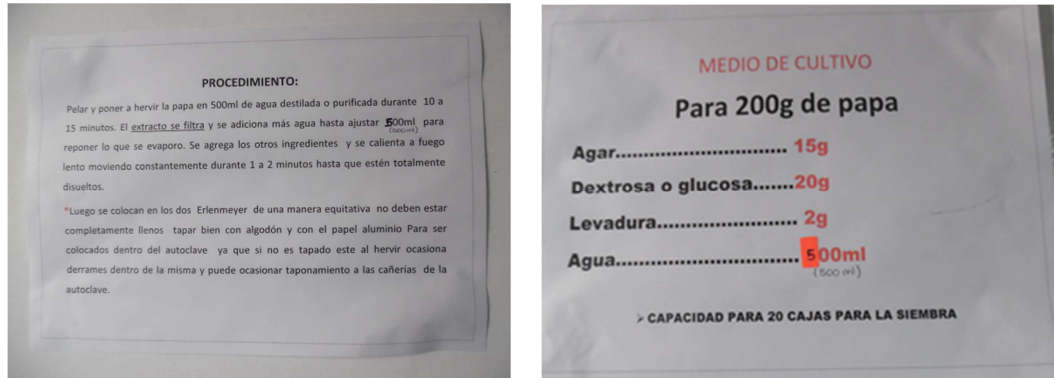
Fotografía 10. Refrigeradora R1 – 425 cuarzo indurama



Tomada por: Miño, Oswaldo

Anexo 2. Preparación del Medio de Cultivo

Fotografía 12. Procedimiento para preparar el medio de cultivo



Fotografía 13. Se pela y se pica la papa



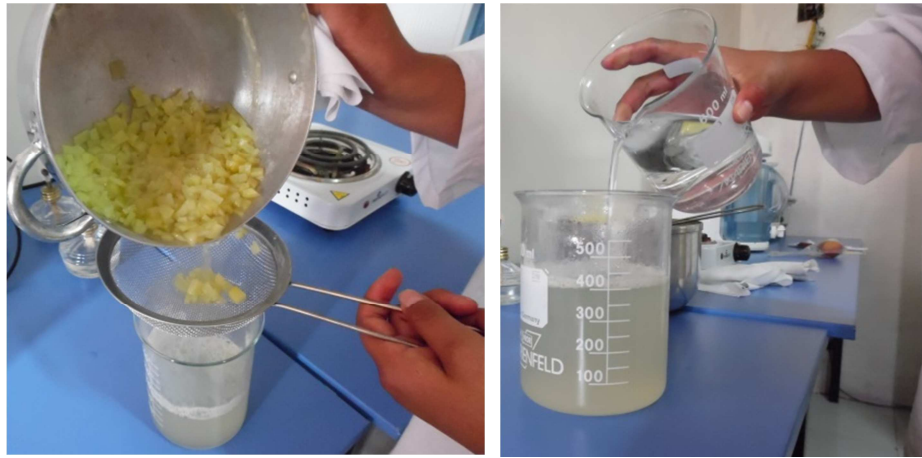
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 14. Se coloca la papa en 500 ml de agua para hervir



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 15. El extracto se filtra y se añade agua hasta los 500ml para compensar con lo evaporado



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 16. Se agrega los ingredientes Azúcar, Levadura y Agar y se mezcla hasta que se disuelvan



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 17. Luego se coloca el contenido en los Erlenmeyer y tapamos con papel aluminio y colocamos dentro del autoclave a una temperatura de 121°C por un tiempo de



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 18. Medimos el pH para un buen medio de cultivo



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 19. Colocamos el medio de cultivo en las cajas Petri y Rotulamos



Tomada por: Miño, Oswaldo

Anexo 3. Plantación de alcachofa de donde se obtuvo las muestras del hongo

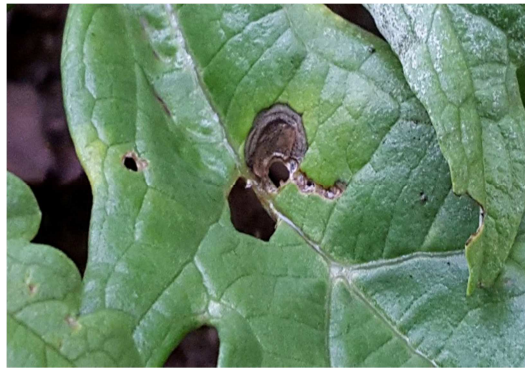
Fotografía 20. Cultivo de alcachofas



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 21. Procedemos al Cultivo a la Recolección de las muestras afectadas por hongo (*Alternaria cinerariae*)





Tomada por: Miño, Oswaldo

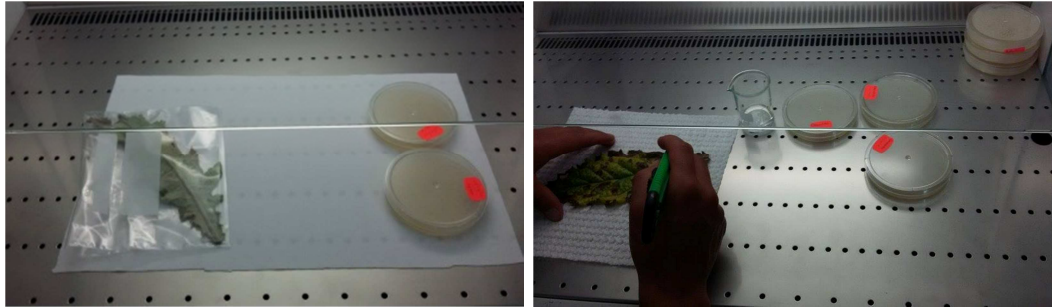
Anexo 4. Cultivo del Hongo

Fotografía 22. Llevamos la muestra al laboratorio



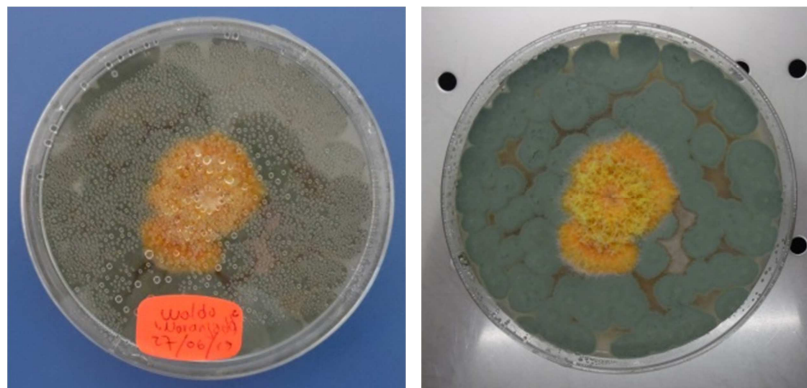
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 23. La muestra se coloca en el equipo de flujo laminar para evitar contaminación de las cajas Petri con el medio de cultivo, y cortamos en pequeños pedazos la parte infectada



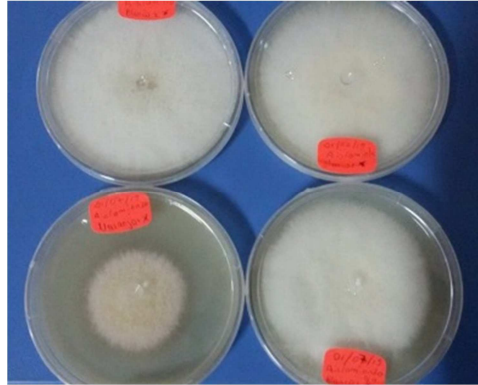
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 24. La muestra Tomate es el hongo que Necesito después de un estudio bibliográfico (Claves taxonómicas) y observaciones en el microscopio para ratificar el hongo en estudio



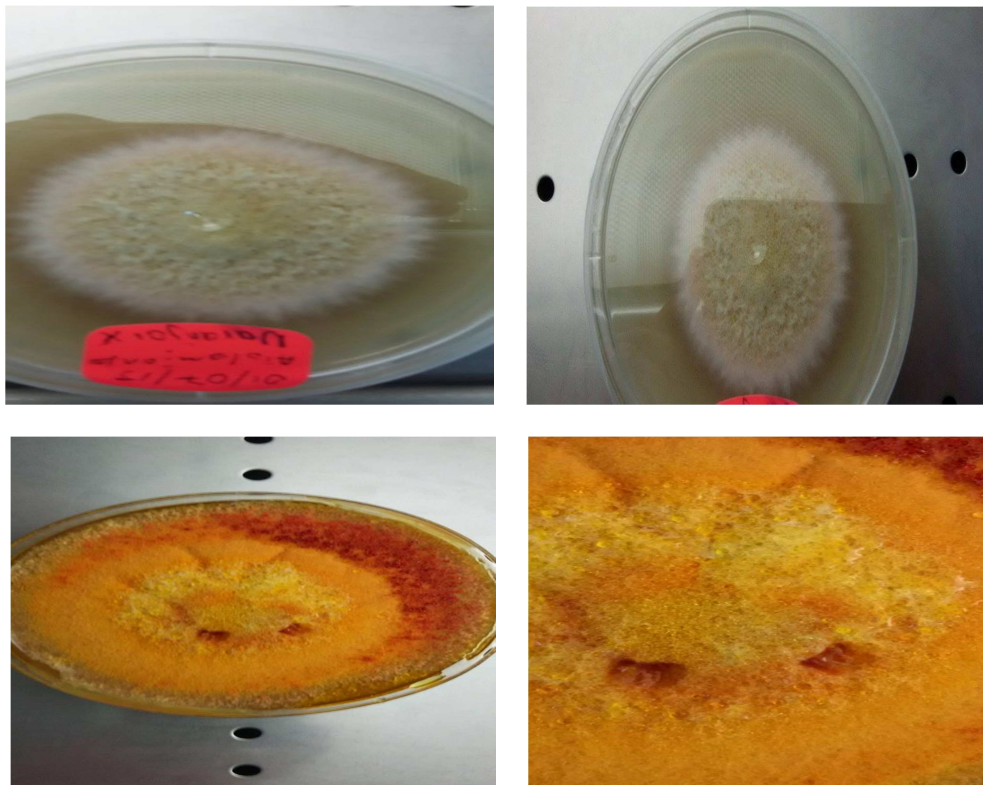
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 25. Aislamiento del hongo que buscamos



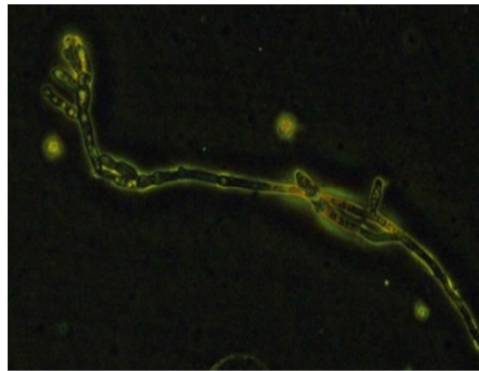
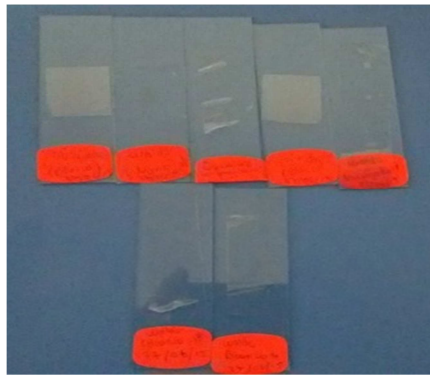
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 26. Hongo aislado



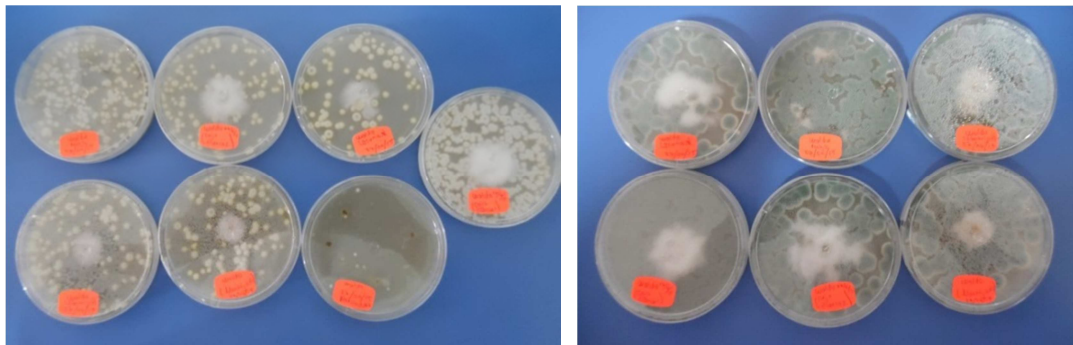
Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 27. Observamos en el Microscopio las muestras después de 4 días a 22°C de temperatura



Tomada por: Miño, Oswaldo

Fotografía 28. Contaminación se produjo por una mala práctica realizada en el laboratorio



Tomada por: Miño, Oswaldo

Anexo 5. Visita de los miembros del tribunal para observar y ratificar el trabajo realizado en el Laboratorio

Fotografía 29. Visita de los miembros del Tribunal



Tomada por: Miño, Oswaldo

Anexo 6. Costos de la Investigación

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

Continuara...

Continúa...

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

Fuente: Autor

Anexos 7. Guía didáctica de la caracterización morfológica de la (*Alternaria cinerariae*)

GUÍA DIDÁCTICA DE LA CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA DE (*Alternaria cinerariae*) EN EL CULTIVO DE
ALCACHOFA (*Cynara scolymus*)

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI
Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos

Naturales

Carrera de Ingeniería Agronómica

Autor:

Sr. Oswaldo Antonio Miño Gallardo

Latacunga – Ecuador

2015

ÍNDICE

Introducción

Fundamentación

Objetivo

Ubicación del Laboratorio

Distribución de bloques

Bloque I. Metodología

Bloque II. Resultados

Material de consulta sugerida

GUÍA DIDÁCTICA DE LA ALTERNARIA CINERARIAE
Cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus*)



INTRODUCCIÓN

Esta guía didáctica tiene como finalidad la orientación técnica para el estudiante de Ciencias Agrícolas, que le permita utilizar toda la información necesaria sobre el hongo (*Alternaría cinerariae*), para su correcta manipulación.

La guía didáctica de la caracterización morfológica de la alternaría en el cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus*), se realizó con la finalidad de complementar y sintetizar la investigación y así poder ofrecer a las futuras generaciones mejorar la comprensión y fomentar el autoaprendizaje.

FUNDAMENTACIÓN

La presencia de enfermedades en el cultivo de Alcachofa se relaciona con las características climáticas del área de producción. A continuación se detalla la Enfermedad en Estudio y una de las principales enfermedades que afectan al cultivo. (GAVIOLA, 2013).

Taxonomía.-

CUADRO 1. Taxonomía Del Hongo

Reino	Fungí.
Phylum	Ascomycota
Clase	Deothideomycetes.
Orden	Pleosporales.
Familia	Pleosporaceae.
Género	Alternaría
Especie	Cinerariae

(GAVIOLA, 2013)

Síntomas.-

Los primeros síntomas ocurren en las hojas más viejas donde se presentan pequeñas lesiones irregulares de color café oscuro en cuyo interior se forman anillos concéntricos evidentes, debido a los esfuerzos que hace la planta para detener el avance de la infección; las lesiones pueden crecer hasta alcanzar 1,5 cm de diámetro o más. Típicamente, las lesiones se rodean de un color amarillo por la producción de toxinas, y cuando las lesiones son numerosas se pueden unir, destruyendo al tejido foliar, y afectando la producción, así como la calidad de la Alcachofa. (LATORRE, 1988).

Diseminación.-

Sus conidias se diseminan por el viento

Sobrevivencia.-

Muy posiblemente sobrevive en forma epífita en la Alcachofa u otros cultivos

Aislamiento.-

El aislamiento del hongo se realizó en una cámara estéril de flujo laminar marca Microflow, seleccionando bajo lupa binocular secciones muy pequeñas del tejido enfermo y sembrando la porción deseada con ayuda de agujas de disección, previamente flameada, en medio de cultivo agar papadextrosa (PDA) e incubando las cajas en condiciones de laboratorio a 22°C. (UNAMUNDO, 1942).

Purificación.-

Los hongos aislados se purificaron haciendo repiques sucesivos de trocitos jóvenes de micelio en placas Petri. (CONTRERAS, 1980).

Condiciones predisponentes.-

Temperaturas elevadas, entre 20 y 30° C (ópt. 22° C), elevada humedad relativa (cerca al 80 %). 24 horas de hoja mojada y heridas favorecen las infecciones. (CONTRERAS, 1980).

Control.-

Se sugiere algún fungicida aplicado al follaje tan pronto como se observe los primeros síntomas.

OBJETIVO

La presente guía didáctica sobre la caracterización morfológica del hongo (*Alternaria cinerariae*) tiene como finalidad complementar los conocimientos y fomentar el autoaprendizaje.

UBICACIÓN DEL LABORATORIO

El laboratorio se encuentra en las instalaciones de la Universidad Técnica de Cotopaxi en la Carrera de Agronomía, ubicado en el Barrio Salache al sur occidente de la ciudad de Latacunga

CUADRO 2. Ubicación Política

País	Ecuador
Provincia	Cotopaxi
Cantón	Latacunga
Barrio	Salache Bajo
Parroquia	Eloy Alfaro

Fuente: Autor

CUADRO 3. Ubicación Geográfica

Latitud	N: 9888.749,37.
Longitud	E: 764.660,386.
Altitud	2800 m.s.n.m

Fuente: Universidad Técnica de Cotopaxi

DISTRIBUCIÓN DE BLOQUES

Bloque I (Metodología)

Recolección de las Muestras en Campo

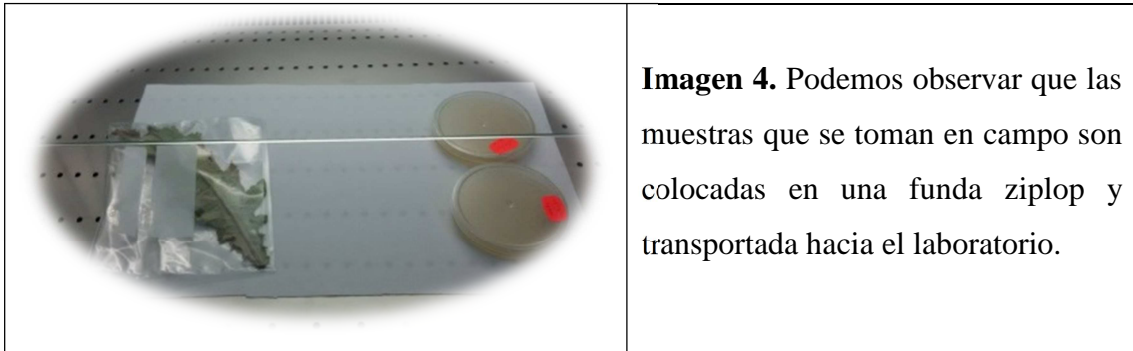
Se realizó la toma de muestras al Azar del hongo Fitopatógeno (*Alternaria cinerariae*) en el cultivo de Alcachofa (*Cynara scolymus*), para trasladar las muestras al laboratorio para su respectiva descripción.

	<p>Imagen 1. Podemos observar la Plantación, De donde se obtuvo las Muestras para la investigación</p>
	<p>Imagen 2. Se puede observar que existen manchas pardas relativamente esféricas.</p>
	<p>Imagen 3. Observamos que las manchas pardas se comienzan a necrosar afectando a la presentación y calidad</p>

Fuente: Autor

Tratamiento de la toma de las muestras

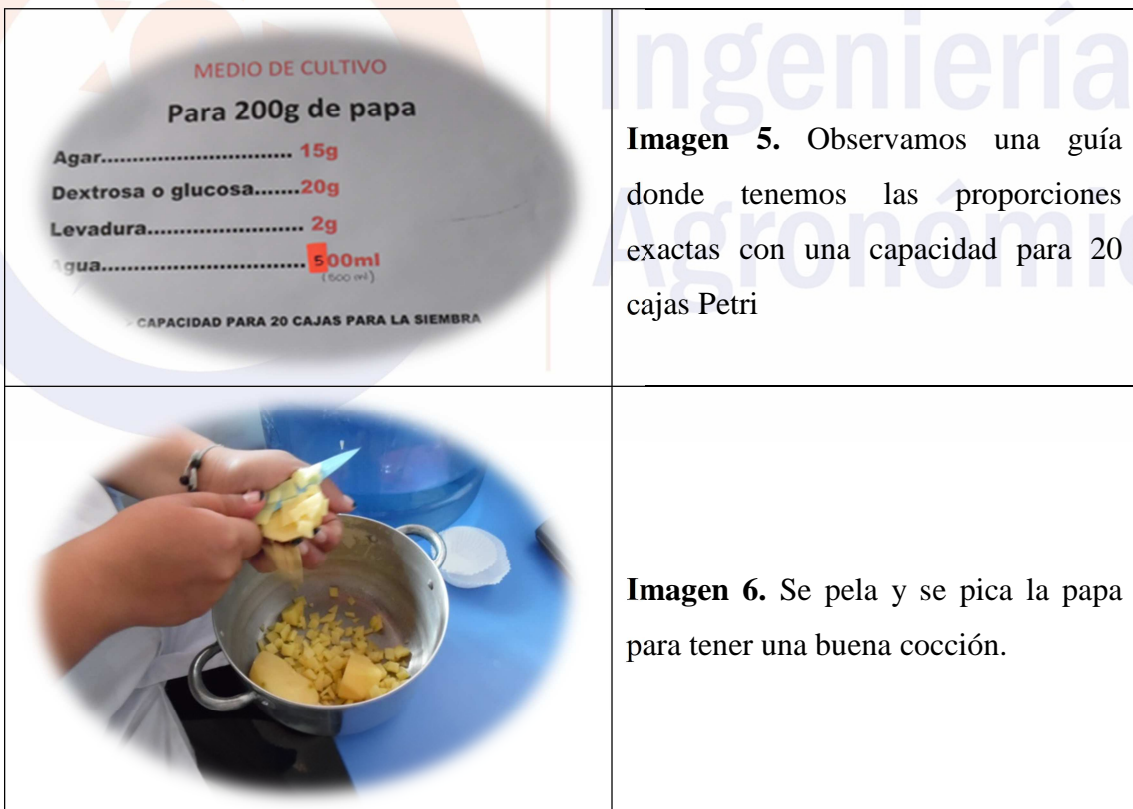
Las muestras vegetales se procederá a colocar en una funda ziplop con su respectiva codificación y se trasladaras al Laboratorio.



Fuente: Autor

Preparación del Medio de Cultivo

Para sembrar las muestras infectadas tuve que elaborar un medio de cultivo en este caso fue agarpapadextrosa (PDA).



Continuara...

Continúa...



Imagen7. Se coloca la papa en una pequeña olla y se agrega 500 ml de agua para poder hervir







Imagen 8. Una vez puestos los ingredientes se coloca en una cocineta y se le deja hervir



Imagen 9. El extracto se filtra para que los residuos de papa se queden y obtener solo el liquido


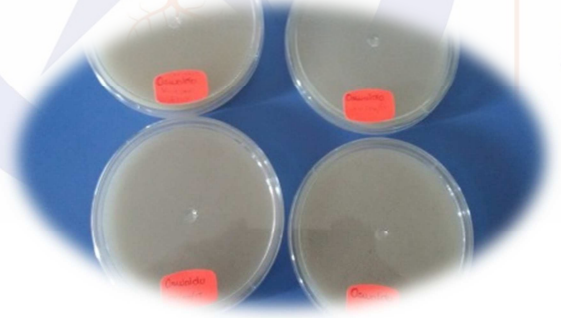
Continuara...

Continúa...

	<p>Imagen 10. Se añade agua hasta los 500ml para compensar con lo evaporado</p>
	<p>Imagen 11. Se pesan los ingredientes Azúcar, Levadura y Agar y para obtener un medio de cultivo exacto</p>
	<p>Imagen 12. Se agrega los ingredientes Azúcar, Levadura y Agar y se mezcla hasta que se disuelvan entre 1 a 2 minutos, no importa el orden de la mezcla.</p>
	<p>Imagen 13. Luego se coloca el contenido en los Erlenmeyer y tapamos con papel aluminio para evitar derrames.</p>

Continuara...

Continúa...

	<p>Imagen 14. Colocamos los Erlenmeyer dentro del autoclave y sincronizamos el tiempo adecuado.</p>
	<p>Imagen 15. Medimos el pH del medio de cultivo para ver en que rango esta y que posteriormente no afecte al hongo sembrado.</p>
	<p>Imagen 16. Colocamos el medio de cultivo en las cajas Petri y Rotulamos.</p>



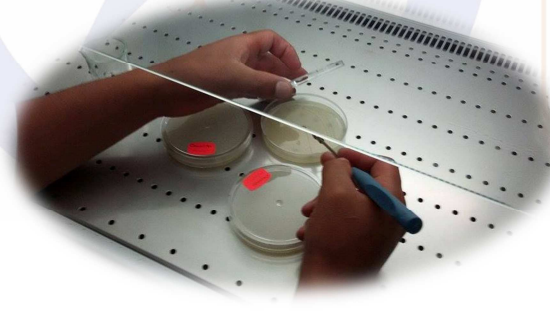
Fuente: Autor

Pasos para la Obtención del Hongo

Inoculación

Se procedió a inocular los posibles hongos fitopatógenos en medio de cultivo, bajo condiciones controladas de esterilidad y asepsia. Se esterilizaron los materiales a utilizar como pinzas, bisturí.

Para este proceso realice un repique del medio de cultivo, luego se procederá a la siembra de esporas o haustorios y por último se realiza el cierre hermético de la caja Petri con láminas Parafilm.

	<p>Imagen 17. La muestra se la trabaja en la cámara de flujo laminar para evitar contaminaciones de posibles esporas que estén en el ambiente.</p>
	<p>Imagen 18. Las herramientas como el bisturí, pinzas deben ser esterilizados y con una asepsia total para la manipulación de la muestra.</p>
	<p>Imagen 19. La siembra se lo realiza con una pinza, la muestra se la coloca en el medio de cultivo, y las cajas se rotulan.</p>

Fuente: Autor

Incubación

	<p>Imagen 20. Para la incubación la caja Petri se colocó en la incubadora a una temperatura de 22°C °C y 70% de humedad relativa, durante 4 días aproximadamente según tengamos el desarrollo de los micelios del hongo.</p>
---	---

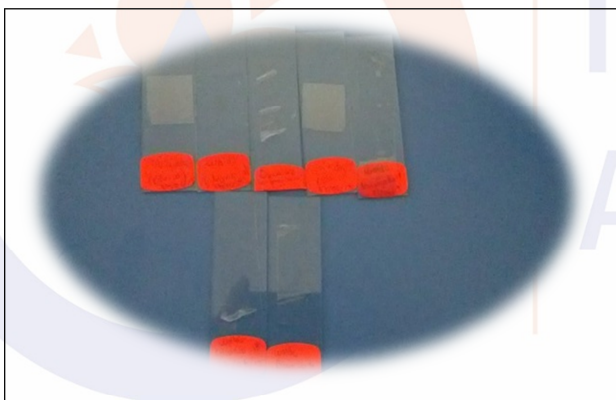

Fuente: Autor

Identificación

Observación microscópica

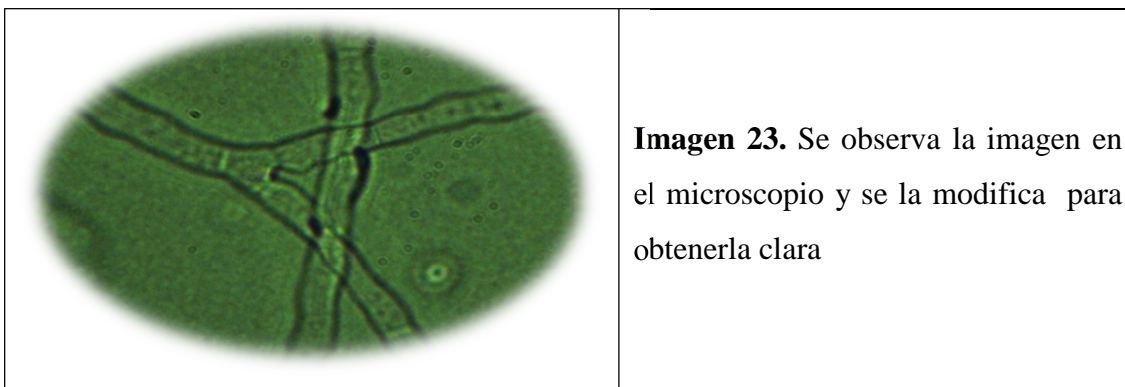
Técnica de cinta pegante: Se procede a realizar un doblar de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostiene con una pinza. Con el lado adhesivo se debe tener mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después se coloca una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procede a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 20x y 100x.

Montaje por disección: Con un asa estéril (o una aguja de disección), se toma una pequeña muestra del hongo y se coloca en un portaobjetos añadiendo una gota de agua destilada, con la misma asa se extiende el micelio, se coloca el cubreobjetos y se procede a observar con microscopio de 20x y 100x.

 A circular inset showing a microscopic view of a fungal sample. The sample consists of several bright red, elongated, and somewhat rectangular structures arranged in a horizontal line on a light blue background. The structures appear to be spores or hyphae of a fungus.	<p>Imagen 21. La muestra con la cinta que contiene una pequeña colonia se coloca en el portaobjetos</p>
 A circular inset showing a laboratory setting. Three individuals wearing white lab coats and hairnets are working at a table. One person is using a microscope, while the others are observing or handling equipment. The background shows a window with a grid pattern and some laboratory equipment.	<p>Imagen 22. Se observa la muestra en los diferentes aumentos y campos del microscopio para obtener una imagen adecuada</p>

Continuara...

Continúa...



Fuente: Autor

Aislamiento

Aislamiento directo. Se observa al microscopio de disección el ejemplar enfermo; si existen fructificaciones, micelio. Se toma una muestra de este material con una aguja de disección estéril y se coloca directamente sobre el medio de cultivo solidificado. Para la incubación la caja se coloca a una temperatura de 21°C y 70% de humedad relativa, durante 4 días aproximadamente según tengamos el desarrollo de los micelios del hongo.

Cámara húmeda. Cuando la planta presenta micelio y no hay fructificaciones o cuando no se aprecia el crecimiento del patógeno, se recurre al uso de la cámara húmeda. Tome porciones de tejido enfermo y se procede a lavar en agua corriente, seguido se seca los tejidos con papel absorbente, y posteriormente se desinfecta en una solución 2:1 de cloro, se lava dos veces con agua destilada estéril y se elimina excesos de agua, en el interior de una caja de Petri estéril que contenga papel filtro esterilizado, finalmente en un dispositivo para cámara húmeda se coloca pequeños trozos del vegetal enfermo lavados desinfectados, secos y cerraremos totalmente la caja, se humedece con agua destilada estéril. Se incuba de acuerdo a las necesidades del hongo, y caracterice el patógeno que se desarrolla durante este tiempo de observación y finalmente se anota estos resultados en la libreta de laboratorio.



Imagen 24. Una vez identificado el hongo se procede a aislarlo tomando una muestra y colocando en un medio de cultivo nuevo

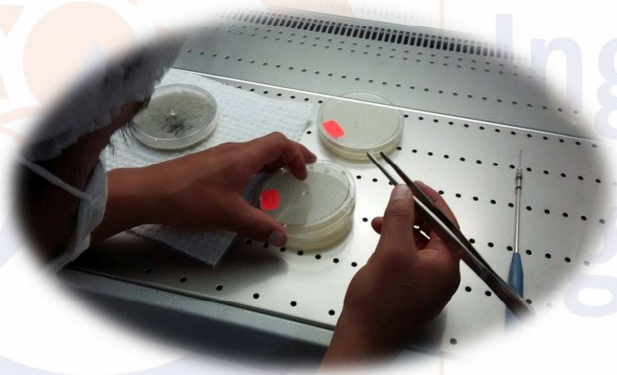


Imagen 25. La siembra del hongo aislado se lo realiza en la cámara de flujo laminar se obtiene de la caja en la cual se encuentra el hongo y se coloca en una caja nueva con un medio de cultivo sano

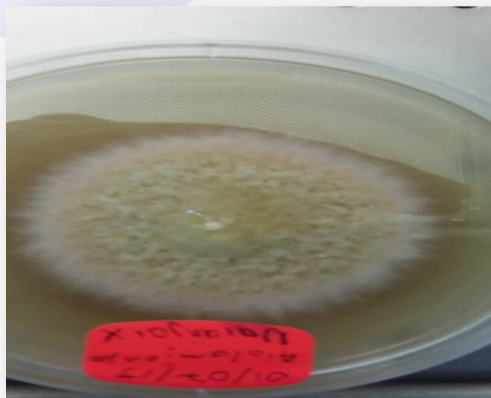
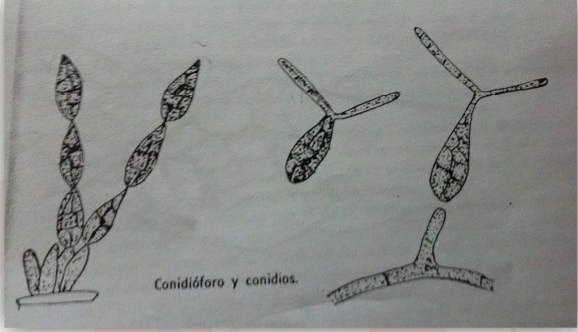
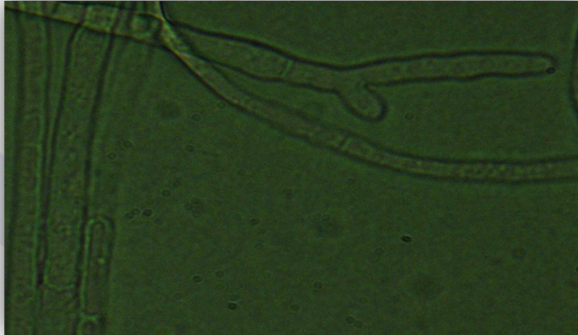


Imagen 26. El nuevo hongo aislado y sin contaminantes

Fuente: Autor

Descripción

Identificación morfológica de hongos fitopatógenos: Para esto se utiliza el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas. (FINCH, 1985).

 <p>Conidióforo y conidios.</p>	<p>Imagen 27. Mediante claves taxonómicas se identifica el hongo y se compara con las imágenes obtenidas</p>
	<p>Imagen 28. La comparación de las imágenes con la claves taxonómicas es fundamental para identificar el hongo (<i>Alternaria cinerariae</i>)</p>

Fuente: Autor

Bloque II (Resultados)

CUADRO 4. Caracterización de Macro y Microestructuras del Patógeno

CONCEPTUALIZACION	INDICADOR	INDICE	TECNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de alcachofa	Talo	Tipo	Observación	microscopio
	Micelio	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

Fuente: Autor

TALO

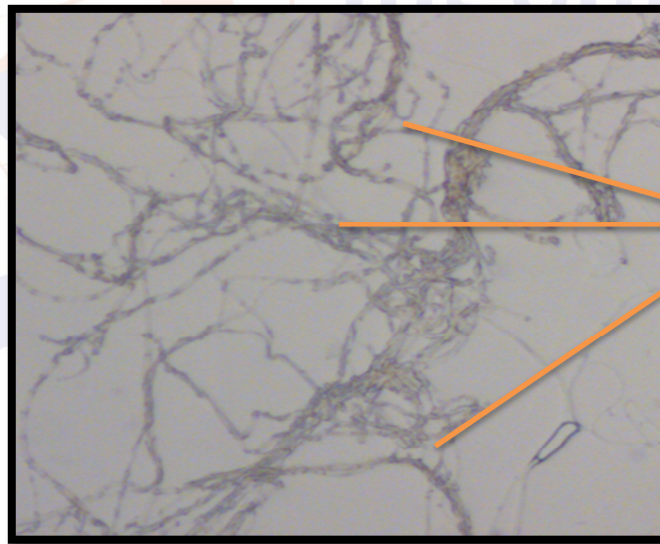


Imagen29. Talo del Hongo Fitopatógeno (*Alternaria cinerariae* o peste negra) A.

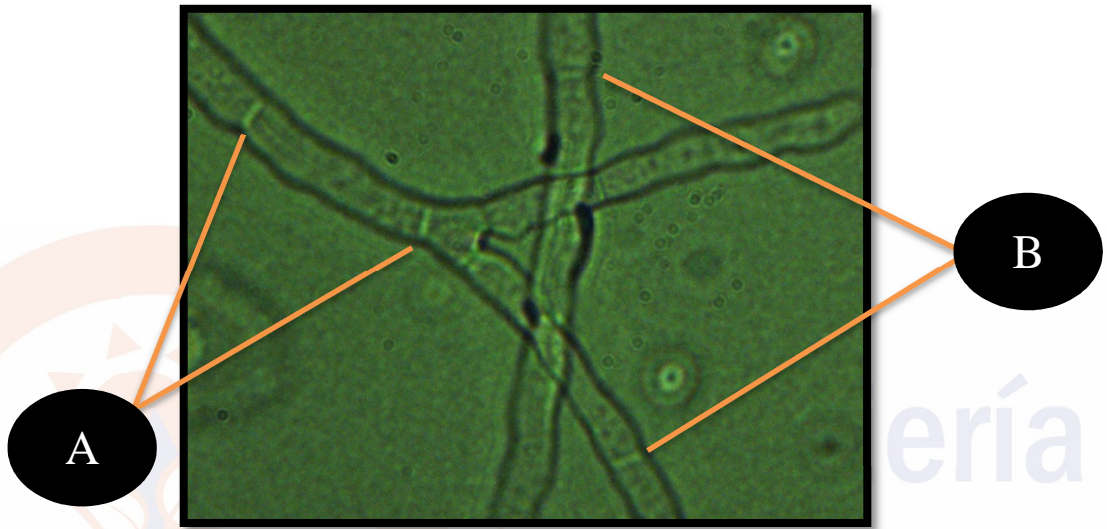
Talo

Tomada por el Investigador

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.

MICELIO



**Imagen 30. Micelio del Hongo Fitopatógeno, A. Hifa, B. Septo o Tabicación
Tomada por el Investigador**

El Micelio: Muchos de los hongos poseen cuerpo filamentosos provisto 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.

CONIDIÓFORO

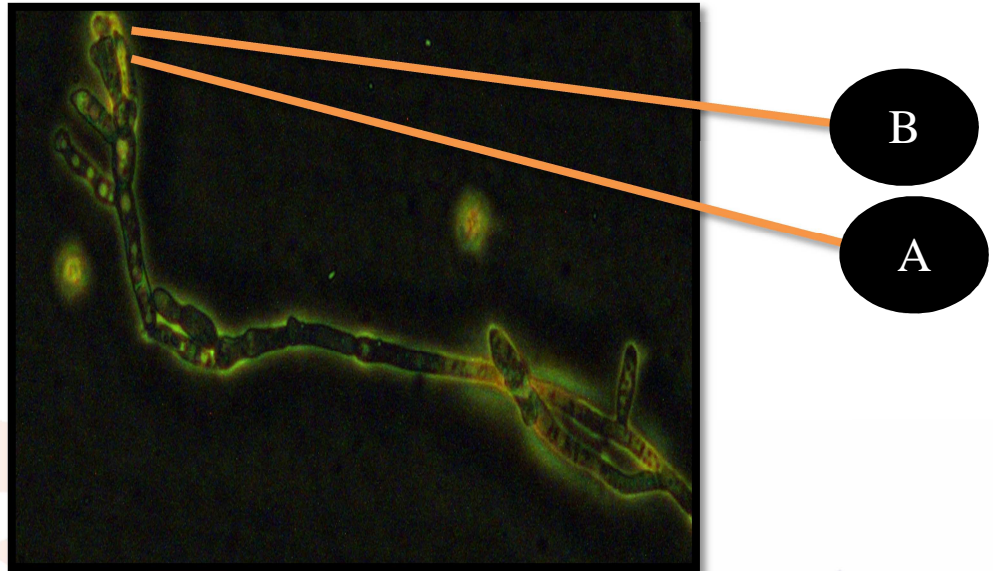


Imagen 31. A. Conidióforo, B. Conidio

Tomada por el Investigador

Sinema es un grupo de conidióforos a menudo unidos por la base y parcialmente en la parte superior. Los conidios se forman en el ápice pero también pueden hacerlo a lo largo del mismo. Es normal que los conidióforos estén ramificados en la parte superior

ASCOSPORA

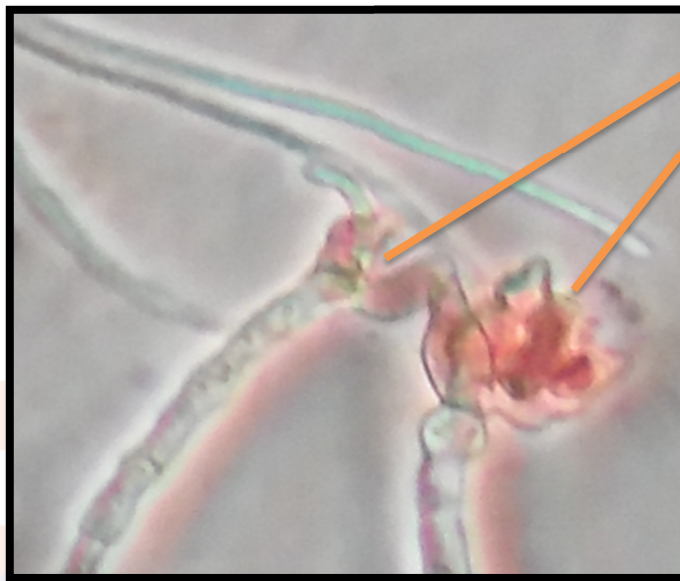


Imagen 32. A. Ascospora

Tomada por el Investigador

Esporas asexuales se forman sobre estructura de sostén (Conidiósporo). Las esporas asexuales se forman directamente de una célula progenitora (Hifas).

MATERIAL DE CONSULTA SUGERIDA

CONTRERAS, Nancy. 1980. *Etiología de La Mancha Parda*. Venezuela : Apdo. 178, 1980.

FINCH, H.C. 1985. *Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina*. México : Trillas, 1985.

GAVIOLA, JULIO. 2013. *Manual de Producción de Zanahoria*. Buenos Aires : Ediciones INTA, 2013. 978-987-679-199-1.

LATORRE, BERNARDO. 1988. *Enfermedades de las Plantas Cultivadas*. Chile : Casillas 114-D, 1988.

UNAMUNDO, L.M. 1942. *Anales del Jardín Botánico. Contribución al Estudio de los Hongos Microscopicos*. Cuenca : s.n., 1942.