

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 ROSA (*Rosa sp.*), SECTOR
ALÁQUEZ. COTOPAXI. 2014”.**

Tesis presentada previa a la obtención del Título de **Ingeniero Agrónomo**

Autor:

Sr. Geovanny Patricio Quimbita Quimbita

Director:

Ing. Jorge Fabián Troya Sarsoza Mg.



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES
Latacunga – Ecuador

AUTORÍA

Yo, **GEOVANNY PATRICIO QUIMBITA QUIMBITA**, portador de la cedula N° 050375233-9, libre y voluntariamente declaro que la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ROSA (*Rosa sp.*), SECTOR ALÁQUEZ. COTOPAXI. 2014”**, es original, autentica y personal. En virtud, declaro que el contenido será de mi sola responsabilidad legal y académica.

.....
Quimbita Quimbita Geovanny Patricio

C.I. 050375233-9



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 Director del Tema de Tesis: **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ROSA (*Rosa sp.*), SECTOR ALÁQUEZ. COTOPAXI. 2014”**, debo confirmar que el presente trabajo de investigación fue desarrollado de acuerdo con los planteamientos requeridos.

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

Att:

.....

Ing. Fabián Troya Mg.

AVAL DEL TRIBUNAL

En calidad de Presidente del Tribunal del Trabajo de Investigación sobre el tema: **“CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ROSA (*Rosa sp.*), SECTOR ALAQUEZ. COTOPAXI. 2014”**, de autoría del egresado Quimbita Quimbita Geovanny Patricio; postulante de la carrera de Ingeniería Agronómica, considero que dicho informe investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes científicos – técnicos suficientes para ser sometidos a la evaluación del tribunal de Validación de Trabajo de Tesis de Grado, que el Honorable Consejo Académico de la Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales de la Universidad Técnica de Cotopaxi designe, para su correspondiente estudio y calificación.

DEDICATORIA

Este trabajo investigativo, va dedicado para las dos personas más importantes en mi vida: a mi padre Euclides Quimbíta, que con su gran valor y tenacidad ha sabido inculcarme valores muy importantes, uno de ellos es el compromiso con el cual hay que realizar cada una de las actividades que se presenten, ya sea a nivel académico, como también en el ámbito laboral, ese compromiso que sé que me va llevar muy lejos y me ayudará a superarme día a día; y como no, también dedicarlo a mi madre Blanca Quimbíta, su humildad y respeto hacia los demás me han enseñado a ser una persona sencilla y muy cordial con las personas.

Muchas gracias por apoyarme en todo y siempre estar al pendiente de mí, esta es una de tantas metas que voy conseguir, y espero siempre tenerlos presentes en cada uno de mis logros.

Geovanny Quimbíta

AGRADECIMIENTO

Deseo extender un agradecimiento muy efusivo a la Universidad Técnica de Cotopaxi por abrirme las puertas de tan noble institución y permitirme culminar mi carrera universitaria.

A mi tutor de tesis y miembros de mi tribunal, por las oportunas correcciones y observaciones dadas al presente trabajo, en son de que sea un documento que cumpla con lo establecido en el reglamento.

Y nuevamente quiero agradecer a mis padres Euclides y Blanca, al igual que a mis hermanos, Ruth y Luis, todo lo que soy ahora, se lo debo a ustedes.

Geovanny Quimbita

RESUMEN

La presente investigación “**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE ROSA (*Rosa sp.*), SECTOR ALÁQUEZ. COTOPAXI. 2014**”, tuvo por objetivo caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción en el cultivo de Rosa (*Rosa sp.*) en la parroquia Aláquez, cantón Latacunga de la provincia de Cotopaxi. Se usaron técnicas de aislamiento en laboratorio y la observación posterior del hongo en el Microscopio Trinocular CX31, para poder diferenciar sus partes y ratificarlas con la bibliografía existente. Los aspectos fundamentales de esta investigación fueron, la determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción de rosa que fue *Botrytis cinerea*, además se logró identificar signos y síntomas del hongo en campo, las técnicas empleadas fueron la observación directa y el registro fotográfico. Se caracterizó macro y microestructuras tales como talo, micelio, conidióforo y conidios asexuales, cuya comparación con claves taxonómicas existentes nos permitió ratificar la presencia del agente causal que es *Botrytis cinerea*, se pudo describir su ciclo de vida en condiciones controladas realizando la siembra y el aislamiento del patógeno en cajas Petri en un medio de cultivo PDA, con una duración de cuatro días a una temperatura de 22°C en una cámara de incubación. El producto de esta investigación ha sido consolidado en una guía didáctica de las características morfológicas del hongo en estudio para difundir los resultados obtenidos.

ABSTRACT

This research “Morphological characterization of fungal pathogens in rose crop (*Rosa sp.*) Aláquez. Cotopaxi 2014”, aimed to characterize morphologically phytopathogenic fungus that causes the greatest impact on production in the rose crop (*Rosa sp.*) in Aláquez Parish, Latacunga Canton in Cotopaxi Province. Laboratory isolation techniques and subsequent observation of the fungus in the Trinocular Microscope CX31 to differentiate parts and ratify the literature were used. Key aspects of this investigation were the determination of the phytopathogenic fungus of greatest impact on the production of rose, it was *Botrytis cinerea*, also the researcher identified signs and symptoms of the fungus into the field, direct observation and photographic records were used as techniques. Characterized macro-microstructures such as: talo, mycelium, conidiophore and asexual conidia, which their comparison with existing taxonomic keys allowed to confirm the presence of the causative agent is *Botrytis cinerea*, it could describe its life cycle under controlled conditions making planting and insolation of the pathogen in Petri dishes on a PDA culture medium, with a last of four days at 22°C temperature in an incubation chamber. The product of this research has been consolidated into a tutorial of the morphological characteristics of the fungus studied in order to socialize the results obtained.

ÍNDICE

AUTORÍA.....	ii
AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS.....	iii
AVAL DEL TRIBUNAL.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
OBJETIVOS.....	17
GENERAL.....	17
ESPECÍFICOS:.....	17
PREGUNTAS DIRECTRICES.....	18
CAPÍTULO I.....	19
1. MARCO TEÓRICO.....	19
1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ROSAL (<i>Rosa sp.</i>)..	19
1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS	19
1.3. TAXONOMÍA	19
1.4. ENFERMEDADES DE INTERÉS COMERCIAL DEL CULTIVO DE ROSA.	20
1.4.1. Oidio (<i>Sphaerotheca pannosa</i>).....	20
1.4.2. Mildiu Velloso (<i>Peronospora sparsa</i>)	20
1.4.3. Roya (<i>Phragmidium mucranatum</i>)	21
1.5. DESCRIPCIÓN DEL HONGO <i>Botrytis cinerea</i> EN ROSAS	21

1.5.1. Características morfológicas generales de <i>Botrytis cinerea</i>	21
1.5.2. Clasificación taxonómica	24
1.5.3. Epidemiología.....	24
1.5.4. Proceso de infección y producción de síntomas	25
1.5.5. Condiciones que predisponen a la planta para la infección.....	27
1.5.6. Dispersión.....	28
1.5.7. Sobrevivencia.....	28
1.6. PRODUCCIÓN, HECTÁREAS DE SIEMBRA, EXPORTACIONES DE ROSAS.	29
1.7. HONGOS.....	30
1.8. POSTULADOS DE KOCH.....	30
1.8.1. Primer postulado	30
1.8.2. Segundo postulado	33
1.8.3 Tercer postulado.....	34
1.8.4 Cuarto postulado	34
1.9. HONGOS FITOPATÓGENOS	34
1.9.1 Características generales	34
1.9.2. Estructuras somáticas	35
CAPÍTULO II.....	36
2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	36
2.1. MARCO ADMINISTRATIVO.	36
2.1.1. RECURSOS NECESARIOS.	36
2.1.1.1. Materiales.....	36
2.1.1.2. Equipos.....	36
2.1.1.3. Material de laboratorio.....	37
2.1.1.4. Material de aseo.....	37

2.1.1.5. Reactivos	38
2.1.1.6. Materiales de campo	38
2.1.1.7. Materiales de oficina.....	38
2.2. DISEÑO METODOLÓGICO.	39
2.2.1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	39
2.2.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	39
2.2.3. MÉTODOS	39
2.2.4. TÉCNICAS:	39
2.3. METODOLOGÍA	40
2.3.1. EN CAMPO	40
2.3.1.1. Delimitación del lugar de recolección.....	40
2.3.2. TOMA DE MUESTRAS	40
2.3.3. PROCEDIMIENTO EN LA TOMA DE MUESTRAS.....	41
2.3.4. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	41
2.3.5. AISLAMIENTO.....	41
2.3.6. PURIFICACIÓN	42
2.3.7. INOCULACIÓN	42
2.3.8. INCUBACIÓN.....	42
2.3.9. IDENTIFICACIÓN	42
2.3.10. DESCRIPCIÓN	42
CAPÍTULO III	44
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
3.1 DETERMINACIÓN DEL HONGO FITOPATÓGENO DE MAYOR IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN DE ROSA (<i>Rosa sp.</i>).....	44
3.2 IDENTIFICACIÓN DE SIGNOS Y SÍNTOMAS DEL HONGO <i>Botrytis</i> <i>cinerea</i> EN EL CULTIVO DE LA ROSA (<i>Rosa sp.</i>).....	46

3.3 CARACTERIZACIÓN DE MACRO Y MICROESTRUCTURAS DEL PATÓGENO	47
3.3.1. TALO.....	47
3.3.2. MICELIO	48
3.3.3. ESPORAS	49
3.3.4. CONIDIÓFORO.....	50
3.4. DESCRIPCIÓN DEL CICLO DE VIDA DEL PATÓGENO EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	51
CONCLUSIONES	53
RECOMENDACIONES	54
BIBLIOGRAFÍA	55
LINKOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	57

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro N° 1 Clasificación taxonómica de la Rosa (<i>Rosa sp.</i>).....	19
Cuadro N° 2 Descripción de los órganos de la rosa (<i>Rosa sp.</i>).....	20
Cuadro N° 3 Clasificación taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i>	24
Cuadro N° 4 Condiciones favorables para el desarrollo del hongo.....	25
Cuadro N° 5 Superficie sembrada y producción de rosas de exportación por provincias.....	29
Cuadro N° 6 Venta de rosas de exportación por provincias	29
Cuadro N° 7 Operacionalización de las variables	39
Cuadro N° 8 Condiciones edafoclimáticas de la parroquia Aláquez.....	40
Cuadro N° 9 Ventas, superficie y producción de rosas de exportación de Cotopaxi	45
Cuadro N° 10 Identificación de signos y síntomas del hongo <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de Rosa (<i>Rosa sp.</i>).....	46
Cuadro N° 11 Ciclo de vida del patógeno.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Micelio de <i>Botrytis cinerea</i>	22
Figura N° 2 (A) Conidióforo visto en el microscopio óptico, (B) Conidióforo visto en el microscopio electrónico.....	23
Figura N° 3 Conidios de <i>Botrytis cinerea</i> vistos en un microscopio óptico.....	23
Figura N° 4 <i>Botrytis cinerea</i> , visto en el microscopio.....	24
Figura N° 5 Ciclo de la enfermedad moho gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de rosa.....	27

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, el cultivo de Rosa (*Rosa sp*) ha tenido un crecimiento considerable en cuanto a hectáreas destinadas para su producción, es un cultivo que se encuentra en auge comercial debido a la gran demanda de este producto en el exterior, fruto del cual, a nivel de la sierra se siguen implementando hasta hoy varias pequeñas fincas florícolas y grandes empresas de producción. Como ya mencionamos, la gran mayoría de producción florícola se encuentra en la serranía ecuatoriana y se han destinado alrededor de 5473ha. para dicha producción, de los cuales 1256ha. están ubicadas en la provincia de Cotopaxi lo que corresponde al 22,95% del total nacional sembrado y en producción. (INEC, 2010)

En Cotopaxi, la zona en donde se concentra mayoritariamente la producción y las fincas es en el cantón Latacunga, luego le siguen Pujilí y Saquisilí. En Latacunga las parroquias Tanicuchí, Mulaló y Aláquez son las que concentran a la gran mayoría de fincas y por ende de la producción de la provincia. (INEC, 2010)

Una de las ventajas que tienen cada una de estas tres parroquias, es que están cerca a fuentes de agua para riego, lo cual ayuda al progreso de dichas empresas, y la Parroquia Aláquez no es la excepción, tiene diferentes fuentes de agua debido a que está cerca de los páramos, y del río Aláquez, que es la principal fuente de agua y alrededor de la cual se encuentran asentadas diferentes fincas florícolas. (GADPRA, 2015)

Uno de los problemas primordiales en el ámbito de fitosanidad, es el ataque de botrytis o pudrición gris (*Botrytis cinerea*) lo cual repercute en una baja calidad de las flores cuando se presenta un ataque severo de dicha enfermedad. (LaTorre, 1988)

JUSTIFICACIÓN

El propósito de esta investigación es lograr caracterizar la principal enfermedad fúngica de interés comercial que afecta al cultivo de rosa (*Rosa sp.*) así como también identificar las principales microestructuras que posee el hongo fitopatógeno en estudio.

Es muy importante realizar este trabajo, porque se genera información de relevancia obtenida en un laboratorio especializado para este fin, utilizando instrumentos de última tecnología, que permiten realizar un trabajo de calidad.

La caracterización morfológica de los hongos fitopatógenos, es un campo muy amplio de investigación, que actualmente no está muy profundizado a nivel de nuestra provincia, y existe muy poca información de relevancia.

Con la elaboración de la guía didáctica se simplifican los resultados obtenidos y la metodología usada en la investigación, para que sea más práctico y sencillo duplicar el ensayo en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi.

OBJETIVOS

GENERAL.

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción del cultivo de Rosa (*Rosa sp.*) sector Aláquez. Cotopaxi. 2014.

ESPECÍFICOS:

- Identificar el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción del cultivo de Rosas (*Rosa sp.*)
- Establecer signos y síntomas del hongo fitopatógeno de mayor impacto en el cultivo de Rosa (*Rosa sp.*) en campo
- Caracterizar macro y microestructuras del fitopatógeno.
- Describir el ciclo de vida del patógeno en condiciones de laboratorio.
- Elaborar una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo fitopatógeno en estudio.

PREGUNTAS DIRECTRICES.

- ¿Se reconocerá signos y síntomas del primordial hongo fitopatógeno en el cultivo de Rosa (*Rosa sp.*) en base a la observación realizada?
- ¿Cuál es el principal hongo fitopatógeno que afecta a la Rosa (*Rosa sp.*) en el sector de Aláquez?
- ¿Cuáles son las características del hongo fitopatógeno encontrado?

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DEL ROSAL (*Rosa sp.*)

Todas las variedades de rosal provienen de unas pocas especies silvestres; como ejemplo, se tiene la *Rosa canina*, originaria de Turquía y del centro de Europa. Actualmente se cultivan en todas las regiones del mundo, especialmente en Europa, China, India y el continente americano (Aldana, 1995)

1.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

Es un arbusto perenne, raíz fusiforme o ramificada; tallo leñoso; las ramas se metamorfosean en espinas (Aldana, 1995)

1.3. TAXONOMÍA

Las rosas (*Rosa sp.*) son arbustos de ornamento cultivados principalmente por sus hermosas flores, sus características y también sus vistosos frutos y atractivo follaje (Yong, 2004)

Cuadro N° 1 Clasificación taxonómica de la Rosa (*Rosa sp.*)

Reino	Vegetal
Subdivisión	Angiospermas
Clase	Dicotiledóneas
Familia	Rosáceas
Género	Rosa
Especie	Sp.

Fuente: (Aldana, 1995)

Elaborado por: El investigador

Cuadro N° 2 Descripción de los órganos de la rosa (*Rosa sp.*)

Órgano	Descripción
Raíz	Pivotante, vigorosa y profunda
Tallo	Leñoso
Hoja	Superficie lisa, cinco a siete foliolos.
Flores	Actinomorfas, aisladas, reunidas en inflorescencias.
Frutos	Secos, indehiscentes, monospermos y muy duros.

Fuente: (LaTorre 1988)

Elaborado por: El investigador

1.4. ENFERMEDADES DE INTERÉS COMERCIAL DEL CULTIVO DE ROSA.

1.4.1. Oidio (*Sphaerotheca pannosa*)

Síntomas: se caracteriza por el desarrollo de un micelio blanquecino en las hojas, ramillas, peciolos y sépalos florales. Necrosis de los tejidos parasitados (LaTorre, 1988)

Diseminación: Las conidias son diseminadas por el viento (LaTorre, 1988)

Sobrevivencia: Persiste asociado a tejidos enfermos aparentemente al estado de micelio o de conidias. Los cleistotecios son poco frecuentes. (LaTorre, 1988)

Control: Tratamientos químicos al observar los primeros signos de oídio con Azufre, dinocarp, benomilo, triadimefon. (LaTorre, 1988)

1.4.2. Mildiu Velloso (*Peronospora sparsa*)

Síntomas: Lesiones necróticas angulares con bordes café, localizadas entre las venas de las hojas. (BAYER, 2014)

Diseminación: Conidias dispersas por el viento. (BAYER, 2014)

Sobrevivencia: Por oosporas presentes en restos de tejidos enfermos. (BAYER, 2014)

Control: Eliminar restos de cultivos enfermos. Tratamientos químicos con Fosetil aluminio. (BAYER, 2014)

1.4.3. Roya (*Phragmidium mucranatum*)

Síntomas: Pequeñas pústulas anaranjadas se forman en el envés de las hojas. Manchas cloróticas aparecen en la parte superior de las hojas. En ataque fuertes se produce una fuerte defoliación (LaTorre, 1988)

Diseminación: las esporas son diseminadas por el viento. (LaTorre, 1988)

Sobrevivencia: En hojas y ramillas enfermas como teleutosporas. (LaTorre, 1988)

Control: Tratamientos químicos con axixarboxina, zineb, maneb, metiram, mancozeb. (LaTorre, 1988)

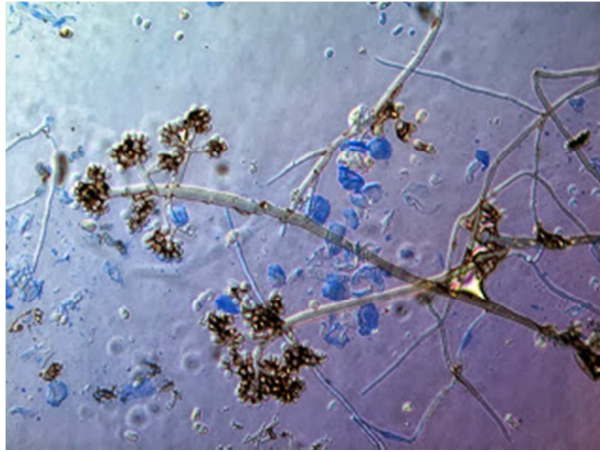
1.5. DESCRIPCIÓN DEL HONGO *Botrytis cinerea* EN ROSAS

1.5.1. Características morfológicas generales de *Botrytis cinerea*

Micelio. El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos, que se multiplican vegetativamente mediante división citoplasmática, siendo común que tenga lugar una división nuclear sin que se haya producido división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas con un elevado y variable número de núcleos. Características morfológicas como son la coloración y el diámetro de las hifas, son muy variables, dependiendo en gran medida de las condiciones de desarrollo del micelio. El micelio cumple una doble función: i) como estructura de propagación de la enfermedad, causada ésta por la dispersión de restos vegetales (tallos y hojas) infectados por el micelio y, ii) como estructura de resistencia. (Mohsin, 1990)

A partir del micelio, generalmente envejecido, se originan diversas estructuras, como son los macroconidióforos, los microconidióforos y los esclerocios, cuya finalidad es la propagación y supervivencia ante condiciones adversas. (Mohsin, 1990)

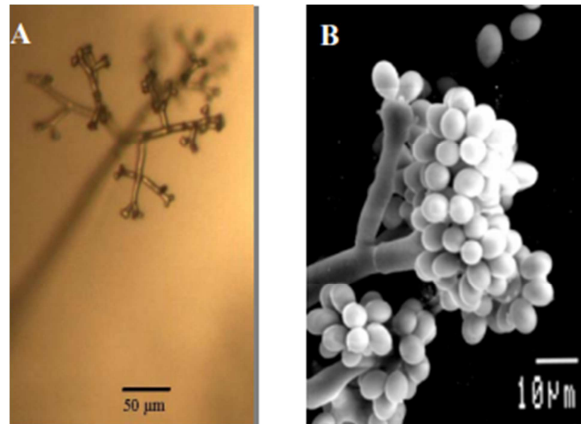
Figura N° 1 Micelio de *Botrytis cinerea*.



Fuente: (Espinosa, 2006)

Conidióforos o Macroconidióforos.- Los conidióforos o macroconidióforos se originan principalmente de la masa hifal, aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios. Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias. Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de ésta, se disponen los conidios o macroconidios, los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal, de manera que al separarse de éste se queda una herida en la región de unión. Los conidios se forman a partir de la gemación de células formadoras de conidios, las cuales se sitúan en las vesículas globosas. (Mohsin, 1990)

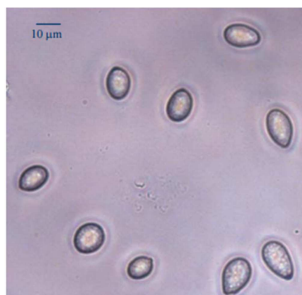
Figura N° 2 (A) Conidióforo visto en el microscopio óptico, (B) Conidióforo visto en el microscopio electrónico.



Fuente: (Espinosa, 2006)

Conidios o Macroconidios.- Los conidios o macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *B. cinerea*. Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo. En condiciones naturales, la viabilidad de los conidios depende de las condiciones ambientales (temperaturas extremas, humedad, exposición a la luz solar), habiéndose demostrado que el espectro de luz ultravioleta es el factor ambiental más importante en la mortalidad de los mismos. (Mohsin, 1990)

Figura N° 3 Conidios de *Botrytis cinerea* vistos en un microscopio óptico



Fuente: (Espinosa, 2006)

1.5.2. Clasificación taxonómica

Cuadro N° 3 Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*

Reino	Fungi
División	Amastigomycota
Clase	Deuteromicetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>cinerea</i>

Fuente: (Agrios, 1999)

Elaborado por: El investigador

Botrytis cinerea es el agente causal de la podredumbre gris, infecta a más de 200 especies vegetales, este patógeno puede atacar al cultivo en cualquier estado de desarrollo y puede infectar cualquier parte de la planta. (Agrios, 1999)

1.5.3. Epidemiología.

Figura N° 4 *Botrytis cinerea*, visto en el microscopio.



Fuente: (Espinosa, 2006)

Botrytis cinerea pertenece al grupo de los Ascomicetos, su infección se reporta únicamente en sistemas imperfectos; ataca hojas, tallos y flores, posee ciclos complejos. (Agrios, Fitopatología, 1995)

El principal síntoma de esta enfermedad es un halo necrótico de color morado en las rosas blancas; y el signo principal, es que se caracteriza por el desarrollo de manchas acuosas o necróticas seguido por una pudrición de los pétalos, de color grisáceo, con abundante desarrollo de un micelio gris sobre los tejidos parasitados, se favorece con la alta humedad ambiental y temperaturas frías. (LaTorre, 1988)

En poco tiempo ha desarrollado toda una estrategia de adaptación, sobrevivencia y virulencia en su hospedero la rosa. Es capaz de sobrevivir mediante el accionamiento de su efectiva maquinaria fisiológica, procesos de tolerancia, resistencia, inmunidad frente a todo tipo de estrés que se pueda presentar en el invernadero, ya sea de tipo biótico como abiótico. (Agrios, 1999)

Cuadro N° 4 Condiciones favorables para el desarrollo del hongo

	Germinación de conidias	Haustorios preliminares o primarios	Haustorios secundarios	Esporulación	Maduración, liberación y diseminación
Temp. °C	18 – 23	10 – 15	10 – 15	15 - 18	10 – 20
Hum. (%)	90 – 95	80	80 – 90	80 - 90	60 - 100
Tiempo de Infección (h)	2 – 3	11 – 40	50 – 70	72 - 90	120 - 240
Energía luminica	300 a 400 nanómetros				

Fuente: (EDIFARM, 2007)

Elaborado por: El investigador.

1.5.4. Proceso de infección y producción de síntomas

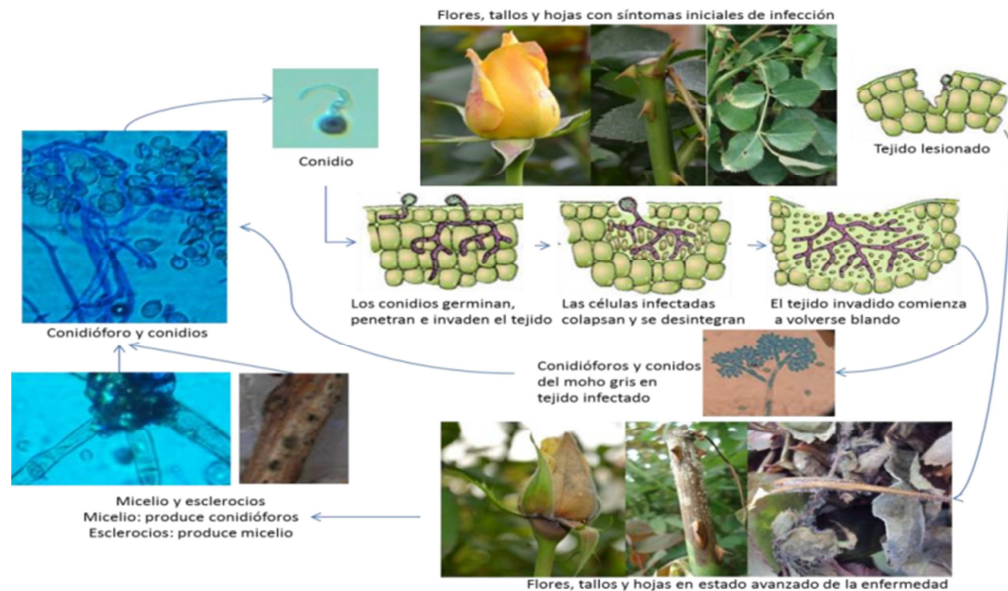
Los conidios que se forman a partir de esclerocios o de micelio en residuos de cosecha o infecciones activas en el hospedero son la fuente para el inicio de las infecciones. El micelio, los esclerocios y los conidios tienen diferentes habilidades para la supervivencia y la dispersión. También las funciones de estas estructuras varían dependiendo del ecosistema y clima donde se está generando la infección. (Agrios, Fitopatología, 1995)

Posterior a la penetración de la cutícula de la epidermis del hospedero, el hongo invade el tejido subepidérmico, inter e intracelularmente para establecer la infección. El hongo mata las células huésped antes de que sean invadidas. (Agrios, Fitopatología, 1995)

Botrytis cinerea secreta enzimas de degradación de la pared celular durante las etapas tempranas de la infección, se conoce que las poligalacturonasas (BcPGs) son necesarias para la plena virulencia de *B. cinerea*; se entiende como patogenicidad la habilidad del patógeno para causar enfermedad y como virulencia el grado de patogenicidad del hongo. (Agrios, Fitopatología, 1995)

De forma general, el ciclo de infección puede considerarse dividido en varias etapas. Primero la adhesión de los conidios sobre la superficie del huésped inmediatamente después de su hidratación. Posteriormente la germinación de los conidios si las condiciones son favorables como la temperatura, presencia de nutrientes exudados en la cutícula, edad y concentración del inoculo y edad del tejido. En promedio la infección se logra entre 5–8 h, durante las cuales el conidio debe permanecer húmedo. Luego se da la penetración del tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, o mediante la participación de distintas enzimas, la secreción de toxinas o combinación de estas. Cuando esta fase se ha dado, se genera la muerte de las células adyacentes al punto de penetración dando lugar a la formación de una lesión primaria. Una vez vencidas las defensas de la planta se inicia la diseminación en el tejido vegetal circundante, originando la colonización y la maceración. Finalmente se da la esporulación del hongo sobre el tejido macerado, produciéndose una nueva generación de conidios que están listos para ser dispersados e iniciar un nuevo ciclo de infección (Elhad, 2007)

Figura N° 5 Ciclo de la enfermedad moho gris causada por *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosa



Fuente: (Espinosa, 2006)

1.5.5. Condiciones que predisponen a la planta para la infección

Se ha confirmado que el etileno predispone las flores y frutos de algunas plantas al ataque del hongo *Botrytis cinerea*. (Carrasco, 2008)

El incremento de agua e intercambio gaseoso en los tejidos conducen a un aumento de la permeabilidad celular predisponiendo así a los tejidos a una eventual infección. (Carrasco, 2008)

Los carbohidratos en los tejidos son factores importantes de la predisposición a la enfermedad. Se ha comprobado que un alto contenido de azúcares en las hojas de begonia hacían susceptibles a la infección de *Botrytis cinerea* (Carrasco, 2008)

Las deficiencias nutricionales de la planta son importantes, pues conducen a una senescencia prematura facilitando así el ataque por parte del patógeno, al provocar una cierta debilidad en las plantas y sus órganos. (Carrasco, 2008)

Algunos elementos de la fertilización tienen mayor importancia en la

susceptibilidad al ataque del patógeno, el exceso de nitrógeno puede causar una mayor presencia de *Botrytis cinerea*, lo mismo sucede con la deficiencia de calcio la cual ocasiona paredes celulares muy delgadas y de fácil acceso del haustorio hacia el interior de la célula el cual favorece al desarrollo del hongo. (Carrasco, 2008)

Botrytis cinerea disminuye notablemente su esporulación con temperaturas superiores a los 25°C, al combinar temperaturas de 20°C y 25°C durante el período de incubación de la enfermedad, en general el hongo requiere de un clima húmedo (superiores a 90%) y una temperatura de 18°C a 23°C para desarrollarse adecuadamente y producir una infección. (Carrasco, 2008)

1.5.6. Dispersión

La dispersión de las esporas se encuentra relacionada con los cambios de temperatura y humedades relativas, es decir temperaturas menores a 15° C y humedades relativas superiores a 85%, otro factor para la liberación de las esporas es mediante las salpicaduras de agua por daños en tuberías de riego o lavados los cuales ayudan a la propagación (incremento del inóculo del hongo *Botrytis cinerea*), también un segundo factor son las corrientes de aire las cuales liberan y llevan el ciclo infectivo hacia otras plantas vecinas, se debe tomar en cuenta que se puede propagar la enfermedad con la utilización de herramientas que no se encuentra desinfectadas, si han tenido un previo contacto con material vegetal infectado. (Agrios, 1999)

Una vez dispersas las conidias pueden germinar en una película de agua que contenga solutos, cuantas más conidias hay en una gota de agua mayor es la probabilidad de una infección agresiva del hongo. Aunque las referencias sobre esporas germinando, se debe tomar con mucha reserva; ciertamente, parece probable que las esporas, particularmente las higroscópicas pueden actuar como núcleos de condensación de gotas de rocío y el agua podría ser retenida en una vaina mucilaginosa presente en las conidias de *Botrytis cinerea*. (Agrios, 1999)

1.5.7. Sobrevivencia

El hongo en el suelo puede estar presente por un corto plazo de tiempo

mientras tanto que en las plantas infectadas este hongo forma esclerocios y puede estar viable largos períodos esperando las condiciones adecuadas para volver a su ciclo infectivo. (LaTorre, 1988)

1.6. PRODUCCIÓN, HECTÁREAS DE SIEMBRA, EXPORTACIONES DE ROSAS.

Cuadro N° 5 Superficie sembrada y producción de rosas de exportación por provincias.

Provincia	Característica	Superficie plantada (ha)	Producción (tallos)	% Plantada	% Producción
CAÑAR	Bajo invernadero	22	10910000	0,40%	0,46%
CARCHI	Bajo invernadero	831	29	15,18%	0,00%
COTOPAXI	Bajo invernadero	1256,00	519500443	22,95%	21,95%
IMBABURA	Bajo invernadero	40	6032488	0,73%	0,25%
PICHINCHA	Bajo invernadero	3148,00	1789379686	57,52%	75,60%
PICHINCHA	En campo abierto	176	41007133	3,22%	1,73%
Total Nacional		5473	2366829779	100%	100%

Fuente: (INEC, 2010) Visualizador de Estadísticas Agropecuarias del Ecuador

Elaborado por: El Investigador

Cuadro N° 6 Venta de rosas de exportación por provincias

Provincia	Característica	Unidad de embalaje	Ventas (\$)	Ventas total por provincias (\$)	%Ventas por provincia
CAÑAR	Bajo invernadero	Tabaco	49874,00	49874,00	0,25%
CARCHI	Bajo invernadero	Full tabaco	29	29	0,00%
COTOPAXI	Bajo invernadero	Full tabaco	1184318,00	6293168,00	31,45%
COTOPAXI	Bajo invernadero	Bonche	3969774,00		
COTOPAXI	Bajo invernadero	Tabaco	1139076,00		
IMBABURA	Bajo invernadero	Full tabaco	5632,00	158214,00	0,79%
IMBABURA	Bajo invernadero	Bonche	150312,00		
IMBABURA	Bajo invernadero	Tabaco	2270,00		
PICHINCHA	Bajo invernadero	Bonche	5031836,00	13507288,00	67,51%
PICHINCHA	En campo abierto	Full tabaco	45120,00		
PICHINCHA	Bajo invernadero	Tabaco	3237804,00		
PICHINCHA	En campo abierto	Tabaco	136554,00		
PICHINCHA	Bajo invernadero	Bouquet	1215056,00		
Total Nacional			20008573,00	20008.573,00	100,00%

Fuente: (INEC, 2010) Visualizador de Estadísticas Agropecuarias del Ecuador

Elaborado por: El Investigador

1.7. HONGOS

Los hongos son organismos filamentosos simples, no tienen 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. (Barreno, 1997)

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. (Barreno, 1997)

1.8. POSTULADOS DE KOCH

Para la determinación de los agentes causados, Koch estableció cuatro postulados que aún se consideran de indispensables cumplimiento. Solo cuando estos postulados se aplican y son confirmados, el organismo aislado se declara agente causal. Los llamados postulados de Koch son los siguientes: (Charles, 2008)

1. El organismo debe estar constantemente asociado con los síntomas observados.
2. Debe ser aislado y purificado, y encontrarse libre de otros organismos.
3. Al inocularlo sobre una planta hospedante susceptible, debe reproducir los mismos síntomas observados.
4. El organismo debe ser reaislado de la planta hospedante inoculada y en cultivo puro debe mostrar las mismas características que el cultivo original.

1.8.1. Primer postulado

El organismo debe ser encontrado con la enfermedad en todos los casos observados.

El primer postulado muestra la necesidad de la asociación constante de un agente biótico con el hospedero enfermo, repitiéndose esta cláusula en todos los casos. (Charles, 2008)

a) Toma de muestras

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 (Carrasco, 2008).

b) 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, cuerpos fructíferos (picnidios, peritecas, acérvulos, etc.). 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).

c) 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 puede aparecer uno después de otro en un mismo hospedante. En general, los hongos producen una necrosis local o general o la muerte de los tejidos vegetales que infectan, hipertrofia e hipoplasia o atrofia de plantas completas o de sus órganos, e hiperplasia o crecimiento excesivo de ellas o de algunos de sus órganos. (Agrios, 1999).

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

d) 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. (Herrera, 1994)

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. (Herrera, 1994).

e) 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. (Herrera, 1994)

f) 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, 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).

1.8.2. Segundo postulado

El microorganismo debe aislarse en cultivo puro y deben establecerse sus características físicas (forma, tamaño, fisiología, etc.).

En 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)

a) 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. (Herrera, 1994).

b) 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. 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. (Herrera, 1994).

c) 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)

d) Medios de cultivos usados en el aislamiento de hongos

Agar harina de avena (OA), agar clavel (CLA), agar arena, agar nutriente sintético (SNA), medio de agar extracto de malta (AEM), etc., se suelen utilizar en laboratorios especializados. La temperatura habitual de incubación de los hongos es entre 25 y 28 °C. (Rodríguez, 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. (Rodríguez, 2005)

1.8.3 Tercer postulado

Cuando se inocula una planta sana, los síntomas deben reproducirse (Rodríguez, 2005)

1.8.4 Cuarto postulado

Se debe volver a aislar el microorganismo de la planta inoculada artificialmente, y sus características deben coincidir con las determinadas anteriormente. (Rodríguez, 2005)

1.9. HONGOS FITOPATÓGENOS

Los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos eucarióticos, esporógenos, 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. (Agrios, 1999).

1.9.1 Características generales

Los hongos son organismos carentes de clorofila que se reproducen mediante esporas. Son por lo general filamentosos y multicelulares, con núcleos que se observan con facilidad. Los filamentos constituyen el cuerpo (soma) de los

hongos que se alargan mediante un crecimiento especial y un pequeño fragmento de ellos puede reproducirse un nuevo individuo. (Herrera, 1994).

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

1.9.2. Estructuras somáticas

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

Las hifas pueden ser septadas o sin septos (lisas o cenocíticas) este último tipo de hifa es característico de los hongos inferiores y cuando envejecen pueden formarse septos en varios lugares. Los septos varían en su estructura y pueden ser simples o complejos. Cuando las hifas no presentan septas, el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando las presentan el micelio se dice que es tabicado. (Agrios, Fitopatología, 1995).

CAPÍTULO II

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. MARCO ADMINISTRATIVO.

2.1.1. RECURSOS NECESARIOS.

2.1.1.1. Materiales

Institucionales.

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

Recursos humanos

- **Autor:** Geovanny Patricio Quimbita Quimbita
- **Director de tesis:** Ing. Fabián Troya Mg.
- **Miembros del tribunal:**
 - Ing. Emerson Jácome Mg,
 - Ing. Luis Benavides,
 - Ing. Paolo Chasi.

2.1.1.2. Equipos

- Incubadora Memmert IN 110
- Balanza digital Marenfield
- Estufa eléctrica Hometech
- Microscopio Olympus Trinocular CX31
- Refrigeradora Indurama R1-425
- Cámara de flujo laminar Aura Mini
- Autoclave Tuttnaver 2540 Semiautomático

- Destilador de agua Waterwise 9000
- Cámara científica Infiniti 1-2CB
- Camara digital Samsung

2.1.1.3. Material de laboratorio

- Micro tubos
- Goteros de plástico
- Papel aluminio
- Pipeta
- 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

2.1.1.4. Material de aseo

- Pala para basura
- Escoba
- Trapeadores

- Detergente
- Limpiones
- Lava
- Baldes de 10 lts

2.1.1.5. Reactivos

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

2.1.1.6. Materiales de campo

- Tijera Felco 2
- Fundas de Papel
- Fundas de Plástico
- Bisturí
- Cámara
- GPS
- Libro de Campo

2.1.1.7. Materiales de oficina

- Computadora
- Internet
- Flash Memory

2.2. DISEÑO METODOLÓGICO.

2.2.1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Cuadro N° 7 Operacionalización de las variables

CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	ÍNDICE	TÉCNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de Rosa (<i>Rosa sp.</i>)	Talo	Tipo	Observación	Microscopio
	Micelio	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

Elaborado por: El Investigador

2.2.2. TIPO DE INVESTIGACIÓN

Esta investigación es descriptiva debido a que se puntualizan las características que se hallaron en las prácticas de inoculación e identificación microscópica del hongo fitopatógeno (*Botrytis cinerea*).

2.2.3. MÉTODOS

Método deductivo, se utilizó este método debido a que se recopila la información general del fitopatógeno y se ratifica los resultados obtenidos, comparando con la literatura consultada anteriormente.

Se utiliza también el método analítico y descriptivo debido a que se revisa y discute la literatura consultada, para que, en base a los resultados obtenidos, realizar la descripción de las microestructuras identificadas en laboratorio, del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*.

2.2.4. TÉCNICAS:

Observación.- Consiste en examinar, todos los sucesos de manera directa y abierta con el propósito de obtener información eficaz del fenómeno que se investiga. La observación permitió conocer la realidad en la que se desarrolla el hongo fitopatógeno (*Botrytis cinerea*), además permitió observar los signos y síntomas que presentan en el cultivo.

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. EN CAMPO

2.3.1.1. Delimitación del lugar de recolección

Las muestras se recolectaron en el Sector de Aláquez, que está ubicado en la parte nororiental de la ciudad de Latacunga.

2.3.1.2. Ubicación Política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Latacunga
- **Parroquia:** Aláquez

2.3.1.3. Condiciones Edafoclimáticas

Cuadro N° 8 Condiciones edafoclimáticas de la parroquia Aláquez

Condiciones Edafoclimáticas	
Temperatura anual media (°C)	13°C
Humedad Relativa (%)	75%
Precipitación anual (mm)	719,2mm
Textura	Areno Arcillosa
pH	5 - 7
Riego	Diversos sistemas de riego para cada sector de la Parroquia

Fuente: (GADPRA, 2015)

Elaborado por: El Investigador

2.3.2. TOMA DE MUESTRAS

Se realizó la toma de muestras al azar del hongo fitopatógeno (*Botrytis cinerea*) en el cultivo de Rosa (*Rosa sp.*), del invernadero de rosas del señor Luis Euclides Quimbita, ubicado en la parroquia Aláquez; y luego se trasladó las muestras al laboratorio para su respectiva descripción

2.3.3. PROCEDIMIENTO EN LA TOMA DE MUESTRAS

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

2.3.4. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

- 1) Medir 500ml de agua, bajar el pH con ácido cítrico, y pesar 200g de papa pelada y picada en cuadros finos. Poner la papa y el agua en una olla, para cocinarlos durante 10 minutos.
- 2) Luego pasamos por un colador la papa cocinada, y la solución la ponemos nuevamente en la olla a fuego lento, reponemos en agua que se evaporó, hasta completar nuevamente los 500ml y finalmente añadimos 15g. de agar, 20g. de dextrosa o sacarosa y 2g. de levadura.
- 3) Trasvasar la solución obtenida a un Erlenmeyer, y taparlo con papel aluminio, para luego someterlo a esterilización en el autoclave, durante 35 minutos.
- 4) Luego de esterilizar el medio de cultivo, hay que colocar el PDA en las cajas Petri, y esperar 5 a 10 minutos, hasta que se gelatinice.

2.3.5. AISLAMIENTO

Se procedió a tomar porciones de tejido enfermo a continuación se lavó en agua corriente, se secó los tejidos con papel absorbente, y por último se desinfectó en una solución 2:1 de cloro, se lavó dos veces con agua destilada estéril y se eliminó excesos de agua, este material lavado, desinfectado y seco se colocó en cajas con PDA solidificado. Se incubó a 22°C y se observó durante los siguientes 5 días.

2.3.6. PURIFICACIÓN

Se realizó al aislamiento, utilizando porciones de micelio de las cajas Petri; esto se logró con la ayuda de materiales específicos de laboratorio como por ejemplo las azas de siembra.

2.3.7. INOCULACIÓN

Se procedió a inocular el posible hongo fitopatógeno en medio de cultivo PDA, bajo condiciones controladas de esterilidad y asepsia. Se realizó una esterilización constante de cada uno de los materiales utilizados.

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

2.3.8. INCUBACIÓN

Para la incubación, la caja Petri se colocó en la incubadora a 22 °C y 70% de humedad relativa, durante 7 días aproximadamente, según tengamos el desarrollo del micelio del hongo.

2.3.9. IDENTIFICACIÓN

Observación microscópica

Técnica de cinta pegante: Se procedió a realizar un dobléz de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostuvo con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después colocamos una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procedió a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 40x y 100x, de acuerdo a como se observe de mejor manera las microestructuras fúngicas.

2.3.10. 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

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 conidiósporo, esporangiósporos, forma y tamaño de las esporas o conidios.

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

- Se prepararan las cajas Petri con las cepas de hongos aislados, una en cada caja Petri.
- Se tomó un trozo de cinta masking transparente de cuatro cm. de largo y se fijó en el cuerpo fructífero, tomando directamente de la caja Petri, donde se encuentran las cepas puras.
- Se observaron al microscopio con cada uno de los aumentos existentes en el Microscopio Olympus Trinocular CX31, y se procedió a tomar fotografías microscópicas de las diferentes estructuras con una cámara.
- Se creó un archivo con las fotografías tomadas de las cepas para luego realizar los postulados de Koch y cumplir con el segundo ítem.
- Se realizó un cuadro comparativo con los hongos reaislados, para ver si eran el mismo hongo que se inoculó.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 DETERMINACIÓN DEL HONGO FITOPATÓGENO DE MAYOR IMPORTANCIA EN LA PRODUCCIÓN DE ROSA (*Rosa sp.*).

De acuerdo a la bibliografía citada, el hongo que causa mayor daño, en el cultivo de Rosa (*Rosa sp.*) es la Botrytis (*Botrytis cinerea*) debido a que causa graves daños a la calidad de los tallos, y ocasiona pérdidas cuantiosas en las empresas al disminuir la calidad de las flores de exportación.

Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de manchas acuosas o necróticas de color morado (en variedades de rosa blancas) seguido por una pudrición de los pétalos, de color grisáceo, con abundante desarrollo de un micelio gris sobre los tejidos parasitados. (LaTorre, 1988)

La exportación de rosas viene siendo una de las actividades de mayor importancia dentro de la economía de la sierra, ya que actualmente es el principal producto exportable de nuestra región, y en cifras, anualmente se exportan alrededor de 20 millones de dólares, y el total de producción de tallos está cerca de 2 mil millones y medio (INEC 2015).

En la Provincia de Cotopaxi existen cerca de 1256 ha de producción de rosas, lo que equivale al 22,95% del total nacional, y solo es superado por Pichincha que posee el 75,6%.

Prejuicios e Importancia.

Botrytis cinerea ha sido considerado una enfermedad de alta importancia ya que afecta un amplio número de cultivos especialmente aquellos de alto valor como ornamentales, hortalizas y frutales alrededor del mundo. Sin control efectivo pre y pos cosecha ocasiona grandes pérdidas económicas pues afecta la productividad no solo en términos de cantidad sino de calidad del producto cosechado. (Castaño, 2002)

Cuadro N° 9 Ventas, superficie y producción de rosas de exportación de Cotopaxi

Característica	Unidad de embalaje	Ventas (\$)	Ventas total (\$)	% Ventas	Superficie Plantada (ha)	Producción (Tallos)	% Plantada	% Producción
Bajo invernadero	Full tabaco	1184318	6293168	31,45%	1256	519500443	22,95%	21,95%
Bajo invernadero	Bonche	3969774						
Bajo invernadero	Tabaco	1139076						
Total Nacional		20008573	20008573		5473	2366829779		

Fuente: INEC 2015, Visualizador de Estadísticas Agropecuarias del Ecuador

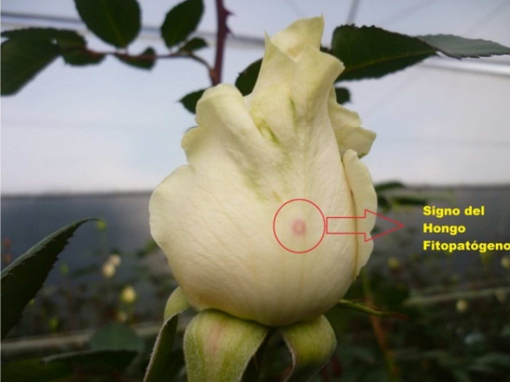

Elaborado por: El Investigador

Distribución Geográfica de la Producción y las zonas de perjuicios.

En la provincia de Cotopaxi, los cantones que poseen fincas de producción de rosas de exportación son: Latacunga (donde se concentran la mayoría de fincas florícolas), Pujilí y Saquisilí. Estas mismas zonas son muy susceptibles a la antes mencionada enfermedad fúngica, debido a que es un cultivo bajo cubierta plástica, esta condición crea un ambiente óptimo para el desarrollo de la enfermedad. (INEC 2015)

3.2 IDENTIFICACIÓN DE SIGNOS Y SÍNTOMAS DEL HONGO *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE LA ROSA (*Rosa sp.*).

Cuadro N° 10 Identificación de signos y síntomas del hongo *Botrytis cinerea* en el cultivo de Rosa (*Rosa sp.*)

Signos / Síntomas	Bibliografía	Campo	Fotos
Síntomas	Halo necrótico de color morado en las rosas de color blanco y también desarrolla pústulas blancas en las rosas rojas. (LaTorre, 1988)	Se Ratifica la Bibliografía (LaTorre, 1988)	
Signos	Desarrollo de manchas acuosas o necróticas seguido por una pudrición de los pétalos, de color grisáceo, con abundante desarrollo de un micelio gris sobre los tejidos parasitados. (LaTorre, 1988)	Se ratifica lo mencionado por: (LaTorre, 1988) y dichas muestras se utilizaron para el aislamiento del hongo en laboratorio.	

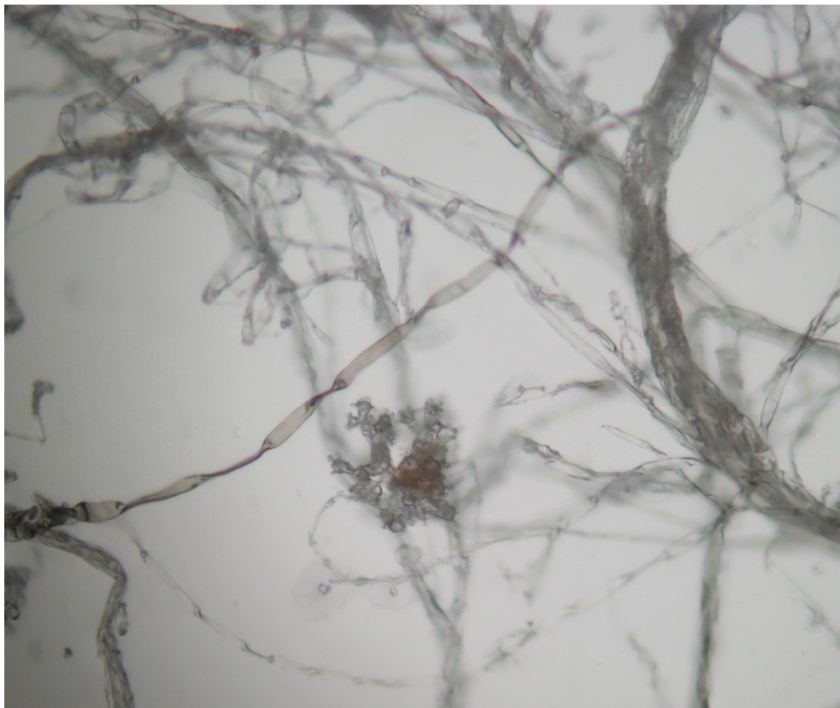
Elaborado por: El investigador

3.3 CARACTERIZACIÓN DE MACRO Y MICROESTRUCTURAS DEL PATÓGENO

3.3.1. TALO

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x en campo claro y regulando la intensidad de la luz del microscopio a 4,5 unidades.

Imagen N°1: Talo miceliar de *Botrytis cinerea* 200x



Fuente: El investigador

Talo miceliar se presenta en los Ascomicetes, el micelio posee septos que se forman por invaginación de la pared celular hasta dejar un poro en el centro. (Agrios, 1999)

En la imagen N°1 se puede observar el tipo de talo miceliar. Este tipo de talo es característico de los Ascomicetes, debido a sus hifas septadas. Se ratifica lo mencionado por (Agrios, 1999)

3.3.2. MICELIO

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x en campo claro. Regulando la intensidad de la luz del microscopio a 4 unidades.

Imagen N° 2: Micelio tabicado de *Botrytis cinerea* 200x



A.- Hifa; B.- Septo, tabicación o división de la hifa.

Fuente: El investigador.

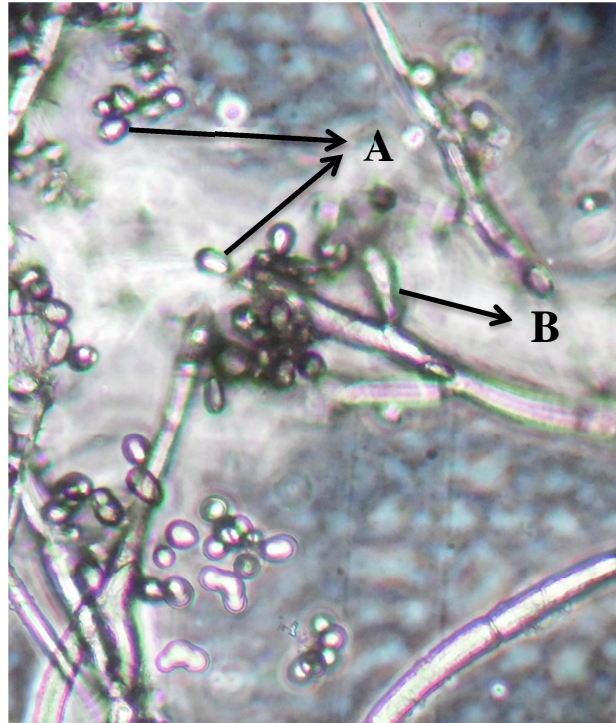
Cuando las hifas no presentan septos o divisiones, el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando las presentan el micelio se dice que es tabicado. (Agrios, 1995).

Como se puede aprecia en la imagen N° 2, tenemos un tipo de micelio tabicado gracias a que las hifas poseen septos o divisiones, concordando con lo que menciona (Agrios, 1995)

3.3.3. ESPORAS

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x, en campo claro, y regulando la intensidad de luz del microscopio a 5 unidades.

Imagen N° 3: Conidios asexuales de *Botrytis cinerea* 200x



A.- Conidio asexual; B.- Conidióforo

Fuente: El investigador

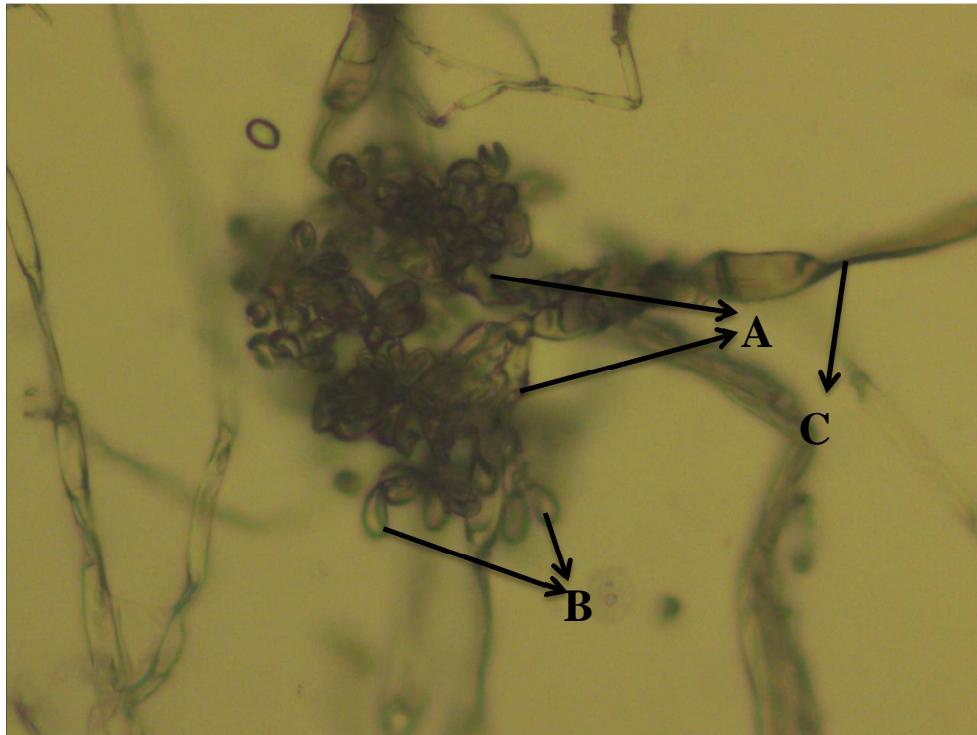
Los conidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *Botrytis. cinerea*. (Mohsin, 1990)

En la imagen N° 4 se puede observar a los conidios que son la principal estructura de dispersión del hongo, y poseen una forma ovalada, y de acuerdo a lo mencionado por (Mohsin, 1990)

3.3.4. CONIDIÓFORO

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x, en campo claro, y regulando la intensidad de luz del microscopio a 4 unidades.

Imagen N° 4: Conidióforo de *Botrytis cinerea* 200x.



A.- Conidióforo de *B. cinerea*. B.- Conidios. C.- Hifa.

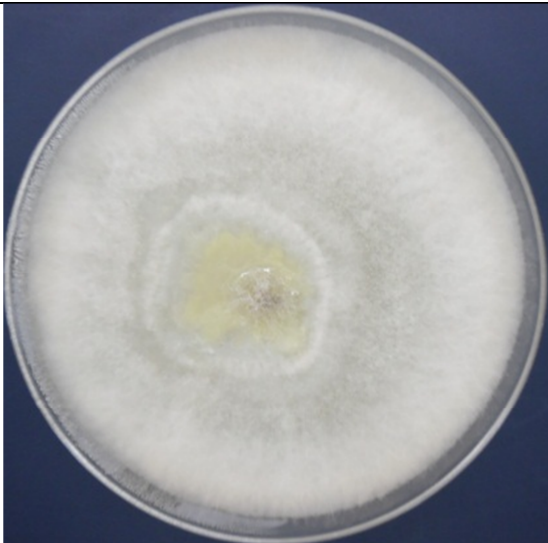
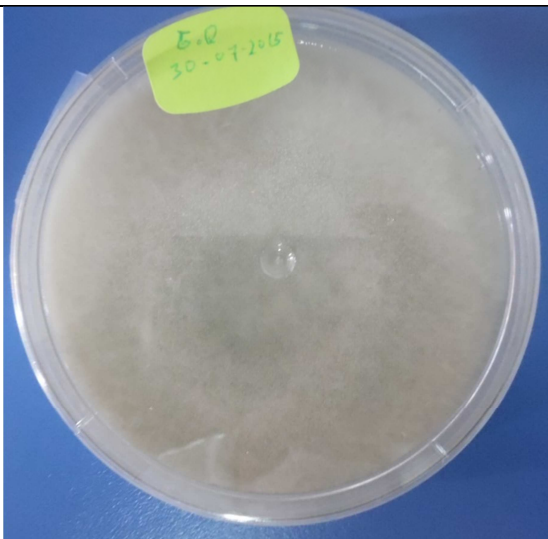
Fuente: El investigador.


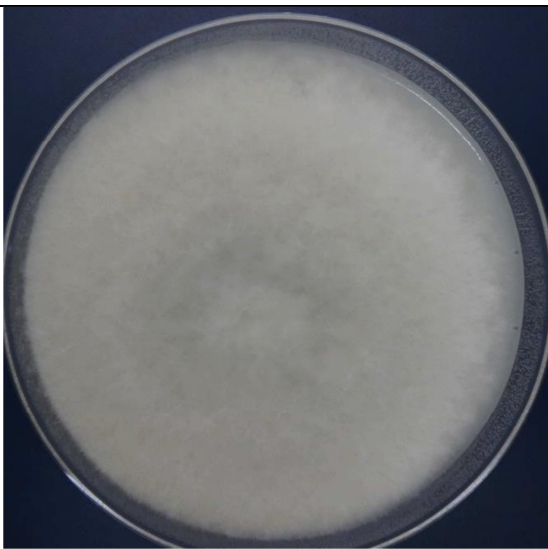
El conidióforo es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Se localizan en el extremo de las hifas las cuales levantan los conidióforos en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia. (González, 1989).

En la imagen N° 4 se observa el conidióforo de *Botrytis cinerea*, se ratifica lo mencionado por (González, 1989), es decir, se forma primero el conidióforo para que esta estructura sirva de base y sostén para los conidios que son las encargadas de propagar al hongo fitopatógeno.

3.4. DESCRIPCIÓN DEL CICLO DE VIDA DEL PATÓGENO EN CONDICIONES DE LABORATORIO

Cuadro N° 11 Ciclo de vida del patógeno.

Actividad	Tiempo (horas / días)	Temperatura (°C)	Gráfico
Siembra del Hongo Fitopatógeno aislado	10 min	22°C	
Producción de Talo y expansión de los haustorios	Talo pequeño 24H (1er día) Talo grande 48h (2do día)	22°C	

Formación de micelio y conidióforos	72 h (3er día)	22°C	 <p>A photograph of a petri dish containing a light-colored, fuzzy fungal growth on a dark surface. A small yellow label is attached to the top edge of the dish.</p>
Producción de conidios	96 h (4to día)	22°C	 <p>A photograph of a petri dish showing a more dense and uniform layer of light-colored fungal growth covering the surface.</p>

Elaborado por: El investigador

CONCLUSIONES

- El hongo que causa mayor impacto en la producción de Rosa (*Rosa sp.*) en el sector de Aláquez, Cotopaxi, es la botrytis o pudrición gris (*Botrytis cinerea*) porque ocasiona grandes pérdidas económicas al no lograr un buen control de la misma, esta enfermedad fúngica está presente en cultivo y poscosecha.
- El síntoma más representativo del hongo fitopatógeno (*Botrytis cinerea*) es el halo de color morado en los pétalos, lo cual posteriormente se manifestará en el signo característico de la enfermedad que es la pudrición gris, que se caracteriza por el abundante micelio que produce.
- *Botrytis cinerea* se caracteriza por tener un talo de tipo miceliar que es característico de los ascomicetes con hifas septadas; el tipo de micelio propio de este patógeno es tabicado; además posee conidióforos que son las estructuras de sostén en las cuales se forman los conidios o esporas asexuales encargadas de la diseminación del hongo fitopatógeno.
- El ciclo de vida de *Botrytis cinerea* en condiciones de laboratorio a 22°C, es de 4 días, desde la siembra de las esporas e hifas, hasta que se diferencian las estructuras de reproducción asexual del hongo fitopatógeno.
- Se diseñó la guía didáctica del ensayo, donde se indica la metodología usada y los resultados obtenidos en la investigación realizada, dicha guía didáctica se encuentra en el anexo 4 de esta investigación.

RECOMENDACIONES

- Las muestras vegetales del hongo fitopatógeno, deben ser bien recolectadas y en lo posible, evitar cualquier tipo de contaminación externa, para lograr muy buenos resultados.
- Para visualizar mejor las microestructuras del hongo fitopatógeno (*Botrytis cinérea*) se debe usar el lente 20x del microscopio Olympus que se halla en el laboratorio de la Universidad; pero si se desea realizar una observación más detallada y específica de una sola microestructura, es necesario utilizar el lente 100x, pero hay que usar un aceite especial que viene en el microscopio, para que se logre enfocar bien lo que se desea identificar.
- Para disminuir la contaminación por bacterias en cada una de las muestras de las cajas Petri, es necesario bajar el pH del PDA a 6.5, utilizando ácido cítrico, en una dosis de 1g por cada 5 litros de PDA.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. (1995). Fitopatología. México: Uyhea.
- Agrios, G. (1999). Fitopatologia 2 ed. Mexico: LIMUSA.
- Aldana, H. (1995). Producción Agropecuaria 2. En Producción Agropecuaria 2. Bogotá, Colombia: Terranova.
- Barreno, E. (1997). Caracteres Táxonómicos. McGrau-Hill.
- Carrasco. (2008). Hongos fitopatógenos II.
- Castaño, J. (2002). Principios básicos de epidemiología (Primera ed.). Centro.
- Charles, V. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología (Vol. 26). Medellin - Colombia: Revista "Agronomía Colombiana" de la Universidad Nacional de Colombia.
- EDIFARM. (2007). Vademécum florícola (Quinta ed.). Quito: Edifarm.
- Elhad, Y. (2007). Botrytis spp. and Diseases they cause in Agricultural systems. Netherlands.
- Espinosa, M. (2006). Estudio de la Variabilidad Genética y Organizacion Cromosómica del Hongo Fitopatógeno Botrytis cinerea. Puerto Real.
- GADPRA. (2015). Gobierno autónomo descentralizado parroquial rural de Aláquez. Latacunga - Cotopaxi.
- González, L. (1989). Introducción a la Fitopatología.
- Herrera, M. (1994). Fitopatología General. La Habana - Cuba: Felix Varela.
- INEC. (2010). Informacion Cantonal Censal. Quito.
- LaTorre, B. (1988). Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Chile: Casilla 114-D.

Mohsin, G. (1990). Le cycle sexue in vitro de *Botryotinia fuckeliana* (DeBary) forme parfaite de *Botrytis cinerea* (Pers.): Dèterminisme; optimisation des conditions d'obtention. Tesis doctoral. Universidad de Lille.

LINKOGRAFÍA

BAYER. (2014). Bayercropscience. Recuperado el 23 de 06 de 2014, de <http://www.bayercropscience.cl/soluciones/fichaproblema.asp?id=64>

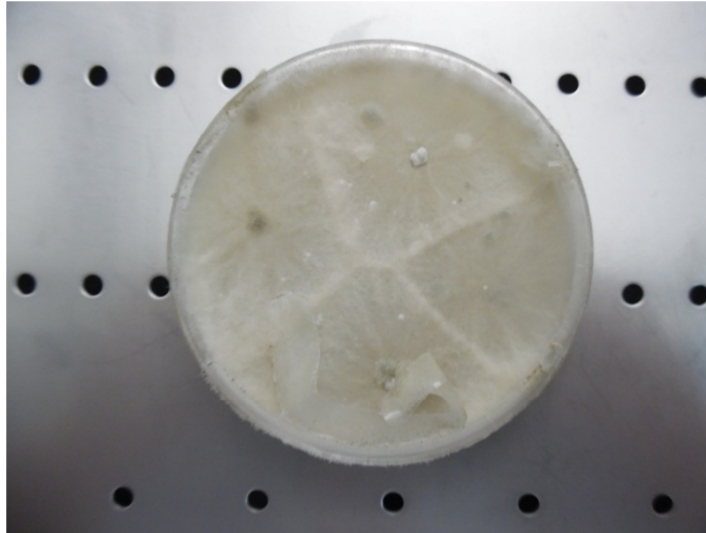
Rodriguez, M. (2005). Infecciones causadas por el género *Fusarium*, Servicio de micología. Recuperado el Junio de 2012, de Centro Nacional de Micología: www.seimc.org/control/revciones/micologia/fusarium.htm.

Yong, A. (2004). Redylac. Recuperado el 20 de 06 de 2014, de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193217832008>

ANEXOS

ANEXO 1: FOTOGRAFÍAS.

Fotografía N° 1: Crecimiento de los haustorios de *Botrytis cinerea*



Fotografía N° 2: Caja Petri contaminada con bacterias



Fotografía N° 3: Muestras vegetales infectadas con pudrición gris (*Botrytis cinerea*)



Fotografía N° 4: Visita del tutor de tesis, Ing. Fabián Troya, al sitio del ensayo.



ANEXO 2: MATERIALES DE LABORATORIO.

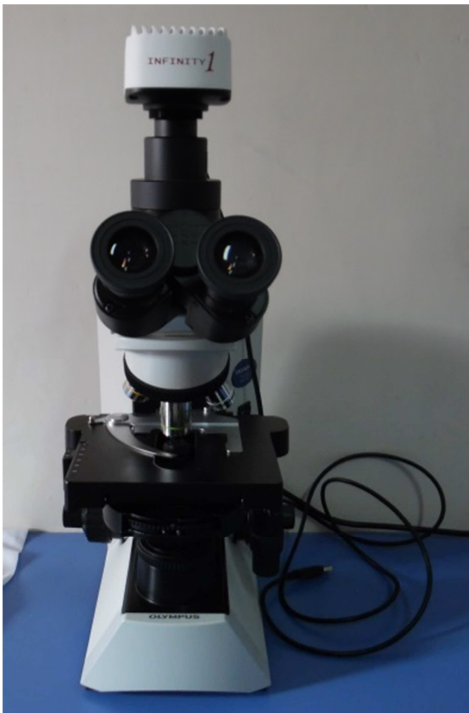
Fotografía N° 5: Destilador de Agua Waterwise 9000



Fotografía N° 6: Mecheros de Alcohol



Fotografía N° 7: Microscopio Olympus Trinocular CX31 con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x



Fotografía N° 8: Incubadora Memmert IN 110 programada a 22 °C



Fotografía N° 9: Autoclave Tuttnauer 2540 semiautomático, para esterilizar los materiales.



Fotografía N° 10: Refrigeradora Indurama, para conservar cada una de las muestras.



Fotografía N° 11: Cámara de flujo laminar Aura Mini, crea un ambiente estéril con lo que se puede realizar las inoculaciones impidiendo la contaminación.



Fotografía N° 12: Diversos insumos utilizados en el ensayo, agar, parafilm, dextrosa, levadura, asas de siembra, porta y cubre objetos, matraz Erlenmeyer, vasos de precipitación



ANEXO 3: COSTOS.

Materiales de aseo

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
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
Subtotal:			41,25 \$

Reactivos de limpieza

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
Desinfectante Kalipto	1	4,3	4,3
Alcohol	1	5,5	5,5
Yodo	1	3,6	3,6
Subtotal:			13,40 \$

Equipos

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
Refrigeradora Indurama R1-425	1	767,97	767,97
Incubadora IN110	1	2665,7	2665,7
Microscopio Trinocular CX31	1	2455,68	2455,68
Cámara de flujo laminar aura 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:			18861,48 \$

Materiales de laboratorio

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
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	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
Subtotal:			135,94 \$

Reactivos de laboratorio

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
Bacto agar	0,5	88	44
Agua	1	2	2
Levadura	1	2	2
Sacarosa	1	2	2
Ácido cítrico	1	2,5	2,5
Subtotal:			52,5 \$

Costo total

Subtotal 1	41,25 \$
Subtotal 2	13,40 \$
Subtotal 3	18861,48 \$
Subtotal 4	135,94 \$
Subtotal 5	52,5 \$
Subtotal	19104,57 \$
Imprevistos (10%)	1910,45 \$
Total	21015,03 \$

ANEXO 4: GUÍA DIDÁCTICA DE LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE ROSA (*Rosa sp.*)



www.uto.edu.ec

Universidad Técnica de Cotopaxi.

Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales.

Carrera de Ingeniería Agronómica

Autor:

Geovanny Patricio Quimbita Quimbita

ÍNDICE

Introducción

Fundamentación

Objetivo

Ubicación

Bloque I. Metodología

Bloque II. Resultados

Material de consulta sugerida

“Por la vinculación de la Universidad con el pueblo”

INTRODUCCIÓN:

Uno de los problemas primordiales en el ámbito de fitosanidad, es el ataque de botrytis o pudrición gris (*Botrytis cinerea*) lo cual repercute en una baja calidad de las flores cuando se presenta un ataque severo de dicha enfermedad, debido a que el cultivo de rosas se encuentran dentro de los invernaderos, es muy propenso a esta enfermedad, ya que es el ambiente ideal para este patógeno.

La presente guía dará las pautas necesarias para aislar al antes mencionado hongo fitopatógeno, y así identificar cada una de sus estructuras y el ciclo de vida del hongo, siendo de vital importancia esta información, para en un futuro dar otras alternativas de control de esta enfermedad.

FUNDAMENTACIÓN:

Todas las variedades de rosal provienen de unas pocas especies silvestres; como ejemplo, se tiene la *Rosa canina*, originaria de Turquía y del centro de Europa. Actualmente se cultivan en todas las regiones del mundo, especialmente en Europa, China, India y el continente americano (Aldana, 1995)

Es un arbusto perenne, raíz fusiforme o ramificada; tallo leñoso; las ramas se metamorfosean en espinas (Aldana, 1995)

La enfermedad fúngica que mayor daño causa es la pudrición gris (*Botrytis cinerea*)

Síntomas: Esta enfermedad se caracteriza por el desarrollo de manchas acuosas o necróticas seguido por una pudrición de los pétalos, de color grisáceo, con abundante desarrollo de un micelio gris sobre los tejidos parasitados. Se favorece con alta humedad ambiental y temperaturas frías. (LaTorre, 1988)

Diseminación: Conidias dispersas por el viento. (LaTorre, 1988)

Sobrevivencia: Sobrevive como esclerocios en residuos de tejidos enfermos. (LaTorre, 1988)

Control: Tratamiento químico con benomilo, captan, diclorán, iprodione, procimidione, vinclozolín. (LaTorre, 1988)

Las principales características morfológicas de *Botrytis cinerea* son:

- Micelio. El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos. A partir del micelio, generalmente envejecido, se originan diversas estructuras, como son los macroconidióforos, los microconidióforos y los esclerocios
- Conidióforos.- Los conidióforos se originan principalmente de la masa hifal, aunque también pueden hacerlo a partir de los esclerocios. Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias. Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de ésta, se disponen los conidios, los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal
- Conidios o Macroconidios.- Los conidios o macroconidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *Botrytis cinerea*. Son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo. Los conidios poseen una forma ovoide. (Espinosa, 2006)

OBJETIVO:

La presente guía didáctica de la Caracterización Morfológica de *Botrytis cinerea* en el cultivo de Rosa (*Rosa sp.*) tiene como finalidad, informar y facilitar el aprendizaje de este hongo fitopatógeno, sus microestructuras, y la técnica de cultivo adecuada en laboratorio.

UBICACIÓN:

Cuadro N°1: Ubicación del ensayo en laboratorio

Barrio:	Salache Bajo
Parroquia:	Eloy Alfaro
Cantón:	Latacunga
Provincia:	Cotopaxi
Coordenadas: UTM:	N: 9888.749,37. E: 764.660,386.
Altitud:	2790 msnm.

Elaborado por: El investigador

BLOQUE I: METODOLOGÍA.

Recolección de las muestras en campo y almacenamiento.

Para realizar esta labor, se buscó una muestra con un avanzado estado de incidencia de la enfermedad, para no tener problemas al momento de aislar al hongo que estamos identificando. Había que tener mucho cuidado, y verificar que no se haya fumigado con anterioridad algún fungicida. Las muestras se las obtuvo de un invernadero ubicado en la Parroquia de Aláquez. Su almacenamiento se lo realizó en un refrigerador a una temperatura de entre 6 a 8 °C.

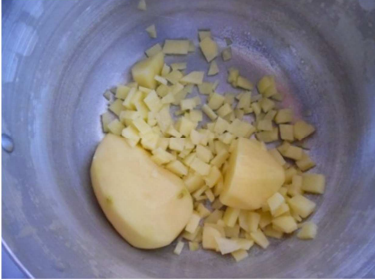





Fotografía N° 1: Muestras obtenidas en Campo de Pudrición Gris (*Botrytis cinerea*)



Fuente: El investigador

Preparación del medio de cultivo.

Cuadro N°2: Preparación del medio de Cultivo PDA

<p>Medir 500ml de agua, bajar el pH con ácido cítrico, y pesar 200g de papa pelada y picada en cuadros finos.</p> <p>Poner la papa y el agua en una olla, para cocinarlos durante 10 minutos.</p>		
<p>Luego pasamos por un colador la papa cocinada, y la solución la ponemos nuevamente en la olla a fuego lento, reponemos el agua que se evapora, hasta completar nuevamente los 500ml y finalmente añadimos 15g. de agar, 20g. de dextrosa o sacarosa y 2g. de levadura</p>		
<p>Trasvasar la solución obtenida a un Erlenmeyer, y tapanlo con papel aluminio, para luego someterlo a esterilización en el autoclave, durante 35 minutos</p>		

Luego de esterilizar el medio de cultivo, hay que colocar el PDA en las cajas Petri, y esperar 5 a 10 minutos, hasta que se gelatinice.

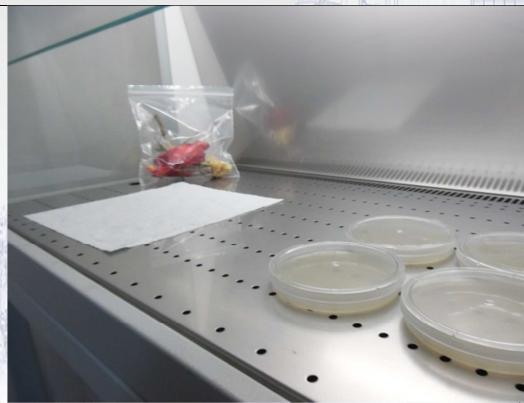


Elaborado por: El investigador

Aislamiento, purificación e identificación de *Botrytis cinerea*

Cuadro N°3: Aislamiento, purificación e identificación de *Botrytis cinerea*.

Aislamiento: Las cajas Petri con el medio de cultivo fueron trasladadas a la cámara de flujo laminar, en donde, con la ayuda de pinzas y un bisturí, se cortaron pedazos pequeños de pétalos de Rosa (*Rosa sp.*) que estaban enfermos, para luego colocarlos dentro de las cajas petri con PDA. Luego se los colocó en la Incubadora a 22°C

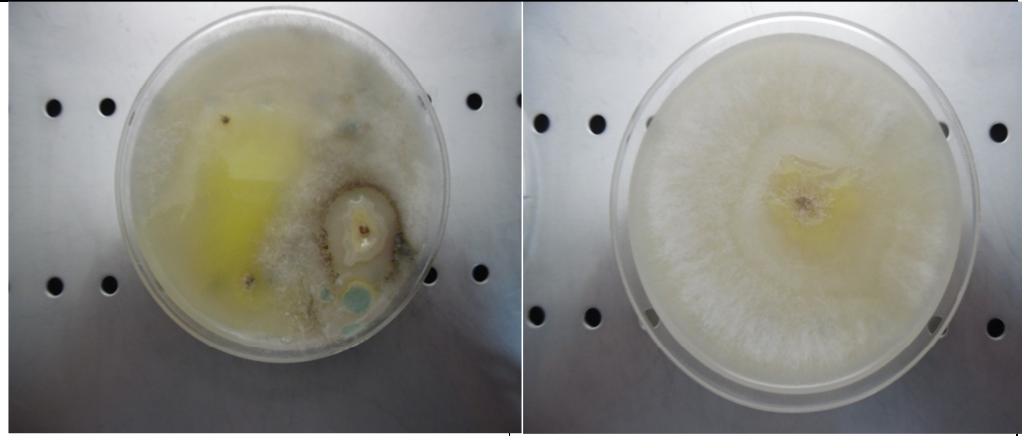


Muestras de pétalos infectados con
Botrytis cinerea



Incubadora a 22°C

Purificación e inoculación: Se realizó al aislamiento utilizando porciones de micelio de las cajas Petri, esto se logró con la ayuda de materiales específicos de laboratorio como por ejemplo las azas de siembra, además, hay que buscar la caja petri menos contaminada para realizar la purificación e inoculación.



Caja Petri contaminada con bacterias

Caja Petri poco contaminada, que servirá para la purificación de *Botrytis cinerea*.

Incubación: Para la incubación la caja Petri se colocó en la incubadora a 22 °C y 70% de humedad relativa, durante 7 días aproximadamente según tengamos el desarrollo de los micelios del hongo.



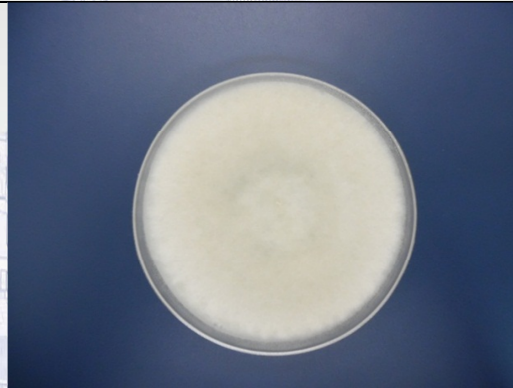
Incubadora a 22°C con las muestras Purificadas y Aisladas.

Identificación: Se procedió a realizar un dobléz de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostuvo con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después colocamos una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procedió a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego observar en el microscopio con un aumento de 20x y 100x de acuerdo a como se observe de mejor manera las microestructuras fúngicas.



Muestras de *Botrytis cinerea* para observar en el microscopio

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



Caja Petri con *Botrytis cinerea* sin contaminación.

Elaborado por: El investigador

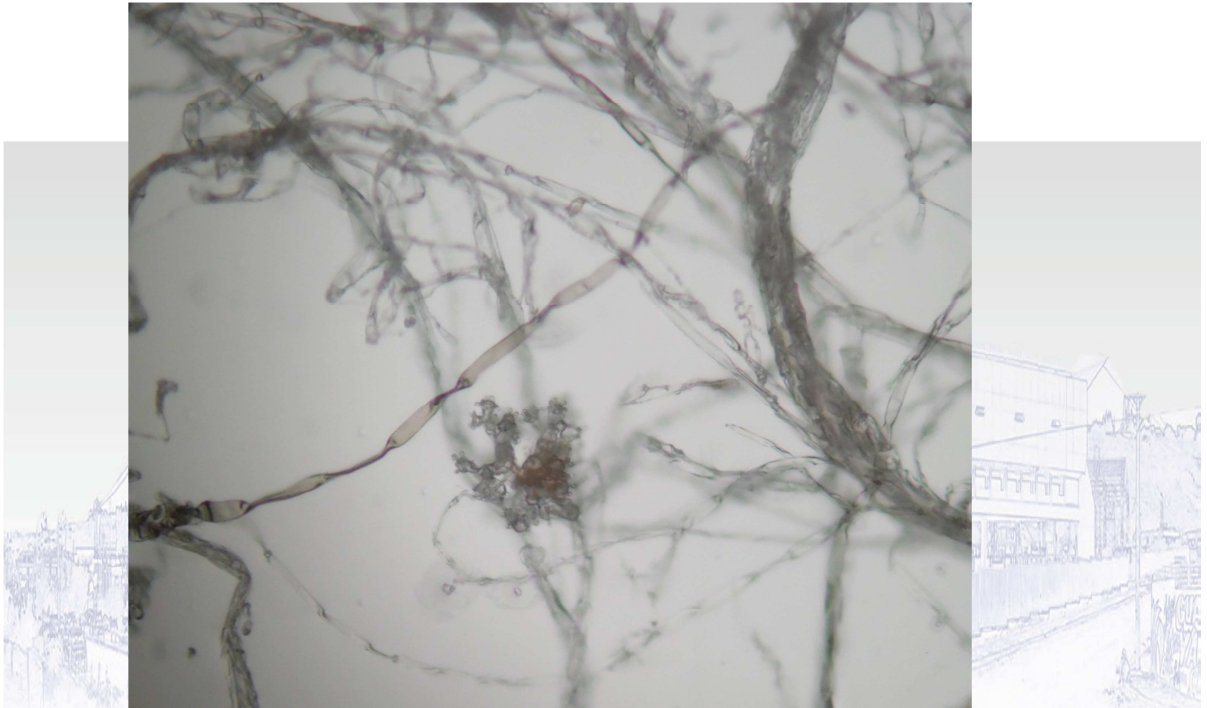
BLOQUE II

RESULTADOS.

Talo

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x en campo claro y regulando la intensidad de la luz del microscopio a 4,5 unidades.

Imagen N°1: Talo miceliar de *Botrytis cinerea* 200x



Fuente: El investigador

Talo miceliar se presenta en los Ascomicetes, el micelio posee septos que se forman por invaginación de la pared celular hasta dejar un poro en el centro. (Agrios, 1999)

En la imagen N°1 se puede observar el tipo de talo miceliar. Este tipo de talo es característico de los Ascomicetes, debido a sus hifas septadas. Se ratifica lo mencionado por (Agrios, 1999)

Micelio

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x en campo claro. Regulando la intensidad de la luz del microscopio a 4 unidades.

Imagen N° 2: Micelio tabicado de *Botrytis cinerea* 200x



A.- Hifa; B.- Septo, tabicación o división de la hifa.

Fuente: El investigador.

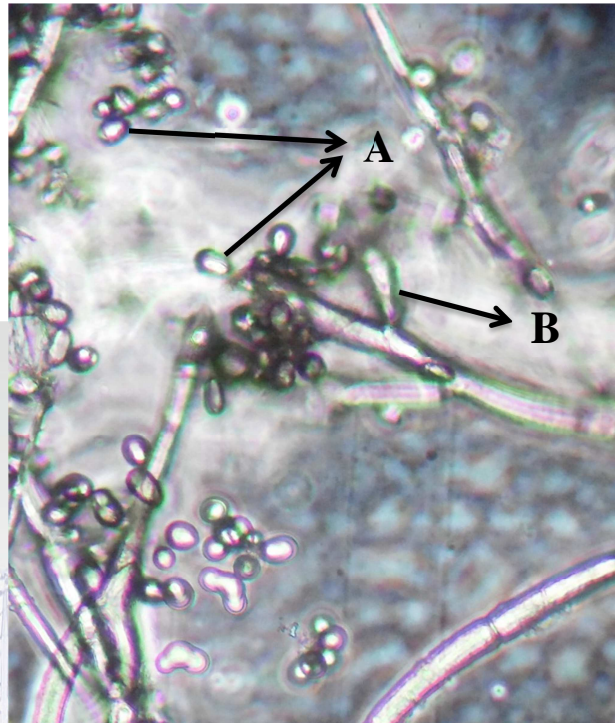
Cuando las hifas no presentan septos o divisiones, el micelio es denominado cenocítico o no tabicado y cuando las presentan el micelio se dice que es tabicado. (Agrios, 1995).

Como se puede aprecia en la imagen N° 2, tenemos un tipo de micelio tabicado gracias a que las hifas poseen septos o divisiones, concordando con lo que menciona (Agrios, 1995)

Esporas

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x, en campo claro, y regulando la intensidad de luz del microscopio a 5 unidades.

Imagen N° 3: Conidios asexuales de *Botrytis cinerea* 200x



A.- Conidio asexual; B.- Conidióforo

Fuente: El investigador

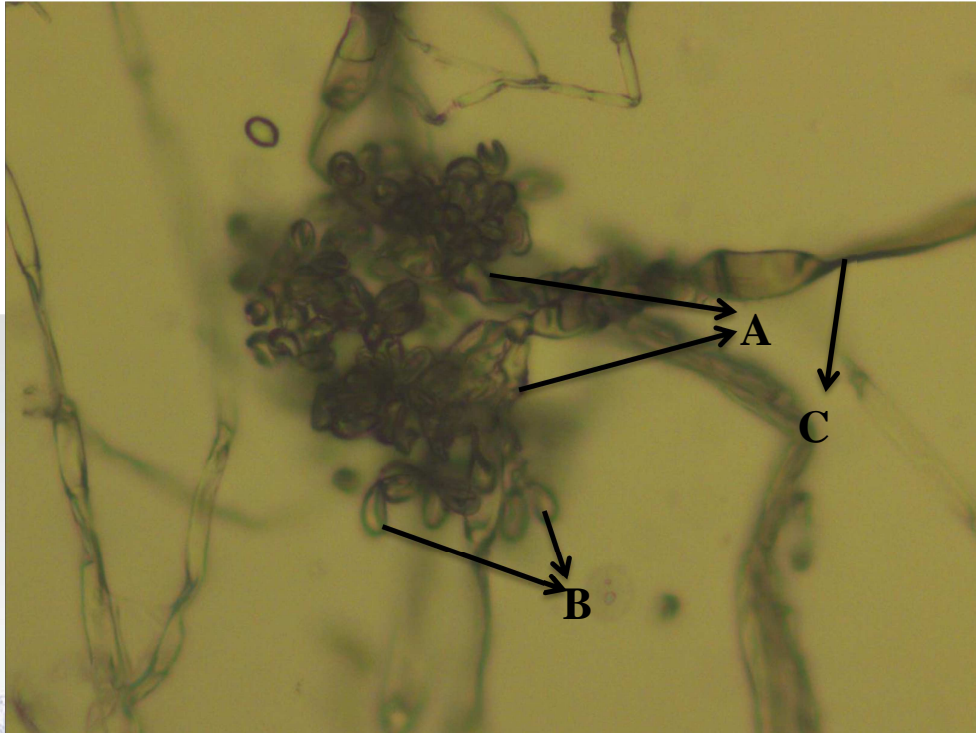
Los conidios constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *Botrytis cinerea*. (Mohsin, 1990)

En la imagen N° 4 se puede observar a los conidios que son la principal estructura de dispersión del hongo, y poseen una forma ovalada, y de acuerdo a lo mencionado por (Mohsin, 1990)

Conidióforo

Se utilizó un Microscopio Olympus Trinocular CX31 que posee cuatro objetivos con aumentos de 5x, 10x, 20x, 100x. Se utilizó el objetivo 20x, en campo claro, y regulando la intensidad de luz del microscopio a 4 unidades.

Imagen N° 4: Conidióforo de *Botrytis cinerea* 200x.



A.- Conidióforo de *B. cinerea*. B.- Conidios. C.- Hifa.

Fuente: El investigador.

El conidióforo es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Se localizan en el extremo de las hifas las cuales levantan los conidióforos en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia. (González, 1989).

En la imagen N° 4 se observa el conidióforo de *Botrytis cinerea*, se ratifica lo mencionado por (González, 1989), es decir, se forma primero el conidióforo para que esta estructura sirva de base y sostén para los conidios que son las encargadas de propagar al hongo fitopatógeno.

Material de Consulta Sugerida.

Agrios, G. (1995). Fitopatología. México: Uyhea.

Agrios, G. (1999). Fitopatologia 2 ed. Mexico: LIMUSA.

Aldana, H. (1995). Producción Agropecuaria 2. En Producción Agropecuaria 2.
Bogotá, Colombia: Terranova.

Espinosa, M. (2006). Estudio de la Variabilidad Genética y Organización
Cromosómica del Hongo Fitopatógeno Botrytis cinerea. Puerto Real.

González, L. (1989). Introducción a la Fitopatología.

LaTorre, B. (1988). Enfermedades de las Plantas Cultivadas. Chile: Casilla 114-
D.

Mohsin, G. (1990). Le cycle sexue in vitro de Botryotinia fuckeliana (DeBary)
forme parfaite de Botrytis cinerea (Pers.): Dèterminisme; optimisation
des conditions d'obtention. Tesis doctoral. Universidad de Lille.

