

# “UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI”



## UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

### CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

#### TESIS DE GRADO

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS  
FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.)  
SECTOR LOS LAURELES, CANTÓN LA MANA, COTOPAXI 2015.”**

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

#### **AUTOR:**

Wilson Eduardo Pacheco Orellana

#### **DIRECTORA:**

Ing. Mg. Guadalupe López

#### **ASESOR TÉCNICO:**

Ing. Santiago Jiménez

**Latacunga-Cotopaxi**

**2015**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA**

Yo, **PACHECO ORELLANA WILSON EDUARDO**, con cédula de ciudadanía N° 171701321-1, libre y voluntariamente declaro que la tesis titulada: **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SECTOR LOS LAURELES, CANTÓN LA MANA, COTOPAXI 2015.”**, es original, auténtica y personal. En virtud, declaro que el contenido será de mi sola responsabilidad legal y académica.

---

Wilson Eduardo Pacheco Orellana

C.I. 1717013211

## **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 CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SECTOR LOS LAURELES, CANTÓN LA MANA, COTOPAXI 2015.”**, debo confirmar que el presente trabajo de investigación fue desarrollado de acuerdo con los planteamientos requeridos.

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

---

Ing. Mg. Guadalupe López

**DIRECTORA**

## **AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL**

En calidad de miembros de Tribunal de la Tesis Titulada: **“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L.) SECTOR LOS LAURELES, CANTÓN LA MANA, COTOPAXI 2015.”**, de autoría del egresado Wilson Eduardo Pacheco Orellana, CERTIFICAMOS que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones al presente documento.

Ing. Mg. Guadalupe López.

**DIRECTORA DE TESIS**

---

Ing. Agr. Santiago Jiménez.

**PRESIDENTE**

---

Ing. Adolfo Cevallos. MSc

**MIEMBRO DEL TRIBUNAL**

---

Ing. Mg. Karina Marín.

**OPOSITORA**

---

## **DEDICATORIA**

A mis padres Eduardo e Isabel por ser pilares fundamentales en mi vida, por creer siempre en mí, por enseñarme siempre a levantarme cuando he caído y brindarme todo el apoyo para culminar esta meta tan deseada.

A mis hermanas, Maribel por ser un claro ejemplo de superación y Jaqueline por estar en los buenos y malos momentos que he vivido.

**WILSON**

## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer a mi directora de tesis Ingeniera Mg. Guadalupe López, por brindarme la oportunidad de llevar a cabo esta investigación, y por su gran paciencia que tuvo para que este trabajo llegara a su finalización.

Al Ingeniero Santiago Jiménez presidente de mi tribunal, por su tiempo y conocimientos aportados para el presente trabajo ya que sin sus valiosas contribuciones y por el tiempo que dedico a la revisión de esta investigación no hubiese llegado a su culminación

A mis tíos Juan Calle y Mariana Orellana por darme acogida en su hogar todo el tiempo en que realice mis pasantías.

A mi familia y amigos que me brindaron su apoyo directa o indirectamente.

A la Universidad Técnica De Cotopaxi por darme la oportunidad de realizar mis estudios, y a todos los docentes que conocí en todo ese tiempo.

**WILSON**

# ÍNDICE

DECLARACIÓN DE AUTORÍA .....	i
AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
RESUMEN.....	x
SUMMARY .....	xi
INTRODUCCIÓN .....	1
JUSTIFICACIÓN.....	4
OBJETIVOS.....	5
PREGUNTA DIRECTRIZ.....	6
CAPITULO I.....	7
1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	7
1.1. El cultivo de café .....	7
1.1.1. Origen .....	7
1.2. Clasificación taxonómica .....	8
1.3. Enfermedades en el cultivo del café.....	8
1.4. Hongos fitopatógenos.....	15
1.5. Estructuras reproductivas .....	19
CAPITULO II.....	20
2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	20
2.1. Materiales y recursos.....	20

2.1.1.	<i>Institucionales</i> .....	20
2.1.2.	<i>Recursos humanos</i> .....	20
2.1.3.	<i>Material de oficina</i> .....	21
2.1.4.	<i>Material experimental</i> .....	21
2.1.5.	<i>Materiales de laboratorio</i> .....	21
2.2.	Diseño metodológico .....	23
2.2.1.	<i>Investigación descriptiva</i> .....	24
2.3.	Método.....	24
2.3.1.	<i>Métodos lógicos</i> .....	24
2.3.2.	<i>Técnica</i> .....	25
2.4.	Delimitación del lugar de recolección.....	25
2.4.1.	<i>Ubicación política</i> .....	26
2.4.2.	<i>Ubicación geográfica</i> .....	26
2.5.	Delimitación del laboratorio.....	26
2.5.1.	<i>Ubicación política</i> .....	27
2.5.2.	<i>Ubicación geográfica</i> .....	27
2.7.	Diagnóstico del cultivo.....	27
2.7.1.	<i>Toma de muestras</i> .....	28
2.7.2.	<i>Procedimientos en la toma de muestras</i> .....	28
2.8.	En laboratorio .....	28
2.8.1.	<i>Aislamiento</i> .....	28
2.8.2.	<i>Purificación</i> .....	29
2.8.3.	<i>Incubación</i> .....	29
2.8.4.	<i>Caracterización morfológica</i> .....	30
2.8.5.	<i>Descripción</i> .....	30
CAPITULO III .....		32
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32

3.1. Determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en cultivo de Café ( <i>Coffea arabica</i> L.).	32
3.2. Signos y síntomas del Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> ) en el cultivo de Café ( <i>Coffea arabica</i> L.).	32
3.3. Caracterización de macro y micro estructuras de Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> ).	33
3.3.1. Macro estructura.	34
3.3.2. Microestructuras	35
3.4. Descripción del ciclo de vida del hongo Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> ) en condiciones de laboratorio.	38
3.4.1. Reproducción sexual de Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> ).	38
3.4.2. Reproducción asexual de Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> ).	38
3.5. Elaboración de una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> )	42
CONCLUSIONES:	43
RECOMENDACIONES:	44
GLOSARIO	45
BIBLIOGRAFÍA	48
ANEXOS	51

## ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Superficie cafetalera del Ecuador Y área en producción efectiva, 2012 .....	2
TABLA 2. Clasificación taxonómica del café .....	8
TABLA 3. Clasificación taxonómica de Ojo de gallo del cafeto.....	10
TABLA 4. Condiciones edafoclimáticos .....	26
TABLA 5. Caracterización de macro y microestructuras del patógeno .....	33
TABLA 6. Ciclo de vida de <i>Mycena citricolor</i> en condiciones de laboratorio. ...	41

## ÍNDICE DE IMÁGENES

IMAGEN 1. Ojo de gallo ( <i>Mycena citricolor</i> ).....	33
IMAGEN 2. Desarrollo del hongo en medio de cultivo PDA .....	34
IMAGEN 3. Micro estructuras de <i>Mycena citricolor</i> .....	35
IMAGEN 4. Hifa de <i>Mycena citricolor</i> .....	36
IMAGEN 5. Final del ciclo de vida de <i>Mycena citricolor</i> .....	37
IMAGEN 6. Estructura de <i>Mycena citricolor</i> en su reproducción asexual .....	37

## RESUMEN

La presente investigación se realizó en el sector Los Laureles, con coordenadas: latitud: 07° 06' 198''S, longitud: 98° 89'232''W, y a una altitud de 586 msnm; en el cantón La Mana, provincia de Cotopaxi, ya que la principal causa para la presencia de hongos fitopatógenos es por falta de tecnificación del cultivo de café. Se pudo determinar que el hongo que afecta de gran manera a la producción del cafeto es el Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) la misma que se presenta en el has tanto en hojas jóvenes o viejas y en el fruto, el hongo se presenta en lesiones redondas de coloración gris o marrón; los daños que puede provocar son la defoliación, la muerte prematura de brotes, también ocasiona la caída de frutos en diferentes etapas de desarrollo, todo estos daños provoca una disminución de la producción.

Con los antecedentes antes presentados se caracterizó el hongo fitopatógeno *Mycena citricolor* en condiciones de laboratorio el mismo que se encuentra en la ciudad de Latacunga, con coordenadas: latitud: 0°55'44.8"S, longitud: 78° 37.24.2''W, y a una altitud: 2850 msnm. La inoculación se realizó en un medio de cultivo PDA, y los que fueron incubados a una temperatura de 23,5 °C por el lapso de 15 días, también se logró determinar sus macro y micro estructuras. Se identificó que las macro estructura del hongo presentaba un micelio ramificado, con una textura era algodonosa y con una coloración blanquecina, mientras que las micro estructuras presentaron hifas hialinas septadas de forma irregular y su longitud promedio era de 51,68 µm, y en el interior de las mismas presentaron formas de burbujas de aire y la longitud promedio de las esporas es de 5,54 µm, las mismas que tienen forma elipsoidal, y el radio de la colemla oscila los 37,62 µm; estas estructuras se pudieron observar con la ayuda de un microscopio trinocular OLYMPUS CX31 adaptado con una cámara INFINTY 1-2CB, con un lentes de 4x, 10, 20x y 100x de esta manera se pudo comparar bibliográficamente.

## SUMMARY

The present research was made in the Los Laureles sector, with coordinates: latitude: 07° 06' 198" S, longitude: 98° 89' 232" W, and at an altitude of 586 msnm; in the La Maná canton, Cotopaxi province. Since, the main cause for the phytopathogenic fungi presence is by technification lack of the crop coffee. It could determine that the fungus impacts greatly to the coffee production that is the Ojo de gallo (*Mycena citricolor*). The same one that is presented in the beam in both young and old leaves and fruit. The fungus is presented in injuries round gray or brown coloration, which can cause damage are defoliation, premature death of buds. Also, it causes the fruit drop at different development stages. All, these damages induces a decrease in production.

With the background before mentioned, they were characterized the *phytopatogenic fungus Mycena citricolor* in laboratory conditions is the same, found in the Latacunga city, with coordinates: latitude: 0° 55' 44.8"S, longitude: 78° 37.24.2" W, and to an altitude: 2850 mnsnm. The inoculation was made in a PDA crop medium, which were incubated at a temperature of 23.5° C, for a period of 15 days. Also, it is reach to determine its macro and microstructures. It is identified that the macro structure of the fungus has a branched mycelium, with a texture cottony and with a whitish, whereas the micro structures presented hyaline hyphae were septate irregularly and its average length was 51.68 µm, and in inside thereof, they presented forms of air bubbles and the average length of the spores is 4.59 µm, the same that has ellipsoidal shape, and the radius of the colemula ranges the 21.59 µm; these structures could be looked with the help of a trinocular microscope OLYMPUS CX31 adapted with a camera INFINTY 1-2CB, with an increase of 4x, 10, 20x and 100x in that way, this could compare bibliographic.

## INTRODUCCIÓN

Considerando que en Ecuador existen cafetales abandonados y otras áreas de cafetales en crecimiento, se estima que solo el 75% de la superficie total corresponde a cafetales en producción efectivamente cosechados. Al analizar la distribución de la superficie cafetalera por provincias se destaca que Manabí, Loja, Orellana y Sucumbíos tienen las mayores áreas cafetaleras. (COFENAC, 2013)

La superficie cafetalera del Ecuador, estimada por COFENAC, en diciembre del 2012, es de 199 215 hectáreas, de las cuales 136 385 hectáreas corresponden a cafetales arábigos y 62 830 hectáreas a café robusta, que las áreas de cosecha fueron de 149,411 hectáreas, las mismas que se están distribuidas en 105 000 UPA's; la producción nacional cafetalera es de 650 000 sacos de 60 kilos los cuales el 62% son café arábigo y el 38% de café robusta. El consumo interno de café son de 150 000 sacos de 60 kilos mientras que la producción exportable es de 400 000 sacos de 60 kilos. Las provincias con mayor número de hectáreas cultivadas son: Manabí con 70 050 ha, Loja con 29 345 ha y la provincia de El Oro con 9 730, mientras que la provincia de Cotopaxi tiene 1 000 ha. (COFENAC, 2013)

Para el 2011 la producción total de café en el Ecuador fue de 23 829 toneladas métricas (Tm.) y las ventas fueron de 20 191 Tm. Las hectáreas plantadas fueron de 110 474 y las cosechadas es de 98 347. Estas cifras revelan que ha habido una disminución en la producción y ventas del producto en comparación con anteriores, donde se puede ver que en el 2009 fue el año de mayor producción de los últimos 4 años con 33 624 Toneladas métricas de producción. (COFENAC, 2013)

**TABLA 1.** Superficie cafetalera del Ecuador y área en producción efectiva, 2012

Provincia	Café arábico	
	Superficie total	Área en Producción
Manabí	70.050	52.538
Loja	29.345	22.009
El Oro	9.730	7.298
Guayas	6.355	4.766
Zamora Chinchipe	6.350	4.763
Los Ríos	3.520	2.640
Bolívar	3.410	2.558
Santa Elena	1.800	1.350
Galápagos	1.100	825
Cotopaxi	1.000	750
Esmeraldas	900	675
Pichincha	850	638
Chimborazo	650	488
Imbabura	300	225
Morona Santiago	290	218
Cañar	270	203
Azuay	230	173
Carchi	195	146
Pastaza	40	30
<b>TOTAL (Hectáreas)</b>	<b>136.385</b>	<b>102.289</b>

Fuente: Elaboración propia basada en (COFENAC, 2013)

Entre los problemas fundamentales de este cultivo se encuentra el rendimiento, estimado entre 5 a 6 qq/ha al año, considerado uno de los más bajos comparado con otros países productores, debiéndose en gran parte al envejecimiento de las plantaciones en un buen porcentaje de la superficie cultivada, la falta de capacitación y transferencia de tecnología, la no disponibilidad de créditos, la ausencia de organización y fortalecimiento gremial, entre otros factores. En alrededor del 90%, la superficie de este cultivo es manejada bajo el sistema tradicional. (COFENAC, 2013)

Los hongos más característicos del cultivo de café son: Mal del talluelo (*Rhizoctonia solani*), Roya anaranjada (*Hemileia vastatrix*), Mal de hilachas (*Corticium koleroga*), Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) Mancha de hierro (*Cercospora coffeicola*), Mal de machete (*Ceratocystis fimbriata*), Muerte descendente (*Phoma sp.*) y Viruela del cafeto (*Colletotrichum gloeosporioides*). (INIAP, 1993)

Los efectos que puede tener el Ojo de gallo, causado por el patógeno *Mycena citricolor*, sobre la condición de las plantas y el rendimiento productivo del café; pueden ser muy devastadores para el caficultor que convive con esta enfermedad en zonas de clima favorable al patógeno. Bajo condiciones climáticas favorables y sin un manejo apropiado de la enfermedad, puede ocurrir la pérdida de un 60% de la cosecha presente y una reducción del 100% en el potencial productivo del café en el siguiente ciclo de producción, esto debido al gran agotamiento que sufren las plantas por la caída masiva de hojas atacadas por *M. citricolor* (BARQUERO, 2012)

Por la limitada información sobre la prevención y control de hongos fitopatógenos y por ende pérdidas en las cosechas provocadas por el ataque de enfermedades causan problemas a los agricultores del sector de Los Laureles, 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

El motivo de esta investigación se basa en que la actividad cafetalera en nuestro país viene enfrentando una gran cantidad de problemas técnicos en el cultivo lo cual han provocado pérdidas en la competitividad de nuestro café en el mercado internacional y un deterioro de la estructura socioeconómica de los productores del grano.

Esta investigación es muy importante ya que la caficultura ha representado para el país una fuente de empleo para aproximadamente un millón de personas, y por causa de la alta incidencia de problemas fitosanitarios (Roya anaranjada, Ojo de gallo, Broca del fruto, Mal de hilachas, Viruela y otros patógenos), en el cultivo la productividad de los cafetales son muy bajos.

La presencia de hongos fitopatógenos en el sector “Los Laureles” impide una mayor productividad motivo por el cual se propone la presente investigación “Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), es necesario establecer una base de información que servirá al agricultor para tomar decisiones oportunas y tener una guía para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos que permita reducir los costos e incrementar la producción y así aumentar sus ingresos económicos.

Los resultados de la investigación también servirán como una guía didáctica para los agricultores del Sector Los Laureles.

# OBJETIVOS

## OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto en la producción en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.) sector Los Laureles, cantón La Mana, Cotopaxi 2015.

## OBJETIVO ESPECÍFICOS

- Determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo de café (*Coffea arabica* L.).
- Identificar signos y síntomas del hongo fitopatógeno del café (*Coffea arabica* L.) en campo.
- Caracterizar macro y microestructuras del patógeno.
- Describir el ciclo de vida del patógeno en condiciones de laboratorio.
- Elaborar una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo en estudio.

## **PREGUNTA DIRECTRIZ**

- ¿Se podrá caracterizar morfológicamente macro, micro estructuras y ciclo de vida del hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en condiciones de laboratorio?

# CAPITULO I

## 1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 1.1. El cultivo de café

#### *1.1.1. Origen*

El café arábico se originó en las tierras altas de más 1 000 msnm de Etiopía y Sudán, África. En los años 575 y 890, los persas y los árabes lo llevaron a Arabia y Yemen, en tanto que los nativos africanos lo extendieron a Mazambique y Madagascar. De aquí los holandeses y los portugueses, entre los años 1 600 y 1 700, lo trasladaron a Ceylán, posteriormente a Java y a la India, así como otras regiones de Asia y África. ( ALVARADO & ROJAS, 2007)

En 1 727 fue trasladado de Sumatra a Brasil, luego pasó a Perú y Paraguay y, en 1 825, a Hawái. Por otra parte, en el invernadero de París se multiplicaron las plantas y pasaron a la Guayana Francesa, África Ecuatorial, Haití y Santo Domingo. Luego se extendió a Puerto Rico, a El Salvador en 1 740; a Guatemala en 1 750; a Bolivia, Ecuador y Panamá en 1 784; por último, a Costa Rica, procedente de Cuba y Guatemala, entre 1 796 y 1 798. ( ALVARADO & ROJAS, 2007)

El café constituye uno de los productos más importantes de la exportación ecuatoriana y de la economía mundial, se cotiza en las bolsas de valores de Londres (Robusta) y Nueva York (Arábica). Ecuador posee una gran capacidad como productor de café, convirtiéndose en uno de los pocos países en el mundo

que exporta todas los tipos de café: arábigo lavado, arábigo natural y robusta. (PRO ECUADOR, 2013)

## 1.2. Clasificación taxonómica

TABLA 2. Clasificación taxonómica del café

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Dicotynlenoeae
<b>Subclase:</b>	Asteriadae
<b>Orden:</b>	Rubiales
<b>Familia:</b>	Rubiaceae
<b>Género:</b>	<i>Coffea</i>
<b>Especie:</b>	<i>arabica, canephora, liberica.</i>
<b>Nombre binomial:</b>	<i>Coffea arabica</i> . L
<b>Nombre común:</b>	Café

Fuente: Elaboración propia basada en (RUIZ, 1989)

## 1.3. Enfermedades en el cultivo del café.

RUIZ, (1989) afirma: Las enfermedades del cafeto son más importantes que las plagas, causando serias pérdidas en algunos años, especialmente en aquellos lluviosos, cuando hacen inviernos muy “crudos”; favoreciendo la dispersión y ataque de los diferentes hongos fitopatógenos.

### 1.3.1. Mal del talluelo (*Rhizoctonia solani*)

**Sinónimos:** Damping off, Volcamiento, Mal del tallito, Sancocho, Mal de almácigo, Rhizocloniosis.

El principal síntoma es la presencia de un estrangulamiento a nivel del cuello de la plantita afectada, debido a la pudrición de la corteza provocada por el desarrollo del micelio del hongo en el interior de los tejidos. La zona necrótica hundida es de color oscuro y aspecto rugoso en la base del tallito, que se extiende rápidamente hasta cubrirlo completamente. Por la intensidad del ataque, ocurre una paralización de la circulación de la savia elaborada, dando lugar al marchitamiento y volcamiento de la plantita enferma. (INIAP, 1993)

### ***1.3.2. Mal de hilachas (Pellicularia koleroga)***

**Sinónimos:** Arañuela, Koleroga, Hebra viva, Mustia hilachosa, Infierno.

Los primeros estados de desarrollo del hongo, el micelio es blanquecino, oscureciéndose con el transcurso del tiempo hasta llegar a ser casi negro. De esta manera, permanece dentro de la corteza de las ramas de una época lluviosa a otra. (INIAP, 1993)

### ***1.3.3. Ojo de gallo (Mycena citricolor)***

- **Sinónimos:** Gotera, Argeño, Mancha de la hoja, Mancha americana, Maja viruela.

La enfermedad es muy frecuente en cafetales poco tecnificados, con sombra excesiva, bajo condiciones de alta humedad y en temperaturas comprendidas entre los 19 y 23 °C. Ataca principalmente a las hojas como también a ramas, tallos y frutos del cafetero. (INIAP, 1993)

**TABLA 3.** Clasificación taxonómica de Ojo de gallo del cafeto

Reino:	Fungi
División:	Basidiomycota
Clase:	Agaricomycetes
Orden:	Agaricales
Familia:	Mycenaceae
Género:	<i>Mycena</i> ,
Especie:	citricolor,

**Fuente:** Elaboración propia basado en (BAYER, 2015)

- ***Sintomatología.***

Los primeros síntomas de la enfermedad se presentan en forma de pequeñas manchas circulares o ligeramente ovaladas, distribuidas irregularmente en todas las hojas afectadas. Al inicio, las lesiones son de color pardo y luego en un estado más avanzado de su desarrollo se tornan gris ceniza, llegando a alcanzar hasta 15-18 mm de diámetro. (INIAP, 1993)

En determinadas condiciones, el tejido afectado puede desprenderse, dejando en las hojas perforaciones o agujeros. Esta es una característica que diferencia al Ojo de gallo de otras enfermedades del cafeto. Cabe anotar que cuando el ataque de la enfermedad se produce sobre la vena central cerca del peciolo, la enfermedad puede provocar también la caída prematura de las hojas. (INIAP, 1993)

El Ojo de gallo puede afectar también a los frutos en todos los estados de su desarrollo. Sobre la corteza de las cerezas se puede observar la presencia de lesiones hundidas y de diferentes tamaños. Con el transcurso del tiempo, los frutos afectados se vuelven amarillos, tornándose pardos al final del ataque. (INIAP, 1993)

- *Ciclo de la enfermedad*

Para que ocurra la enfermedad se requiere de condiciones con alta humedad relativa 80 a 95%, precipitaciones superiores a 15 mm, sombra densa y altas densidades de siembra. El patógeno necesita de 18 a 25 horas de alta humedad, bajo luz difusa, para comenzar a producir nuevas infecciones, pero, el período de formación de nuevas gemas lleva aproximadamente 8 días. Cuando las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de la enfermedad, se observa el daño en las plantas y aparecen los síntomas característicos de la enfermedad (WANG, 1994)

Esto se lleva a cabo en las etapas que pueden resumirse de la siguiente manera:

- **Etapas de sobrevivencia del hongo.** Durante noviembre a marzo en algunos casos abril, que corresponde a la época seca, el hongo sobrevive en lesiones características de la enfermedad en las plantas de café que fueron dañadas el año anterior. Ese es el inóculo más importante y se debe manejar para evitar que se convierta en epidemia. Así mismo el hongo puede sobrevivir en malezas que crecen en los cafetales, árboles de sombra o helechos que se encuentran en el campo. El número de lesiones que puede encontrarse por hoja o material enfermo de café o planta hospedera es variable (OROSZCO & CALDERÓN, 2010).
- **Etapas de gemación del hongo.** Al inicio de las lluvias en abril a mayo, en lesiones causadas por el hongo es donde ocurre la gemación. En las lesiones, se observa varios cuerpos fructíferos, en promedio 20 por lesión. Las gemas del hongo se desprenden fácilmente y caen en tejido sano, se pueden dispersar debido al salpique de agua de lluvia y el viento. Cada gema producida tiene la potencialidad de infectar y producir más lesiones con cuerpos fructíferos que pueden infectar nuevas hojas. La presencia de

una película de agua y temperatura alrededor de 20°C es importante para que esto ocurra. Cuando estas gemas se depositan en hojas de cafetos o tallos jóvenes; en pocas horas, inicia la germinación de las gemas con la emisión de hifa del hongo sobre el tejido de la planta de café y ocurre la infección (OROSZCO & CALDERÓN, 2010).

- **Fructificación de nuevas lesiones o inóculo secundario.** Esta fase se debe principalmente al desarrollo de la enfermedad cuando las lluvias se intensifican ocurre el apareamiento de nuevas lesiones de color marrón de diferente formato, producto de la producción de las gemas iniciales producidas por el hongo. Se trata de lesiones secundarias que producen más inóculo en el área foliar. La dispersión de las gemas y las infecciones en la planta afectada continúan. Durante esta etapa se puede observar la defoliación de los cafetos. Cuando ocurre defoliación severa el ataque del hongo puede continuar en frutos y tallos jóvenes (OROSZCO & CALDERÓN, 2010).
- **Final del ciclo de la enfermedad e inóculo residual.** Al final de la época lluviosa, la humedad disminuye, la temperatura se incrementa, hay mayor ventilación y menos horas de mojado foliar. Este ambiente es adverso al desarrollo del hongo y por lo tanto se paraliza la producción de gemas asexuales en las lesiones. En plantaciones de café con altitudes arriba de 1600 m y con alta humedad, el hongo continúa produciendo gemas con el rocío del amanecer en diciembre, enero y febrero. Sin embargo, la incidencia y severidad de la enfermedad disminuye. Todas aquellas lesiones en las hojas de color marrón, se tornan de gris ceniciento o blanquecino en la planta de café y esto constituye el inóculo residual que dará origen a la enfermedad el próximo año (OROSZCO & CALDERÓN, 2010).

Para reducir la incidencia del Ojo de gallo, es conveniente efectuar un cambio en el sistema tradicional de manejo actual del cultivo. Se aconseja el empleo de árboles de sombra que ofrezcan un fácil manejo, que permitan una adecuada luminosidad en la plantación. Por consiguiente, se propiciaría una mejor ventilación al efectuarse la poda de los cafetos, proporcionando condiciones desfavorables para el desarrollo de la enfermedad. (INIAP, 1993)

Según el INIAP, (1993) dice que es importante también mantener el cafetal libre de malezas que puedan ser hospederas alternas de la enfermedad y fertilizar los arbustos en la dosis y épocas recomendadas.

#### ***1.3.4. Mancha de hierro (Cercospora coffeicola)***

**Sinónimos:** Cercospora, Chasparria, Cercosporosis.

Las hojas afectadas por la enfermedad presentan manchas circulares de color marrón rojizo o pardo, con anillos concéntricos. Estas se van tornando grises o blanquecinas hacia el centro, a medida que va envejeciendo la lesión. Las manchas presentan un halo clorótico o amarillento que contrasta con el tejido normal de la hoja. (INIAP, 1993)

#### ***1.3.5. Muerte descendente (Phoma sp.)***

**Sinónimo:** Foma, Requemo, Quema, Derrite.

La muerte descendente causa la defoliación de las platas, reduciendo la capacidad productiva de los cafetos. En la hoja aparecen manchas irregulares de color café oscuro, localizadas al margen o en las puntas. Estas manchas marginales hacen que las hojas presenten un encrespamiento hacia el lado de la lesión. (INIAP, 1993)

### ***1.3.6. Viruela o Antracnosis (Colletotrichum gloeosporioides)***

Bajo condiciones de campo se pueden observar manchas necróticas en las hojas características de los síntomas de antracnosis. Posteriormente, las lesiones se tornan color verde oliva de un diámetro aproximado de 1 mm, las que al ser colocadas contra la luz aparecen un tanto oscuras, denominándose a este síntoma "mancha mantecosa". En estados avanzados de la enfermedad, estas lesiones coalescen cubriendo una mayor área de la superficie de la hoja. (INIAP, 1993)

### ***1.3.7. Mal de machete (Ceratogystis fimbriata)***

**Sinónimos:** Cáncer del tronco, Mal de macana, Llaga macana, Cáncer del tallo.

Las plantas afectadas generalmente presentan lesiones necróticas a nivel de cuello de color pardo oscuro, a partir del punto de penetración o cerca de heridas o desgarraduras del tronco. El mal de machete infecta el tejido del floema que es el sitio donde se desarrolla progresivamente la enfermedad. El área afectada puede llegar a rodear completamente el tronco o rama del cafeto, interrumpiendo de esta manera la circulación a través de los tejidos conductores. A partir de ese momento, empieza a ocurrir la muerte de la rama o de la planta, manifestándose por la flacidez y amarillamiento de su follaje. (INIAP, 1993)

### ***1.3.8. Roya anaranjada (Hemileia vastatrix)***

**Sinónimos:** Roya anaranjada, Herrumbre, Roya común, Roya oriental, Enfermedad oriental de la hoja, Enfermedad de la hoja del cafeto.

Los síntomas de la enfermedad durante la fase inicial de su desarrollo, se caracterizan por la presencia de pequeñas manchas redondas cloróticas y translúcidas de aproximadamente 1-2 mm de diámetro, localizadas en el envés de las hojas. En el haz, las hojas afectadas presentan manchas de una tonalidad aceitosa. Las lesiones gradualmente van incrementando su tamaño hasta alcanzar alrededor de 1 cm de diámetro; tomando en el envés un aspecto polvoriento de una tonalidad amarillo-anaranjada. Esta coloración se debe a la presencia de miles de uredosporas que constituyen las unidades reproductivas del patógeno. Lesiones con estas características se denominan comúnmente pústulas, las que con el tiempo coalescen unas con otras pudiendo llegar a cubrir gran parte del área foliar de los cafetos afectados. (INIAP, 1993)

## **1.4. Hongos fitopatógenos**

FHIA, (2007) Manifiesta que los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos eucarióticos, esporógenos, sin clorofila.

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que tienen quitina, celulosa, o ambos componentes. (AGRIOS, 1999)

### ***1.4.1. Características generales***

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

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

#### ***1.4.2. Estructuras somáticas***

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

Las hifas pueden ser septadas o sin septos (lisas o cenocíticas) este último tipo de hifa es característico de los hongos inferiores y cuando envejecen pueden formarse septos en varios lugares. Los septos varían en su estructura y pueden ser simples o complejos. (HERRERA & MAYEA, 1994)

El micelio en algunos hongos forma gruesos cordones denominado rizomorfos que semejan raíces, son resistentes a condiciones adversas y permanecen en estado de letargo hasta que se presentan condiciones favorables. En algunos casos, los rizomorfos pueden alcanzar grandes longitudes. (HERRERA & MAYEA, 1994)

#### ***1.4.3. Hongos como patógenos en las plantas***

El efecto nocivo de los hongos se debe a su capacidad para destruir físicamente los tejidos de la planta, alterar la fisiología vegetal reduciendo el crecimiento de toda la planta o de órganos determinados, o producir toxinas que afectan tanto a plantas como animales. Algunos hongos, conocidos como biótrofos, pueden crecer y multiplicarse manteniéndose durante todo su ciclo de

vida en la planta huésped, viviendo y obteniendo nutrientes sin causar la muerte. Otros son necrótrofos, en una parte de su ciclo vital requieren una planta huésped pudiendo crecer sobre tejido muerto o producir la muerte celular para absorber los nutrientes del tejido muerto. Muchas infecciones empiezan con una fase biotrófica que se convierte más tarde en necrotrófica. Algunos hongos son simbioses facultativos, creciendo tanto libres como asociados a plantas, y otros son simbioses obligados, creciendo sólo si están asociados a plantas. (AGRIOS, 2005)

#### ***1.4.4. Identificación de hongos***

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

- **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)

#### ***1.4.5. Signos y síntomas de hongos patógenos en la planta***

Los síntomas que producen los hongos en sus hospedantes son de tipo local o general y pueden aparecer por separado en hospedantes distintos, en un mismo hospedante aparecer uno después de otro en 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, 2007)

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, 2007)

#### ***1.4.6. Medios de cultivos usados en el aislamiento de hongos***

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

- **AGAR PAPA DEXTROSA (PDA)**. Es un medio útil para valorar el aspecto morfológico y la coloración de la colonia. Su alto contenido de carbohidratos condiciona un mayor crecimiento, el detrimento de la esporulación que suele retrasarse hasta un mes, las colonias pueden ser atípicas. (FRENCH & HEBERT, 1980)

La temperatura de incubación de los hongos fue de 23.5°C.

## 1.5. Estructuras reproductivas

### 1.5.1. *Hongos superiores*

- **Estructuras representativas de la clase Basidiomycetes:** La clase basidiomycetes se caracteriza por tener micelio tabicado y reproducirse sexualmente mediante la producción de basidioporas. Estas son producidas exógenamente sobre una estructura llamada basidio. Los basidios pueden ser septados o no. (FRENCH & HEBERT, 1980)

## **CAPITULO II**

### **2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **2.1. Materiales y recursos**

##### *2.1.1. Institucionales*

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

##### *2.1.2. Recursos humanos*

- Autor: Wilson Eduardo Pacheco Orellana
- Directora de tesis: Ing. Mg. Guadalupe López.
- Miembros de tribunal:
  - Ing. Santiago Jiménez
  - Ing. Adolfo Cevallos. MSc
  - Ing. Mg. Karina Marín

### **2.1.3. Material de oficina**

- Cámara fotográfica SONY
- Computadora hp
- Flash memory hp
- Fundas de papel “sobres de carta”
- Fundas de plástico “ziploc”
- GPS GARMIN
- Impresora
- Libro de campo
- Navaja
- Tijera

### **2.1.4. Material experimental.**

- Hoja de café (*Coffea arabica* L.) infectada con el hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)

### **2.1.5. Materiales de laboratorio**

- **Equipos**
  - Autoclave semiautomática 2540-23 litros
  - Balanza digital.
  - Cámara científica INFINITY 1-2CB
  - Cámara de crecimiento o incubadora
  - Cámara de flujo laminar aurora mini con base
  - Desmineralizador de agua WATERWISE 9000
  - Estufa eléctrica
  - Incubadora IN110

- Microscopio Trinocular OLYMPUS CX31
- Refrigeradora R1-425 QUARZO INDURAMA

- ***Materiales***

- Asa de siembra
- Bisturí
- Botellón de agua y soporte.
- Cajas Petri
- Cajas separadoras “almacenamos las muestras terminadas”
- Cinta adhesiva transparente de 1,5 cm de ancho
- Cintas para etiquetar
- Cintas para medir el pH
- Cofias
- Cubre objetos
- Cucharas de plástico pequeñas
- Cucharas de cocina
- Encendedor
- Matraz Erlenmeyer de 500 ml
- Esfero
- Goteros de plástico
- Guantes descartables
- Mandil
- Mascarillas descartables
- Material didáctico
- Mechas para mechero
- Mechero de alcohol
- Olla
- Papel absorbente
- Papel aluminio

- Parafilm de laboratorio
- Pinzas
- Porta objetos
- Protectores para calzado
- Taburetes
- Tamiz
- Tijera
- Varilla de agitación.
- Vaso de precipitación de 40 -100 - 1000 ml

- **Reactivos**

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

## **2.2. Diseño metodológico**

En esta investigación se caracterizó morfológicamente: los signos y síntomas, macro y micro estructuras y ciclo de vida del hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*), en base a imágenes captadas con el microscopio trinocular OLYMPUS CX31 acoplado con una cámara INFINITY; de esta manera se corrobora con la descripción de la bibliografía encontrada

### **2.2.1. Investigación descriptiva**

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

La investigación es descriptiva, porque para su desarrollo se detalló minuciosamente todo el proceso de investigación, además se recopiló información de las características morfológicas e identificó a los hongos fitopatógenos. Además de describir los resultados fueron procesados, analizados, discutidos y establecidos de cómo se ocasionaron los fenómenos, y así se evaluaron aspectos relevantes de la investigación.

## **2.3. Método**

La presente investigación se basó en un diseño no experimental, pues no se realizó manipulación de ninguna variable, es decir no se cambió la realidad del cultivo de café en el sector Los Laureles, cantón La Mana, provincia de Cotopaxi por el contrario lo que se realizó con la investigación es mejorarla, gracias a la “Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos”.

### **2.3.1. Métodos lógicos**

- **Método descriptivo analítico:** Se utilizó este método en la investigación porque se describió y analizó detalladamente en campo como en laboratorio al hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*).
- **Método deductivo:** Para el avance de la investigación se empleó este método porque permitió recopilar información de las características

morfológicas que presentan el hongo, permitiendo de esta manera identificar a *Mycena citricolor* en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.).

- **Método comparativo:** Este método se utilizó con la finalidad de comparar el hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) aislado en laboratorio con la bibliografía citada.

### 2.3.2. Técnica

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

## 2.4. Delimitación del lugar de recolección

Se recolecto las muestras en el sector Los Laureles el mismo que se encuentra ubicado en la parte sureste del cantón La Mana, la cual esta limita: al norte con el recinto San Pedro, al sur con el recinto San Pablo, al este con el rio San Pablo al oeste con el cantón Pangua.

### 2.4.1. Ubicación política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** La Mana
- **Parroquia:** La Mana
- **Sector:** Los Laureles

### 2.4.2. Ubicación geográfica

- **Latitud:** 07° 06' 198''S
- **Longitud:** 98° 89'232''W
- **Altitud:** 586 msnm

### 2.4.3. Condiciones edafoclimáticas del sector Los Laureles

**TABLA 4.** Condiciones edafoclimáticas

<b>CONDICIONES EDAFOCLIMÁTICOS</b>	
Temperatura anual media (°C)	23
Humedad Relativa (%)	88 y 90
Precipitación anual (mm)	549,5 y 512

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

## 2.5. Delimitación del laboratorio

El laboratorio está ubicado a 300 m al sur de la Maltería Plaza, entre la calle General Montero y la carretera Panamericana Sur, en el Cantón Latacunga, Provincia de Cotopaxi.

### 2.5.1. *Ubicación política*

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

### 2.5.2. *Ubicación geográfica*

- **Latitud:** 0°55'44.8"S
- **Longitud:** 78° 37.24.2''W
- **Altitud:** 2850 msnm

## 2.7. Diagnóstico del cultivo

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

- Identificar la planta hospedante: Café (*Coffea arabica* L.)
  
- Síntomas en campo: utilizar información propia y del agricultor.
- Condiciones de cultivo: Información del tipo de suelo, prácticas y riego, fertilización y aplicación de plaguicidas.
  
- Síntomas en detalle: Observación de manchas, roya foliar, pudriciones, chancros o agallas.
  
- Observación: la observación se realizó con un microscopio OLYMPUS CX31 en laboratorio, de la superficie de las lesiones o tejidos muertos;

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

### ***2.7.1. Toma de muestras***

El método utilizado para esta actividad fue por cuotas, en la cual se fijó un número de individuos que reunieron unas determinadas condiciones.

### ***2.7.2. Procedimientos en la toma de muestras***

Se extrajo partes de plantas afectadas “hojas” con una tijera, en cada corte se procedió a esterilizar los materiales con alcohol y las muestras vegetales se envasaron en bolsas de papel para que el exceso de humedad sea absorbido por el papel, posteriormente se procedió a colocar en una funda ziploc con su respectiva codificación y se trasladó inmediatamente al laboratorio para proceder con el trabajo en el mismo.

## **2.8. En laboratorio**

Preparación de medio de cultivo PDA. (ANEXO 1)

### ***2.8.1. Aislamiento***

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

### **2.8.1.1. Aislamiento directo.**

Se observó a través del microscopio una muestra enferma; para verificar si se encontraba fructificaciones, micelio, etc., para esto se procedió a tomar una muestra de este material con una aza de cultivo esterilizada “flameada con un mechero de alcohol”, para finalizar se coloca directamente sobre el medio de cultivo solidificado.

### **2.8.1.2. Partes vegetales en medio de cultivo PDA.**

Se procedió a tomar porciones de tejido enfermo para desinfectarlos en una solución 2:1 de alcohol a 75°G.L, se lavó dos veces con agua desmineralizada y se eliminó los excesos de la misma, y al final se coloca en el interior de una caja de petri estéril con PDA.

## **2.8.2. Purificación**

Consistió en realizar cortes de las puntas de micelio del borde de la colonia en crecimiento con la ayuda de un bisturí estéril. Esta pequeña porción del hongo y agar se depositó en otras cajas con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtuvo cultivos puros.

## **2.8.3. Incubación**

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

#### **2.8.4. Caracterización morfológica**

##### **2.8.4.1. Observación microscópica**

- **Técnica de cinta pegante:** Se procedió a realizar un dobléz de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostendrá con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo a estudiar, después se adiciono una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se pegó la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un lentes de 4x, 10x, 20x y 100x.
- **Montaje por disección:** Con un aza estéril (o bisturí), se tomó una pequeña muestra del hongo y se ubicó sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada, con la misma aza se extendió el micelio, después se puso el cubreobjetos para observarlo en el microscopio con lentes de 4x, 10x, 20x y 100x.

#### **2.8.5. Descripción**

Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos: para esto se utilizó el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de bibliografía.

De las cepas aisladas se hizo observaciones macroscópicas tales como: forma de la colonia del hongo, color característico del medio de cultivo, halo de crecimiento de cada una de las colonias.

Luego se procedió a realizar placas fijas de cada una de las cepas aisladas para posteriormente observar las estructuras microscópicas tales como: forma del conidiosporo, esporangiosporos, forma y tamaño de las esporas o conidios.

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

- Preparación de cajas petri con las cepas de hongos aislados, una en cada caja petri.
- Utilización de cinta masking transparente de seis centímetros de largo y se fija en el cuerpo fructífero, tomando directamente de la caja petri, donde se encuentran las cepas puras.
- Observación en microscopio con objetivos adecuados y toma de fotografías microscópicas de las diferentes estructuras.
- Creación de un archivo con fotografías tomadas de las cepas para luego realizar los postulados de koch y cumplir con el cuarto ítem.
- Elaboración de un cuadro comparativo con los hongos re-aislados, para ver si eran el mismo hongo que se inoculo.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Determinación del hongo fitopatógeno de mayor impacto en cultivo de Café (*Coffea arabica* L.).

Mediante observación directa se determinó que el hongo fitopatógeno de mayor impacto económico en el cultivo de Café (*Coffea arabica* L.) en el sector Los Laureles, cantón La Mana, provincia de Cotopaxi, es el Ojo de gallo (*Mycena citricolor*).

#### 3.2. Signos y síntomas del Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el cultivo de Café (*Coffea arabica* L.).

En el campo los signos que se pudo observar la caída de hojas las mismas que presentaban agujeros y también se pudo constatar la pérdida de masa foliar en muchas plantas del cultivo y los síntomas observados en las plantas afectadas fueron manchas circulares de color grisáceo en el has de hojas jóvenes y viejas; estas características concuerdan bibliográficamente con el hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*).



**IMAGEN 1.** Ojo de gallo (*Myrcena citricolor*)

**Fuente:** Pacheco Wilson

### 3.3. Caracterización de macro y micro estructuras de Ojo de gallo (*Myrcena citricolor*).

**TABLA 5.** Caracterización de macro y microestructuras del patógeno

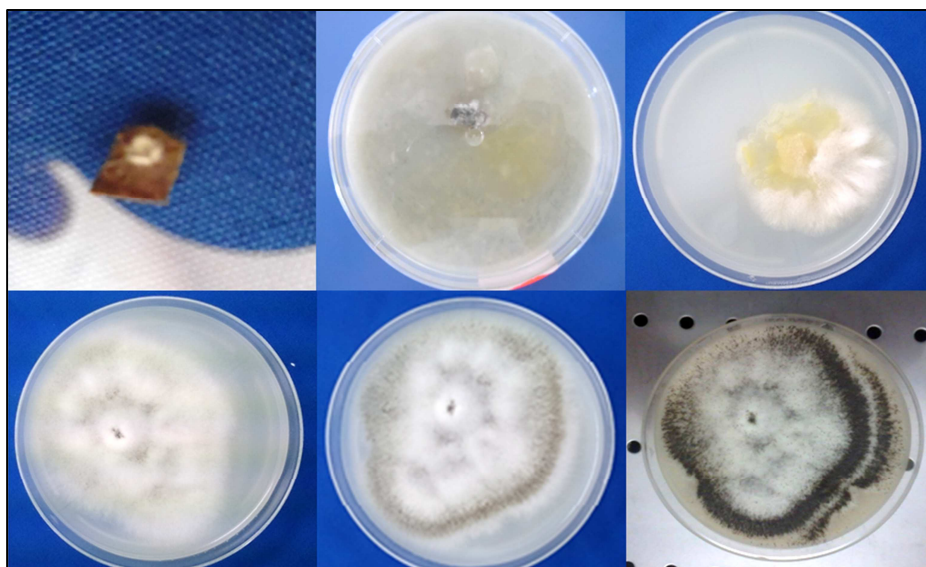
CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	ÍNDICE	TÉCNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de Tomate de Árbol	Talo	Tipo	Observación	Microscopio
	Micelio	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.3.1. *Macro estructura.*

Según BONILLA, (1980) describe el crecimiento del micelio del hongo in vitro, el cual es de coloración blanca y algodonosa, con crecimiento irregular; es decir no del todo radial, el cual no colorea el sustrato.

En el laboratorio en la muestra recolectada, se pudo identificar que en el has de la hoja existía la presencia de un micelio color amarillento.



**IMAGEN 2.** Desarrollo del hongo en medio de cultivo PDA

**Fuente:** Pacheco Wilson

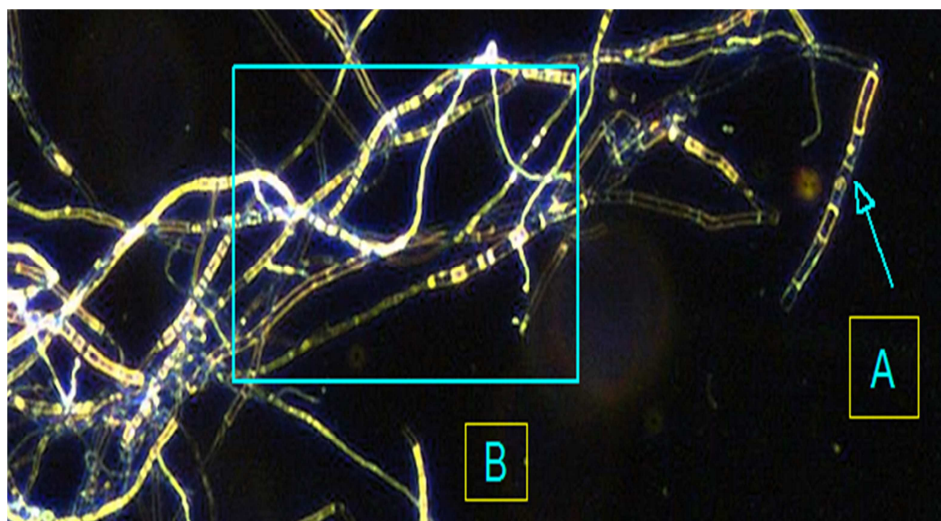
El hongo que se inoculó en el medio de cultivo PDA, en sus primeros estadios presento un micelio de color blanco, con el transcurso del tiempo todo el medio de cultivo estaba invadido por el hongo con formas anilladas irregulares, ramificadas, no continuas y de textura algodonosa, en la revisión final se identificó un anillo irregular con pústulas de color café.

### 3.3.2. *Microestructuras*

Las micro estructuras de las muestras infectadas por Ojo de gallo (*Mycena citricolor*), se las pudo observar con la ayuda de un microscopio trinocular OLYMPUS CX31 el cual estaba adaptado con una cámara INFINITY 1-2CB y se las pudo fotografiar y observar con un lente de 20X.

El micelio de *Mycena citricolor*, consiste de hifas hialinas desarrolladas, septadas y profusamente ramificadas. En algunas especies, varias hifas paralelas pueden unirse y formar cordones gruesos de micelio, llamados "rizomorfos" (ROMERO, 1988)

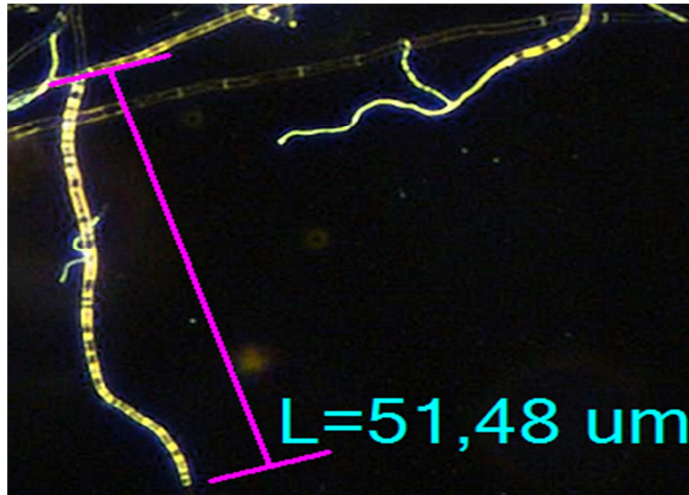
Según ROMERO, (1988) las hifas son de forma irregular, distinto grosor y en su interior se observa estructuras que asemejan burbujas de aire. Concordando de esta manera con VARGAS, (1990) quien afirma que el micelio de *Mycena citricolor*, también que las hifas son septadas y binucleadas.



**IMAGEN 3.** Micro estructuras de *Mycena citricolor*

**Fuente:** Pacheco Wilson

En la IMAGEN 3 se puede observar dos características muy importantes: A: en el interior de las hifas presentan una forma de burbujas de aire; B: las hifas son septadas y presentan formas irregulares las mismas que varían de grosor.

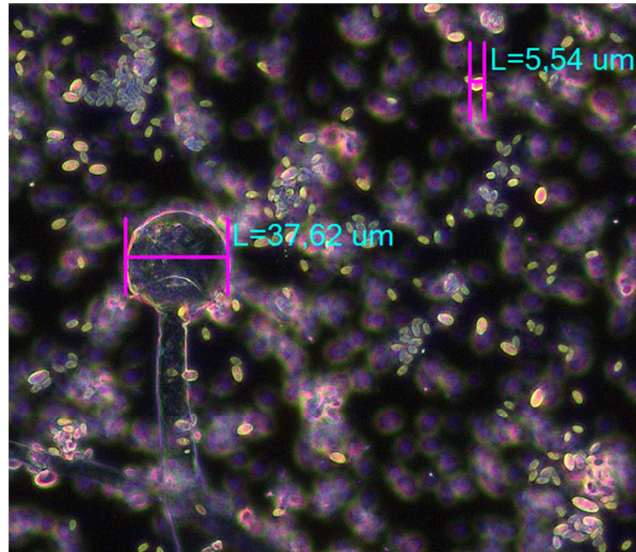


**IMAGEN 4.** Hifa de *Mycena citricolor*

**Fuente:** Pacheco Wilson

Se observa una hifa de *Mycena citricolor* la misma que presenta una longitud de 51,48  $\mu\text{m}$  vista con el lente de 20x.

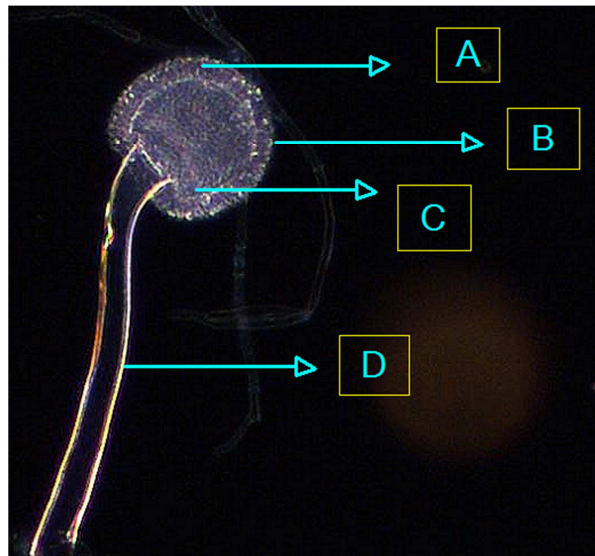
El Ojo de gallo (*Mycena citricolor*), en medio de cultivo PDA opto por una reproducción asexual ya que este se encuentra en condiciones desfavorables para su reproducción, las esporas se reprodujeron en elevadas cantidades y de esta manera asegura su supervivencia. *Mycena citricolor* presentó hifas septadas de esta manera se desvincula cualquier relación con la división de los zigomicetos ya que estos no poseen tabiques en sus hifas.



**IMAGEN 5.** Final del ciclo de vida de *Mycena citricolor*

**Fuente:** Pacheco Wilson

La longitud promedio de las esporas es de 5,54  $\mu\text{m}$ , la misma que tiene forma elipsoidal, y el radio de la coemula oscila los 37,62  $\mu\text{m}$ .



**IMAGEN 6.** Estructura de *Mycena citricolor* en su reproducción asexual

**Fuente:** Pacheco Wilson

En la reproducción asexual que presento *Mycena citricolor* presento las siguientes estructuras: A: Esporangiosporas, B: Esporangio, C: Columela, D: Esporangióforo.

### **3.4. Descripción del ciclo de vida del hongo Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en condiciones de laboratorio.**

#### **3.4.1. Reproducción sexual de Ojo de gallo (*Mycena citricolor*).**

Según BORBON, (1999) el estado sexual o teleomorfo de *Mycena citricolor*, se puede encontrar muy pocas veces en la naturaleza y de acuerdo con expertos, el estado del hongo tiene poca importancia en el desarrollo de la enfermedad.

#### **3.4.2. Reproducción asexual de Ojo de gallo (*Mycena citricolor*).**

Por la escasa información que existe en el medio no es posible comparar los resultados obtenidos en el laboratorio bibliográficamente con gran precisión, sobre la reproducción asexual del hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*). Por tal motivo la investigación está basada en la comparación en la reproducción tanto sexual y asexual de la división basidiomicetes, en la cual se encuentra situado el hongo en estudio.

#### **3.4.3. Reproducción asexual de los basidiomicetos.**

El hongo *Mycena citricolor* tiene como principal característica la producción de dos tipos de estructuras reproductivas: gemas (fase asexual) y basidiocarpos (fase sexual). Cuando las condiciones ambientales son favorables

para el desarrollo del hongo y en cultivares de café susceptibles, se observan estructuras semejantes a pequeños alfileres de coloración amarilla, que aparecen sobre las lesiones, esta es la fase asexual del hongo. El hongo durante esta fase produce cuerpos fructíferos conocidos como gemas de forma esférica, de consistencia mucilaginosa. Esta característica, permite la adherencia de las gemas en hojas u otras partes vegetativas (OROSZCO & CALDERÓN, 2010).

En los medios de cultivos que estaban inoculados con *Mycena citricolor*, no presento una reproducción sexual; pero a su vez la reproducción asexual fue casi muy irregular, ya que misma necesitaba luminosidad y aireación para la formación de gemas de una forma notoria como hace referencia la bibliografía citada.

De esta forma se concuerda con VARGAS, (1990) ya que expone que para la máxima producción de gemas y del pigmento amarillo de las mismas se da cuando el hongo se expone a longitudes de onda de 310- 400nm, por lo tanto, se considera que ambas formas de reproducción basidio carpos como gemas necesitan de luz y aireación para su desarrollo en medio de cultivo


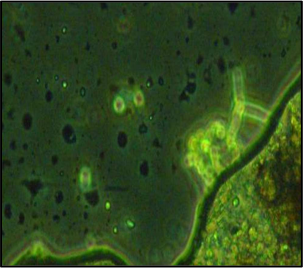

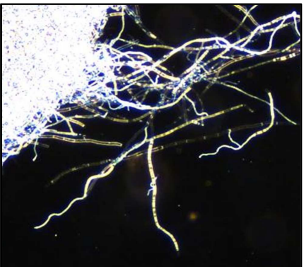
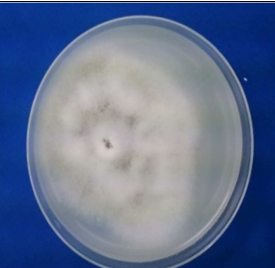

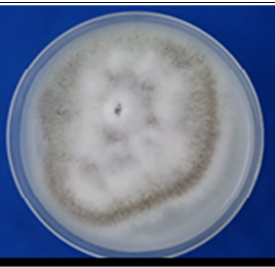
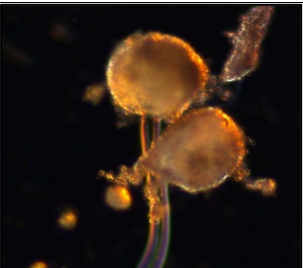

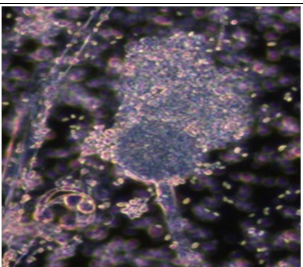
De todos los aislamientos de *Mycena citricolor* realizados en el medio de cultivo PDA a una temperatura de 23,5 °C, no produjeron basidiocarpos ya que estas se presentan en la reproducción sexual del hongo.

Según TORTORA & OTROS, (2007) “Algunos de los basidiomicetos producen conidiosporas asexuales”. Y asegura GONZALES, (2012) “Las esporas asexuales pueden ser clamidosporas, conidiosporas o conidios y esporangiosporas, no son características para cada especie”.

La fase asexual que conduce a la formación de esporangiosporas, esporas inmóviles formadas en el interior de una especie de saco denominado esporangio. La mayoría de los esporangios están originados en ramas o pedúnculos

especializados y producen varias esporangiosporas por esporangio. En algunas especies la base del esporangióforo se proyecta en el interior del esporangio, formando un engrosamiento a modo de vesícula hialina, columela, que se utiliza como criterio taxonómico. Los esporangióforos presentan una gran cantidad de respuestas sensoriales; dentro de ellas podemos señalar el fototropismo positivo. (ÁLVARES & VÁSQUEZ, 2009)

**TABLA 6.** Ciclo de vida de *Mycena citricolor* en condiciones de laboratorio.

Actividad	tiempo/ temperatura (°C)	Imagen	Observación microscopio	Lente
Inoculación del hongo	10 minutos a 19 °C			10x
Presencia de micelio	2 días a 23,5 °C			10x
Formación de esporangióforo	6 días a 23,5 °C			4x
Maduración de esporangio	11 días a 23,5 °C			20x
Liberación de esporangiosporas	14 días a 23,5 °C			20x

**Fuente:** Pacheco Wilson

### **3.5. Elaboración de una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)**

Anexo 1

## CONCLUSIONES:

1. Se concluyó que en el sector de Los Laureles, cantón La Mana, provincia de Cotopaxi, que el hongo fitopatógeno de mayor importancia a nivel de pérdida de producción en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), es el Ojo de gallo (*Mycena citricolor*), esto se pudo determinar por una observación detallada que se realizó en campo los mismos que corroboran con los datos obtenidos bibliográficamente.
2. Se pudo identificar que los signos y síntomas que presentaba el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), que las plantas afectadas con Ojo de gallo (*Mycena citricolor*), las que se presenta en el has tanto en hojas jóvenes o viejas y en el fruto, también presenta lesiones redondas de coloración gris o marrón como se observa en la IMAGEN 2.
3. Luego de una exhaustiva revisión bibliográfica y también con un trabajo realizado en el laboratorio, se logró caracterizar al hongo Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) sus macro estructuras estas se presentaron un micelio de color blanco, con formas anilladas irregulares, ramificadas, no continuas y de textura algodonosa, y las micro estructuras y su ciclo de vida el cual es asexual estas presentaron estructuras como: hifas hialinas septadas irregulares con una longitud de 51,68  $\mu\text{m}$ , la longitud promedio de las esporas de forma elipsoidal es de 5,54  $\mu\text{m}$ , y el radio de la colemla oscila los 37,62  $\mu\text{m}$ ; estas estructuras se pudieron observar un lente de 4x, 10, 20x y 100x.
4. La guía didáctica que se realizó en la presente investigación, servirá de ayuda informativa tanto para estudiantes que realicen futuras investigaciones, como para los agricultores del sector, para una oportuna identificación y control del hongo (*Mycena citricolor*).

## RECOMENDACIONES:

1. Se recomienda que en el momento de recolección el transporte sea el adecuado para la muestra *Mycena citricolor* esta se debe realizar en un lapso de tiempo corto debido a la supervivencia del hongo.
2. En los cultivos del sector Los Laureles, cantón La Mana, provincia de Cotopaxi, por falta de tecnificación del cultivo de café se encuentra presente el hongo fitopatógeno de Ojo de gallo (*Mycena citricolor*); de tal manera se recomienda realizar métodos preventivos, controles culturales o químicos.
3. Al realizar el medio de cultivo PDA se recomienda seguir los procedimientos adecuados para utilización del laboratorio, tanto como el buen manejo y trato de los equipos, materiales y reactivos, de esta forma se obtendrá un medio de cultivo totalmente puro para la inoculación del patógeno.
4. Al momento de trabajar con la incubadora se debe ser programada a una temperatura de 23,5 °C, por un intervalo de 15 días que necesita *Mycena citricolor* para reproducirse, y a su vez no mantenerla abierta por mucho tiempo ya que puede existir variaciones bruscas de temperaturas y ocasionar daños a las muestras incubadas.
5. Se recomienda trabajar con el programa INFINITY ANALYZE el mismo que al realizar mediciones de micro estructuras del hongo, nos permitirá hacerlas con total precisión; para ello hay que realizar una previa calibración de medidas.

## GLOSARIO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**Hifa:** ramificación simple de un micelio.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## BIBLIOGRAFÍA

- ALVARADO & ROJAS. (2007). *El cultivo y beneficiado del Café*. Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia San José.
- AGRIOS, G. (1999). *Fitopatología*. Mexico: LIMUSA.
- AGRIOS, G. (2005). *Plant Pathology*. Nueva York: Academic Press.
- AGRIOS, G. (2007). *Fitopatología*. Mexico: LIMUSA.
- ÁLVARES & VÁSQUEZ. (15 de 1 de 2009). Técnicas básicas de Microbiología. *INTRODUCCIÓN A LOS HONGOS FILAMENTOSOS.*, 7,8. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid.
- BARQUERO. (miercoles de febrero de 2012). *Sistema de alerta temprana para el ojo de gallo*. (ICAFFE, Editor) Recuperado el 13 de Mayo de 2015, de [http://www.icafe.go.cr/icafe/revista\\_informativa/revistas/2012/Revista%20II%20Sem%2012.pdf](http://www.icafe.go.cr/icafe/revista_informativa/revistas/2012/Revista%20II%20Sem%2012.pdf)
- BAYER. (2015). *BAYER, Problemas Biologicos*. Recuperado el miercoles de mayo de 2015, de [http://www.bayercropscience-ca.com/contenido.php?id=241&cod\\_afeccion=30](http://www.bayercropscience-ca.com/contenido.php?id=241&cod_afeccion=30)
- BONILLA. (1980). Estudio del ojo de gallo causado por el hongo *Mycena citricolor*. *In Simposio Latinoamericano sobre Caficultura*, 177-188.
- BORBON. (1999). Consideraciones sobre la problematica del ojo de gallo Costa Rica. Tesis Ing. Agr. Universidad de San Carlos de Guatemala. (pág. 5). San Jose: CICAFFE.
- CALZADA, B. (2002). *Frutales nativos*. Lima, Perú: El Estudiante.
- CENICAFÉ. (agosto de 2011). Ojo de gallo o gotera del cafeto *Omphalia flavida*. (S. M. Marín, Ed.) *Boletín técnico Cenicafé*, 5,6.

- COFENAC. (2013). *Situación del Sector Cafetalero Ecuatoriano "DIAGNOSTICO"*. Portoviejo.
- FHIA. (2007). *Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias*. Obtenido de <http://fhia.org.hn/downloads/fhiainfdic2007.pdf>
- FRENCH, E., & HEBERT, T. (1980). *Métodos de investigación fitopatológica*. San José, Costa Rica: IICA.
- GAD COTOPAXI. (martes de enero de 2015). <https://www.cotopaxi.gob.ec>.
- GONZALES. (2012). *Patologías Bióticas de la Madera de los bosques templados de Chile*. 10. Chile.
- HERRERA, L., & MAYEA, S. (1994). *Fitopatología General*. La Habana, Cuba: Felix Varela.
- INIAP. (1993). *Manual del cultivo de café*. Quevedo: Estacion Experimental Tropical, Pinchilingue.
- OROSZCO & CALDERÓN. (2010). *Biología de Mycena citricolory su asociacion en cafe para Guatemala. Tesis. Ing. Agr. Universidad San Carlos de Guatemala*. Guatemala: ANACAFE.
- PRO ECUADOR. (2013). ANÁLISIS SECTORIAL DEL CAFE. 4.
- RIVILLAS & CASTRO. (2011). OJO DE GALLO. *Boletín Técnico CENICAFE*, 6.
- ROMERO. (1988). *Hongos fitopatogenos* (1° ed.). Luciano Tress V.
- RUIZ. (1989). *Cultivo del Café* (136 ed.).
- STREETS, R. (1972). *El diagnóstico de enfermedades de las plantas: un manual de campo y de laboratorio haciendo hincapié en los métodos más prácticos para la rápida identificación* (2ª ed ed.). Tucson: University of Arizona Press.

TORTORA Y OTROS. (2007). *Introducción a la microbiología* (9° ed.). Madrid, España: EDITORIAL MEDICA PANAAMERICANA.

VARGAS. (1990). Epidemiología del ojo de gallo *Mycena citricolor* en cafeto en diferentes zonas cafetales en Costa Rica. *Simposio de caficultura Latinoamerica*, 191.

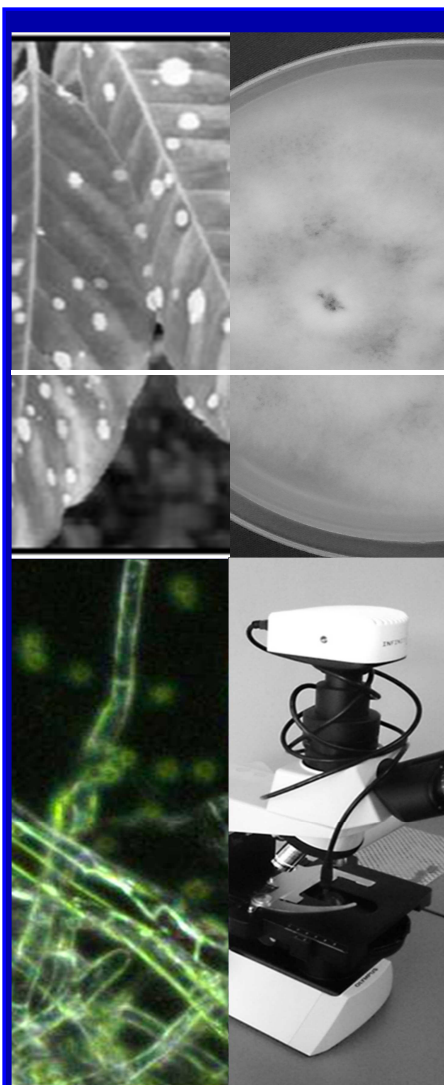
WANG. (1994). *Aplicacion de principios epidemiologicos para el combate de ojo de galla en Costa Rica*. (C. d. Cultivos, Ed.) UNIVERSIDAD DE COSTA RICA.

## ANEXO 1



Universidad  
Técnica de  
Cotopaxi

UNIDAD ACADÉMICA DE RECURSOS AGROPECUARIOS Y  
RECURSOS NATURALES



### GUÍA DIDÁCTICA

CARACTERIZACIÓN  
MORFOLÓGICA  
DEL HONGO  
FITOPATÓGENO  
OJO DE GALLO  
(*Mycena citricolor*)”

Autor: Wilson  
Eduardo Pacheco  
Orellana

## DEDICATORIA

Dedico la creación e esta guía didáctica a la Universidad Técnica De Cotopaxi y a la Unidad Académica De Ciencias Agropecuarias Y Recursos Naturales, Carrera De Ingeniería Agronómica por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios, y a todos los docentes que conocí en todo ese tiempo.

WILSON

# ÍNDICE

DEDICATORIA.....	2
INTRODUCCIÓN.....	4
OBJETIVO.....	4
RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL LABORATORIO.....	5
TOMA DE MUESTRA.....	6
MATERIALES Y REACTIVOS.....	7
PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PDA.....	7
TIPOS DE AISLAMIENTOS.....	8
PURIFICACIÓN.....	9
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	9
SIGNOS Y SÍNTOMAS.....	10
MACRO Y MICRO ESTRUCTURAS.....	10
CICLO DE VIDA DE ( <i>Mycena citricolor</i> ), EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	11
BIBLIOGRAFÍA.....	12

## INTRODUCCIÓN

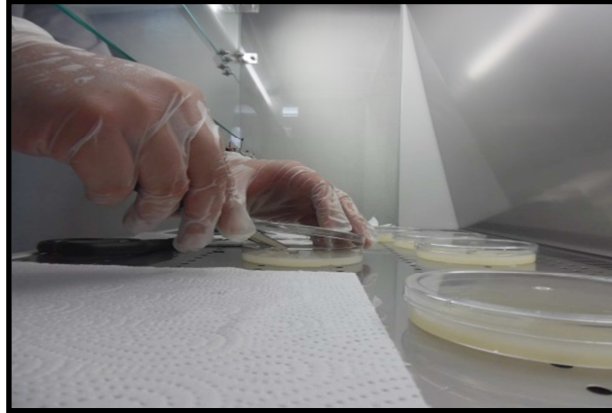
El motivo de esta investigación se basa en que la actividad cafetalera en nuestro país viene enfrentando una gran cantidad de problemas técnicos en el cultivo lo cual han provocado pérdidas en la competitividad de nuestro café en el mercado internacional y un deterioro de la estructura socioeconómica de los productores del grano.

Se pudo determinar, los signos y síntomas que se presentan en campo, descripción de macro y micro estructuras y el ciclo de vida del hongo fitopatógeno *Mycena citricolor*, en condiciones de laboratorio.

*Mycena citricolor* es el agente causal del Ojo de gallo en el cultivo de café (*Coffea arabica* L.), cuyos síntomas que presentan en campo se manifiesta siempre por el haz de la hoja y se caracteriza por la formación de pequeñas manchas de color rojizo oscuro, estas lesiones son de forma circular pero pueden ser ovaladas, debido a la delimitación con las nervaduras de las hojas, o algo irregulares cuando. Las lesiones jóvenes son oscuras y las viejas de color más claro.

## OBJETIVO

Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en condiciones de laboratorio



## RECOMENDACIONES PARA EL USO DEL LABORATORIO

- No ingresar con bebidas o alimentos.
- Ingresar con mandil, guantes, cofias y protectores de calzado.
- Tener el lugar trabajo en orden y limpio antes, durante y al finalizar la práctica.
- Tener cuidado con los materiales y equipos del laboratorio.
- Seguir los pasos indicados para realizar el medio de cultivo para no desperdiciar reactivos y a su vez realizar un pesaje correcto con la balanza.
- Revisar antes de encender el microscopio, que la luz del condensador este apagado para evitar algún tipo de daño.



## **TOMA DE MUESTRAS**

El método utilizado para esta actividad puede ser por cuotas, en la cual se fija un número de individuos que reunieron unas determinadas condiciones.

## **PROCEDIMIENTOS EN LA TOMA DE MUESTRAS**

Se extrae partes de plantas afectadas con una tijera, en cada corte se esteriliza los materiales con alcohol, las muestras vegetales se envasan en bolsas de papel para que el exceso de humedad sea absorbido por el papel, posteriormente se procede a colocar en una funda ziploc con su respectiva codificación y se traslada inmediatamente al laboratorio.

## MATERIALES Y REACTIVOS

### **Reactivos.**

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

### **Materiales**

- 1 balanza digital
- 1 cocina eléctrica
- 1 cuchara de cocina
- 1 cuchillo
- 1 olla
- 1 tamiz

- \* 1 varilla de agitación
- \* 1 vaso de precipitación de 1000ml
- \* 2 matraces Erlenmeyer de 500ml
- \* 2 vasos de precipitación de 100ml
- \* 40 cajas petri
- \* 7 papel filtro
- \* Papel absorbente
- \* Papel aluminio
- \* Auto clave
- \* Cámara de flujo laminar

## PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PDA

1. Lavar y cortar en pequeñas partes, y pesar 350 g de papas
2. Colocar la muestra en una olla con 875ml de agua desmineralizada para la cocción en una estufa eléctrica.
3. Retirar la olla de la estufa, y tamizar el contenido; medir la cantidad de agua sobrante y añadir la cantidad de agua perdida en la cocción.
4. Pesar el agar, la levadura y la glucosa en papel filtro en una balanza digital.
5. Diluir la levadura y la glucosa en 80ml de agua desmineralizada (caliente), en un vaso de precipitación de 100ml con la ayuda de una varilla de agitación.



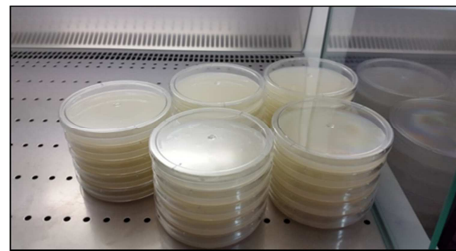
6. Colocar el vaso de precipitación de 1000ml a baño María y agregamos 30g de agar y la solución disuelta en 80ml de glucosa y levadura.

7. Mezclar con una varilla de agitación hasta obtener una solución homogénea.

8. La solución obtenida se vierte en dos matraces de 500ml equitativamente, después tapan los matraces Erlenmeyer con papel absorbente en forma de corcho y papel aluminio.

9. Colocar los matraces en el autoclave para su esterilización por un lapso de una hora a 121°C.

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



## TIPOS DE AISLAMIENTOS

### **Aislamiento directo.**

Para esto se toma una muestra de este material con una aza de cultivo esterilizada “flameada con un mechero de alcohol”, para finalizar se coloca directamente sobre el medio de cultivo solidificado de PDA.



### **Partes vegetales en PDA.**

Se procede a tomar porciones de tejido enfermo para desinfectarlos en una solución 2:1 de alcohol a 75°G.L, se lava dos veces con agua desmineralizada y se elimina los excesos de la misma, y colocar en el medio de cultivo PDA.



## PURIFICACIÓN

Consiste en realizar cortes de las puntas de micelio del borde de la colonia en crecimiento con la ayuda de un bisturí estéril. Esta pequeña porción del hongo y agar se deposita en otras cajas con medios de cultivo estéril y de esta forma se obtiene cultivos puros.



## INCUBACIÓN

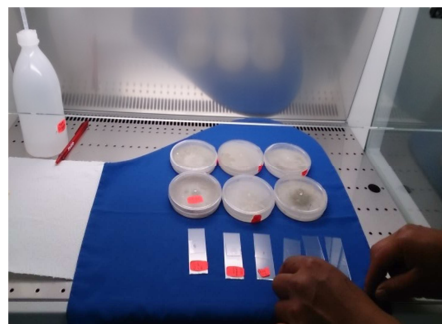
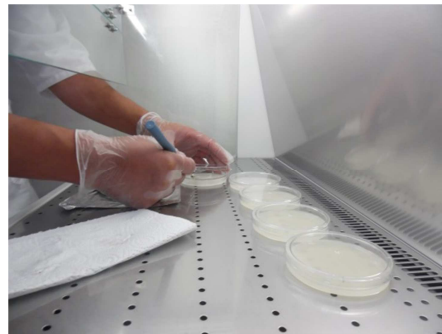
La incubación se la realiza a 23,5 °C en una incubadora IN110, por el lapso de 15 días según el desarrollo del micelio del hongo.



## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

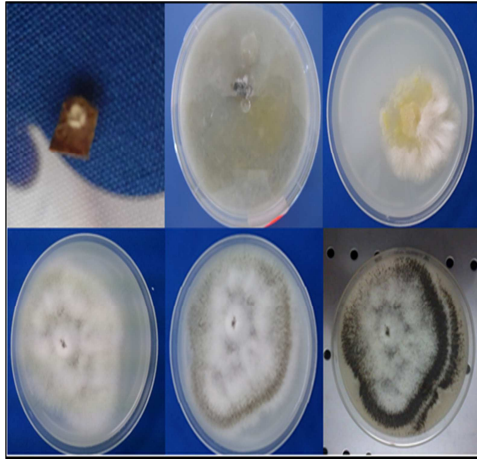
### OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

**Montaje por disección:** Con un aza estéril o bisturí, se toma una muestra del hongo y se ubica sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada, con la misma aza se extiende el micelio, después se coloca el cubreobjetos los mismos que tienen que llevar una etiqueta para evitar confusiones, para finalizar se observa en el microscopio con lentes de 4x, 10x, 20x y 100x.



### SIGNOS Y SÍNTOMAS:

En el campo los signos que se pudo observar la caída de hojas las mismas que presentaban agujeros y también se pudo constatar la pérdida de masa foliar en muchas plantas del cultivo y los síntomas observados en las plantas afectadas fueron manchas circulares de color grisáceo en el haz de hojas jóvenes y viejas; estas características concuerdan bibliográficamente con el hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*).

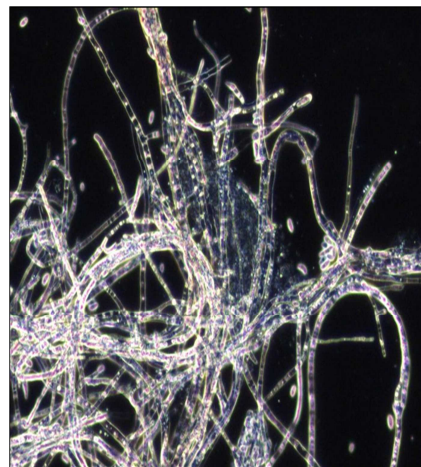


### MACRO ESTRUCTURAS:


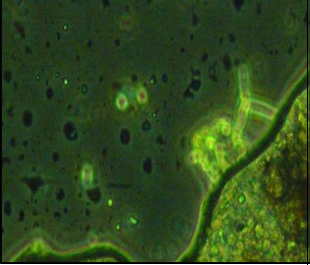

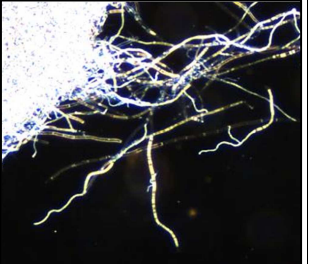
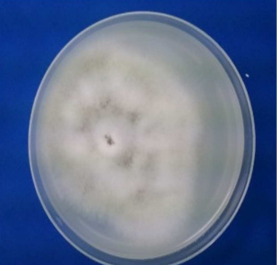

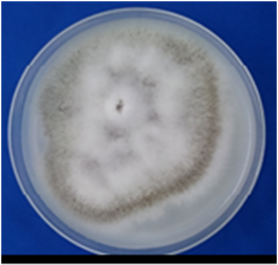
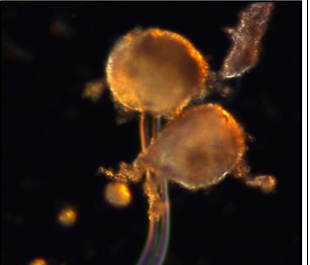

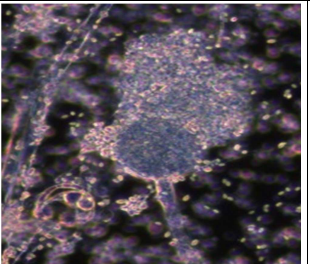
El hongo en el medio de cultivo PDA, en sus primeros estadios presento un micelio de color blanco, con el transcurso del tiempo todo el medio de cultivo estaba invadido por el hongo con formas anilladas irregulares, ramificadas, no continuas y de textura algodonosa, en la revisión final se identificó un anillo irregular con pústulas de color café.

### MICRO ESTRUCTURAS:

Las micro estructuras de las muestras infectadas por Ojo de gallo (*Mycena citricolor*) con la ayuda de un microscopio óptico OLYMPUS CX31 el cual estaba incorporado con una cámara INFINITY1-2CB las mismas que se observan con un lente de 20x, el micelio de *Mycena citricolor*, consiste de hifas hialinas desarrolladas e irregulares, septadas y profusamente ramificadas, de distinto grosor y en su interior se observa estructuras que asemejan burbujas de aire.



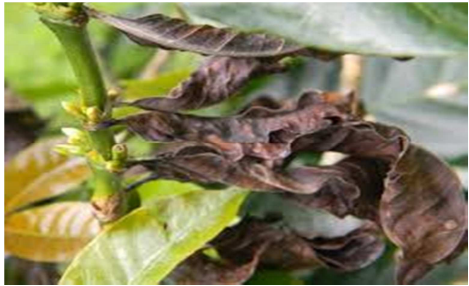
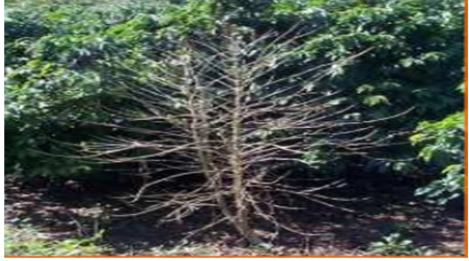
**Tabla.** Ciclo de vida de *Mycena citricolor* en condiciones de laboratorio.

Actividad	tiempo/ temperatura (°C)	Imagen	Observación microscopio	en Lente
Inoculación del hongo	10 minutos a 19 °C			10x
Presencia de micelio	2 días a 23,5 °C			10x
Formación de esporangioforo	6 días a 23,5 °C			4x
Maduración de esporangio	11 días a 23,5 °C			20x
Liberación de esporangiosporas	14 días a 23,5 °C			20x

## ANEXO 2

### ENFERMEDADES EN EL CULTIVO DEL CAFÉ.

<p><b>Mal del talluelo (<i>Rhizoctonia solani</i>)</b></p> <p>El principal síntoma es la presencia de un estrangulamiento a nivel del cuello de la plantita afectada, debido a la pudrición de la corteza provocada por el desarrollo del micelio del hongo en el interior de los tejidos</p>	
<p><b>Mal de hilachas (<i>Pellicularia koleroga</i>)</b></p> <p>Los primeros estados de desarrollo del hongo, el micelio es blanquecino, oscureciéndose con el transcurso del tiempo hasta llegar a ser casi negro. De esta manera, permanece dentro de la corteza de las ramas de una época lluviosa a otra.</p>	
<p><b>Ojo de gallo (<i>Mycena citricolor</i>)</b></p> <p>Se presentan en forma de pequeñas manchas circulares o ligeramente ovaladas, distribuidas irregularmente en todas las hojas afectadas, son de color pardo y luego en un estado más avanzado de su desarrollo se tornan gris ceniza.</p>	
<p><b>Mancha de hierro (<i>Cercospora coffeicola</i>)</b></p> <p>Las hojas afectadas por la enfermedad presentan manchas circulares de color marrón rojizo o pardo, con anillos concéntricos. Estas se van tornando grises o blanquecinas hacia el centro, a medida que va envejeciendo la lesión.</p>	

<p><b>Muerte descendente (<i>Phoma sp.</i>)</b></p> <p>En la hoja aparecen manchas irregulares de color café oscuro, localizadas al margen o en las puntas.</p>	
<p><b>Viruela o Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)</b></p> <p>Presenta manchas necróticas en las hojas, posteriormente, las lesiones se tornan color verde oliva de un diámetro aproximado de 1 mm.</p>	
<p><b>Mal de machete (<i>Ceratogystis fimbriata</i>)</b></p> <p>Presentan lesiones necróticas a nivel de cuello de color pardo oscuro, a partir del punto de penetración o cerca de heridas o desgarraduras del tronco</p>	
<p><b>Roya anaranjada (<i>Hemileia vastatrix</i>)</b></p> <p>Se caracterizan por la presencia de pequeñas manchas redondas cloróticas y translúcidas de aproximadamente 1-2 mm de diámetro, localizadas en el envés de las hojas.</p>	

**Fuente:** Elaboración propia basado en (INIAP, 1993)

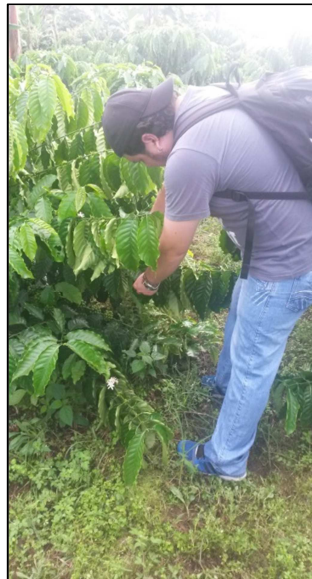
### ANEXO 3

## FOTOGRAFÍAS DE LA PRÁCTICA



**Fotografía 1.** Observación en campo del cultivo de café (*Coffea arabica* L.) en el sector Los Laureles, cantón La Mana, provincia de Cotopaxi

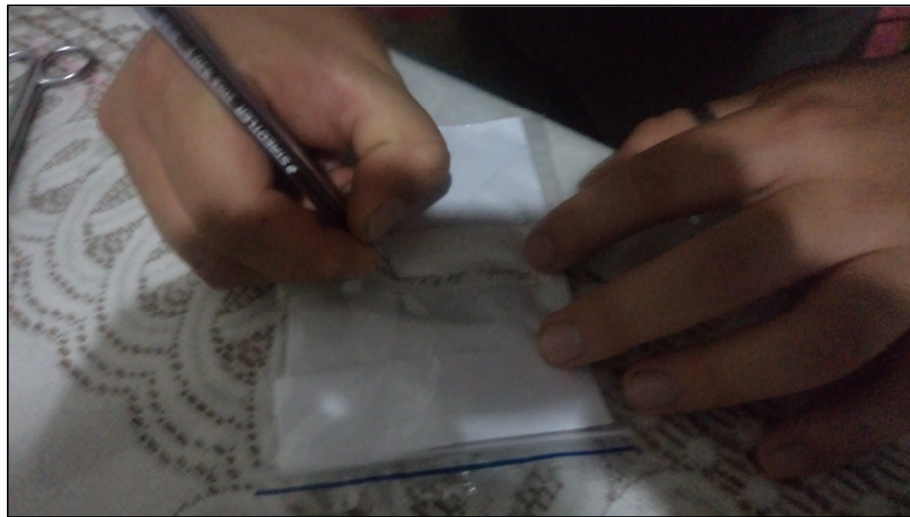
**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 2.** Identificación del hongo fitopatógeno Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)



**Fotografía 3.** Selección de muestras, empaquetado y rotulación de muestras.



**Fotografía 4.** Rotulación de la muestra.

## ANEXO 4

### EQUIPOS UTILIZADOS



**Fotografía 5.** Autoclave.

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 6.** Incubadora.

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 7.** Cámara de flujo laminar.

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 8.** Microscopio acoplado con cámara INFINITY.

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 9.** Refrigerador.

**Fuente:** Pacheco Wilson

**ANEXO 5**  
**TRABAJO EN LABORATORIO**  
**INOCULACIÓN, ROTULACIÓN, E INCUBACIÓN**



**Fotografía 10.** Inoculación de *Mycena citricolor*, en cajas petri con PDA esterilizadas, utilizando una aza de barrido.



**Fotografía 11.** Sellado de las caja petri con parafilm

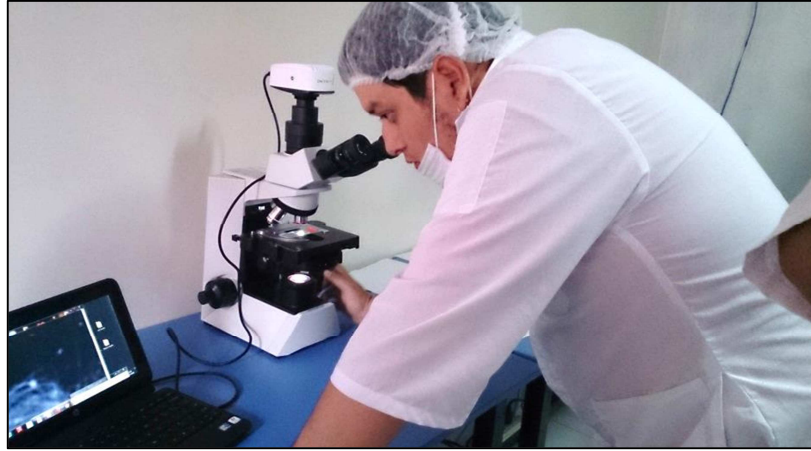


**Fotografía 12.** Etiquetado de las caja petri.

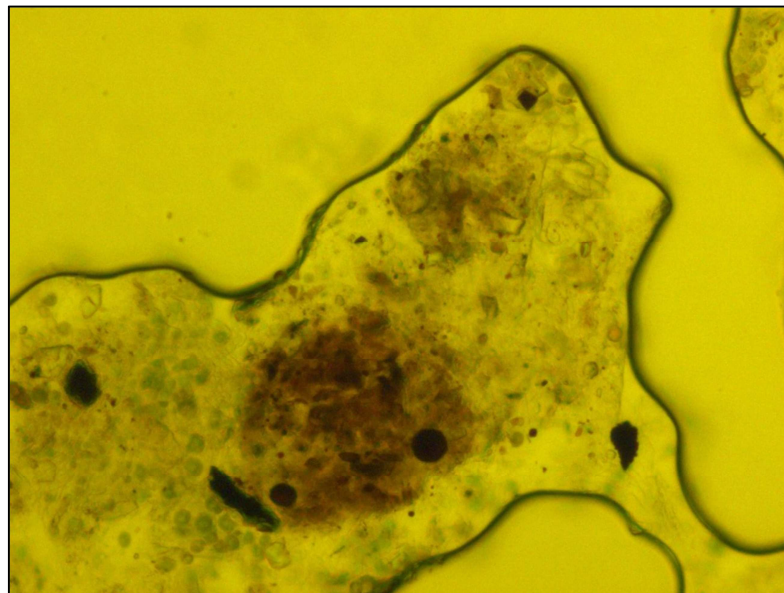


**Fotografía 13.** Programación de la incubadora.

## PRÁCTICAS EN EL MICROSCOPIO

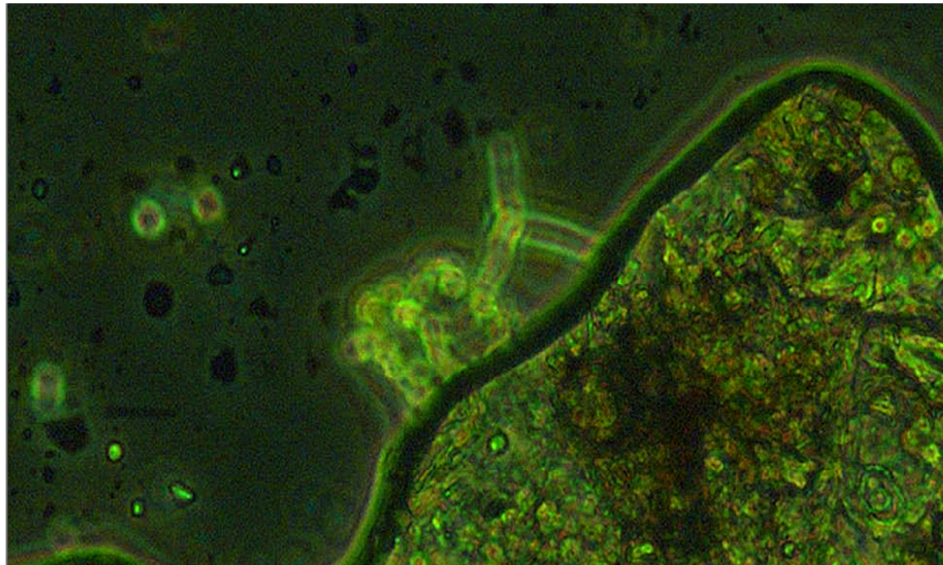


**Fotografía 14.** Observación en el microscopio de las micro estructuras de *Mycena citricolor* utilizando el programa LUMENERA INFINITY CAPTURE.



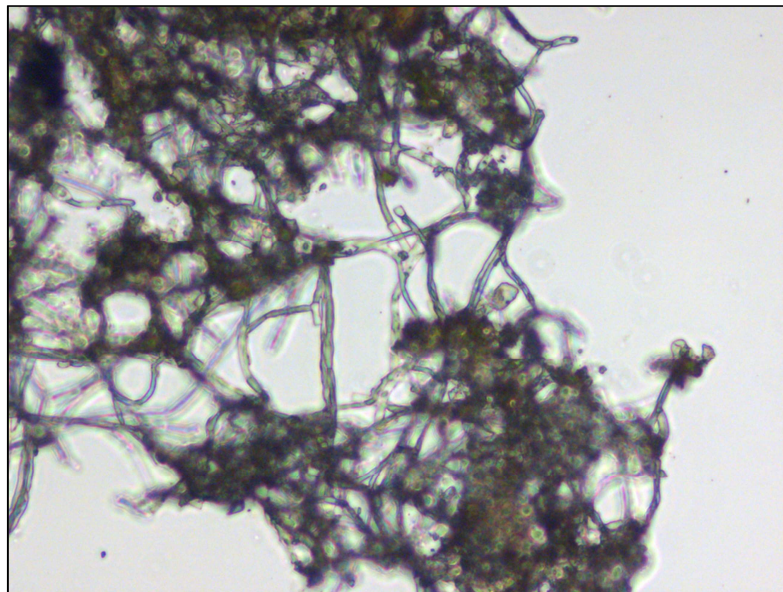
**Fotografía 15.** Muestra obtenida de una hoja de café con Ojo de Gallo (*Mycena citricolor*) observada con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 16.** Presencia de hifas en la muestra recolectada. Observada con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 17.** Micelio y tubos germinativos de esporas observadas con un lente de 20x.

**Fuente:** Pacheco Wilson



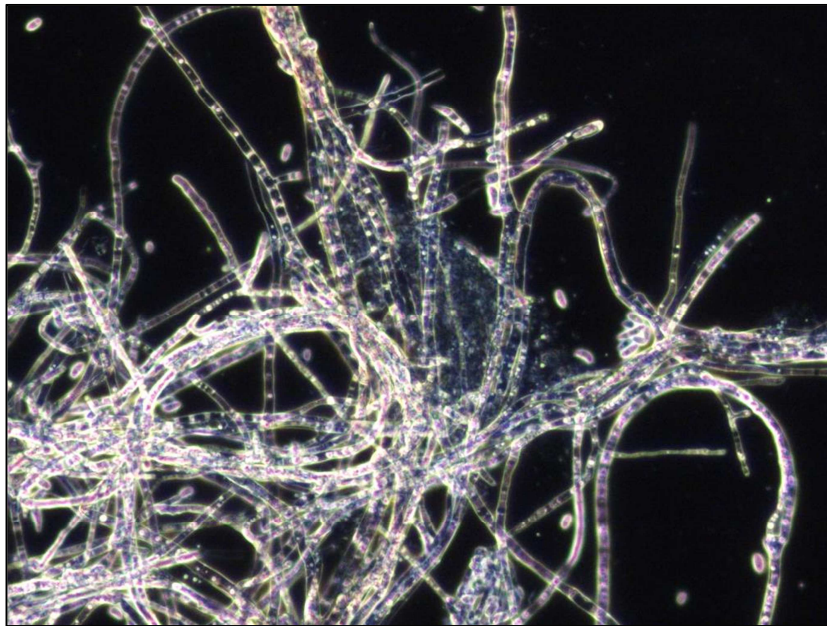
**Fotografía 18.** Formación de primeras hifas observadas con lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



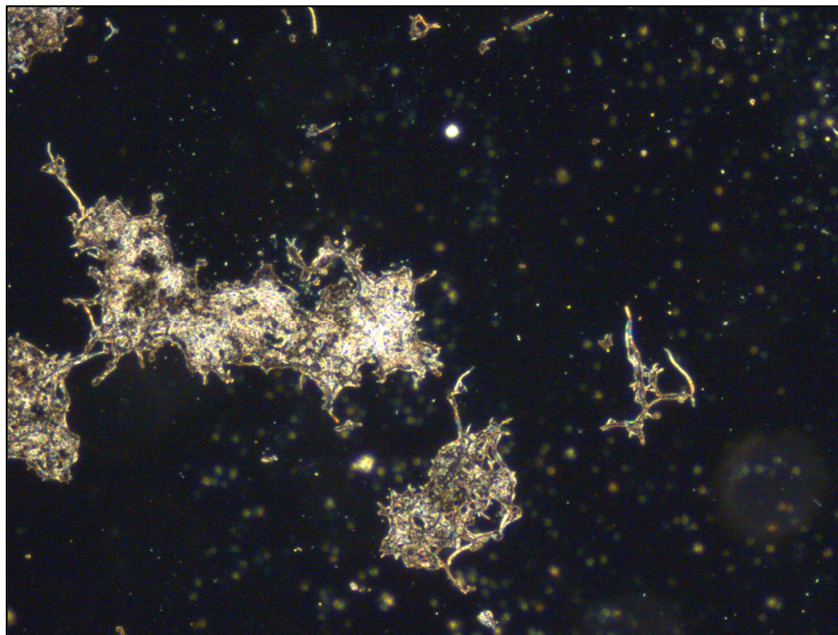
**Fotografía 19.** Formación de micelio joven observadas con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



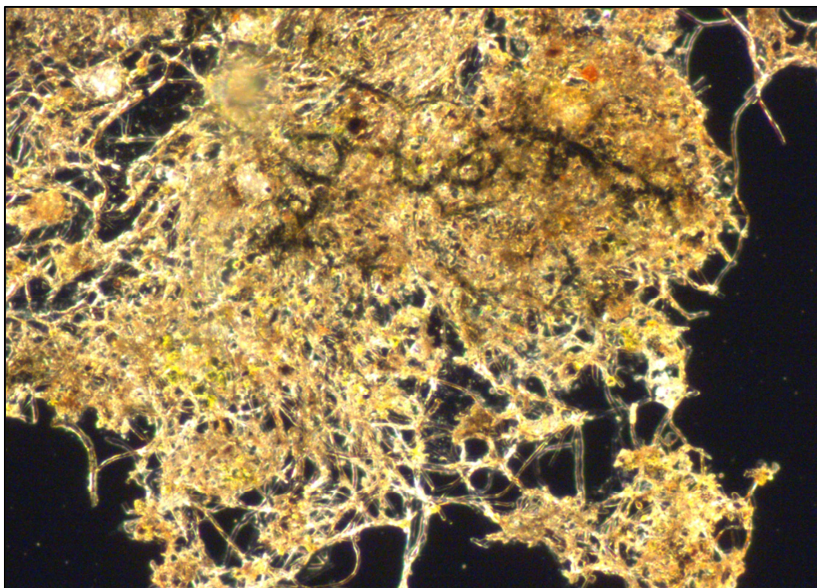
**Fotografía 20.** Hifas septadas observadas con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



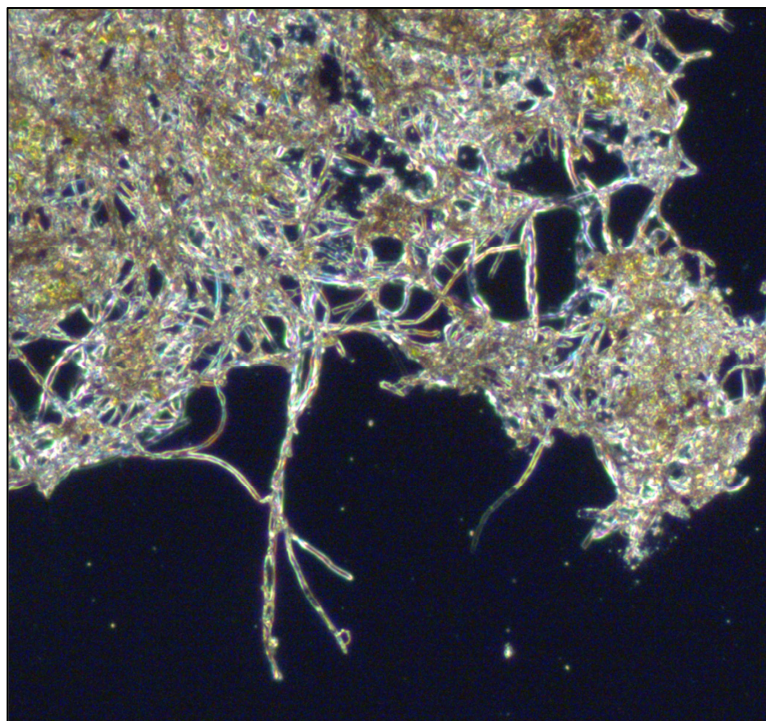
**Fotografía 21.** Crecimiento de micelio observado con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



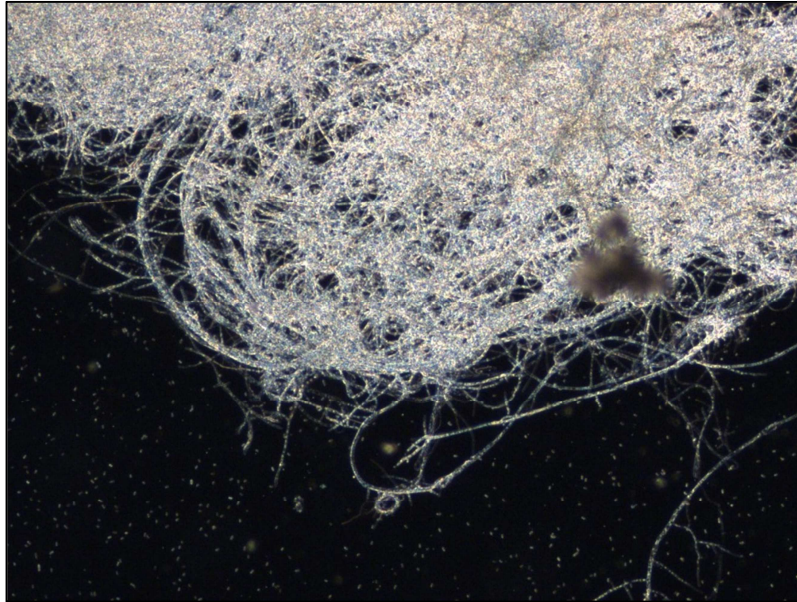
**Fotografía 22.** Micelio observado con un lente de 10 x

**Fuente:** Pacheco Wilson



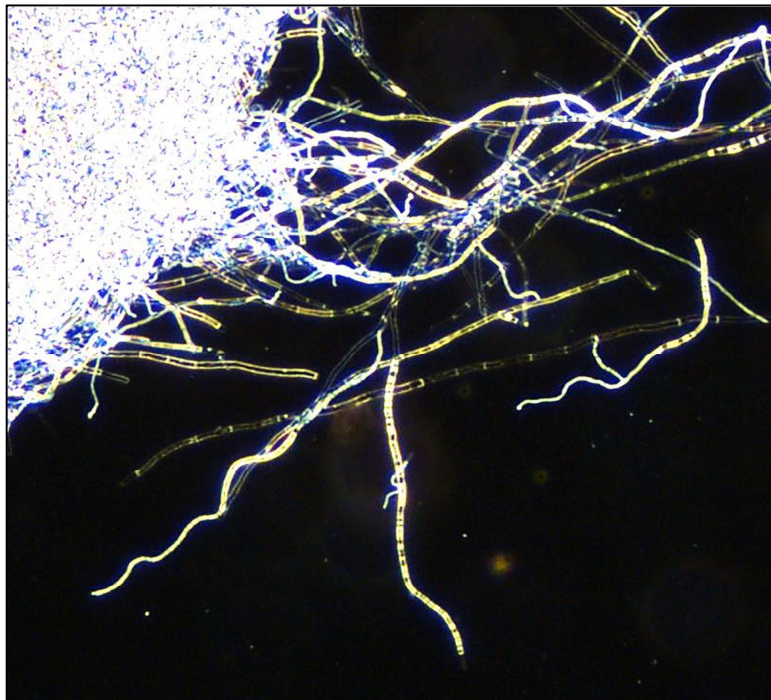
**Fotografía 23.** Micelio observado con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



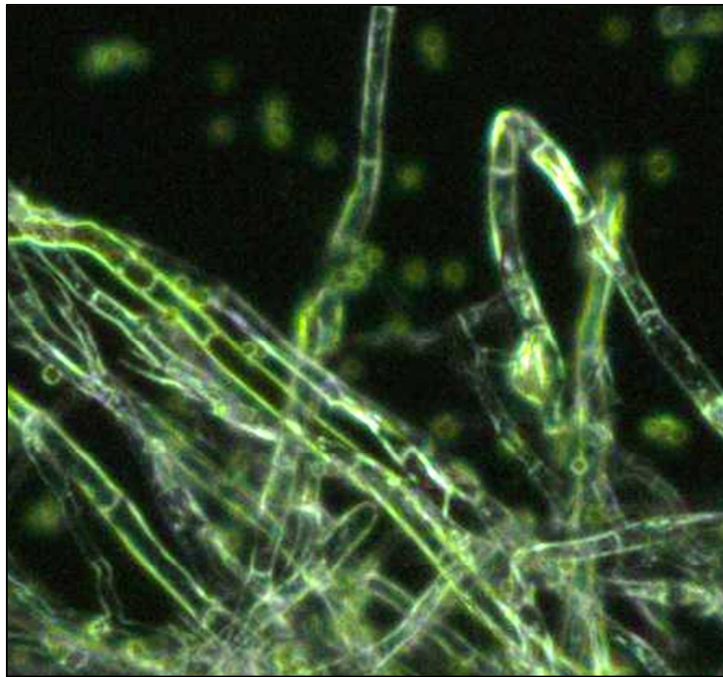
**Fotografía 24.** Micelio observado con un lente de 4x

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 25.** Hifas septadas de diferente dimensiones observadas con un lente de 4x

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 26.** Hifas tabicadas con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



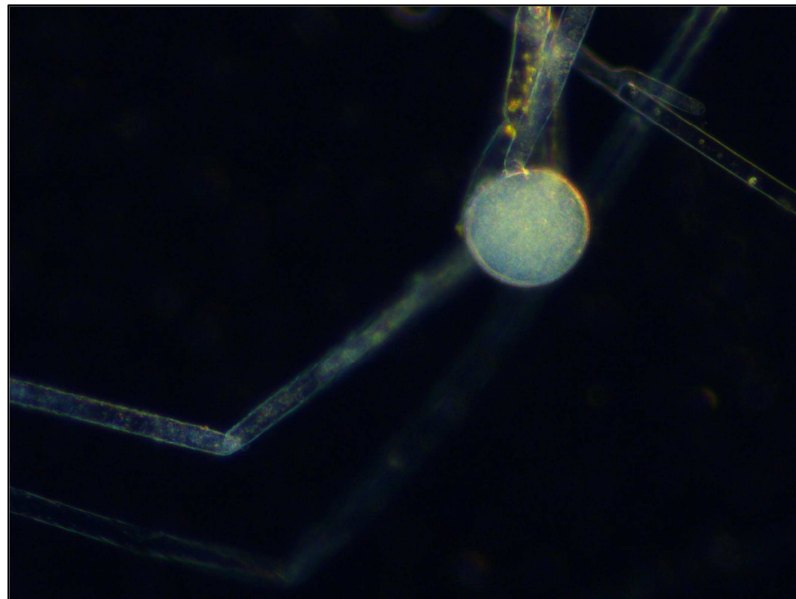
**Fotografía 27.** Crecimiento de esporangióforo y formación de la columela observada con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



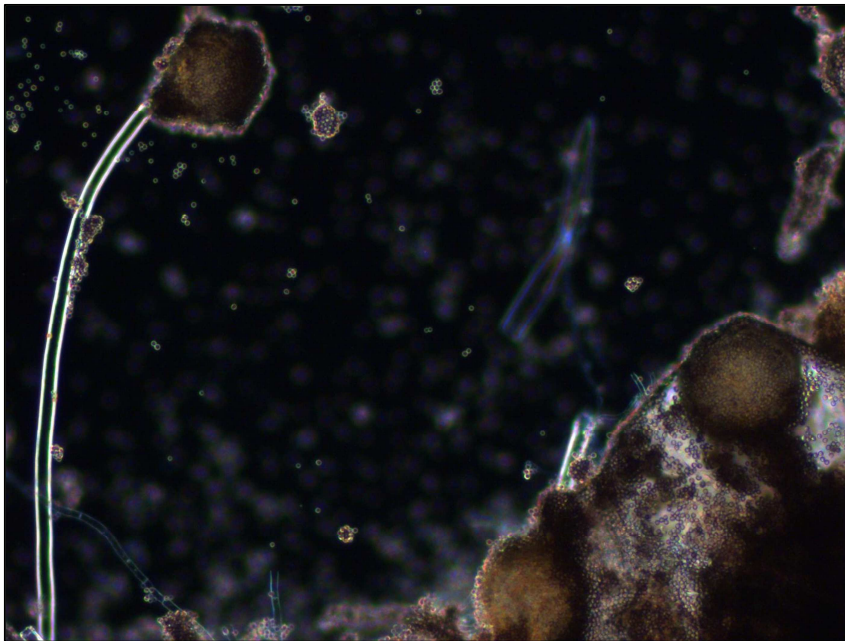
**Fotografía 28.** Formación del esporangio observado con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



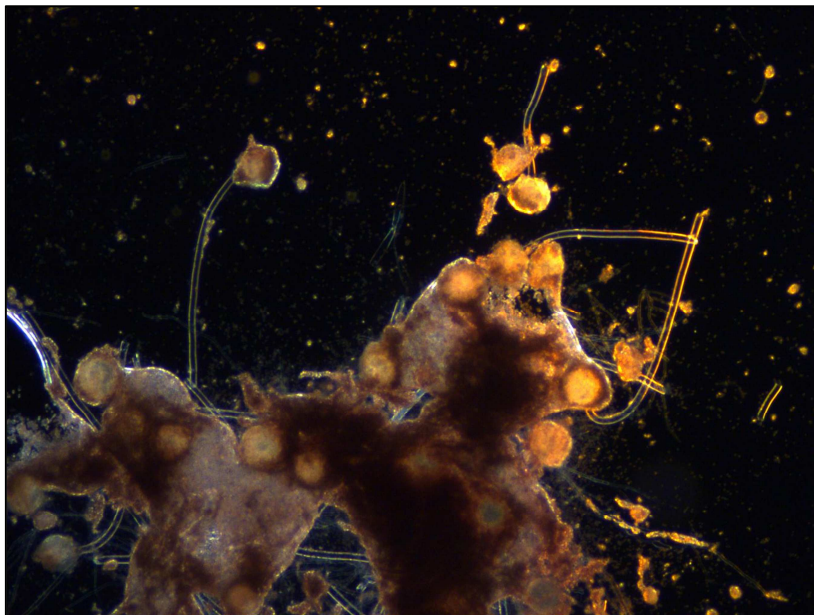
**Fotografía 29.** Madurez del esporangio observado con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



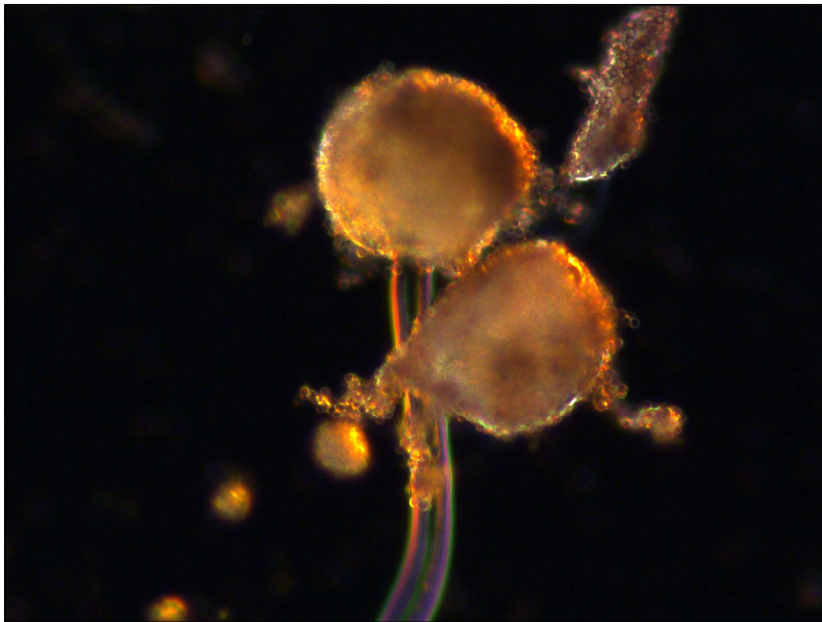
**Fotografía 30.** Estructuras del hongo observado con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



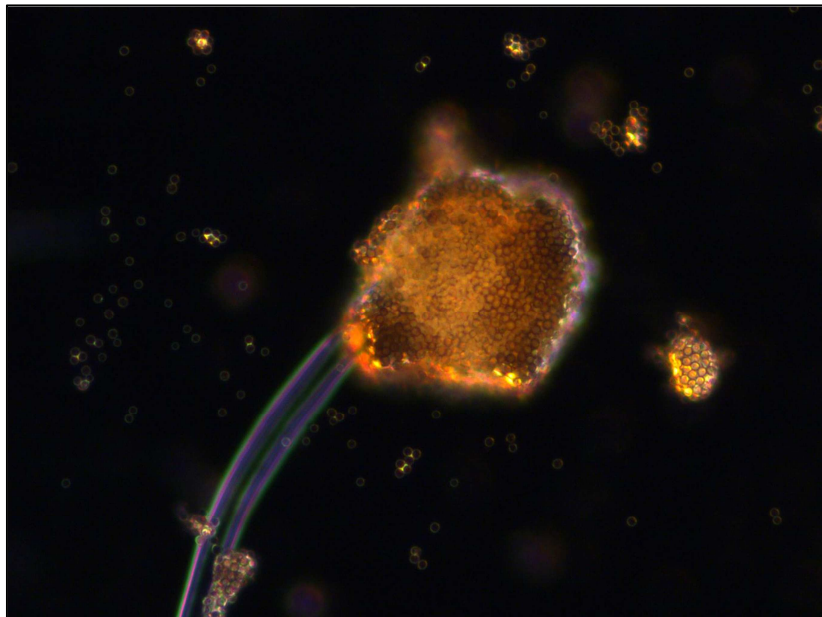
**Fotografía 31.** Estructuras del hongo observado con un lente de 10x

**Fuente:** Pacheco Wilson



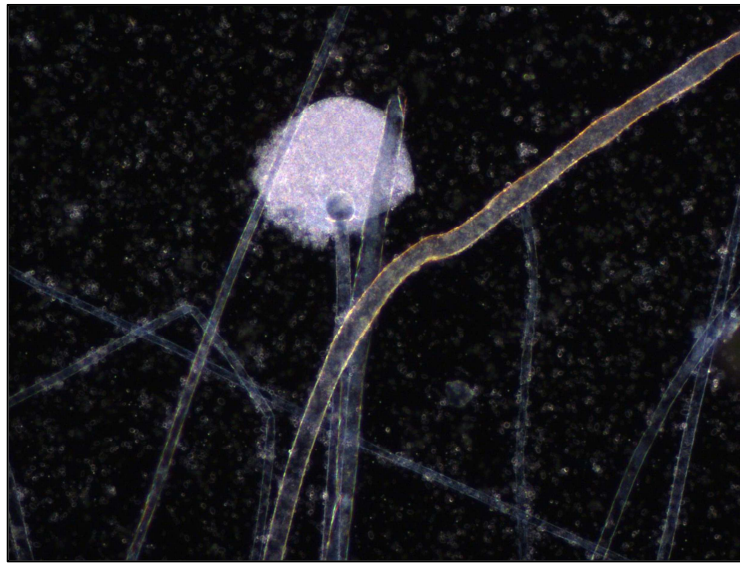
**Fotografía 32.** Estructuras del hongo observado con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



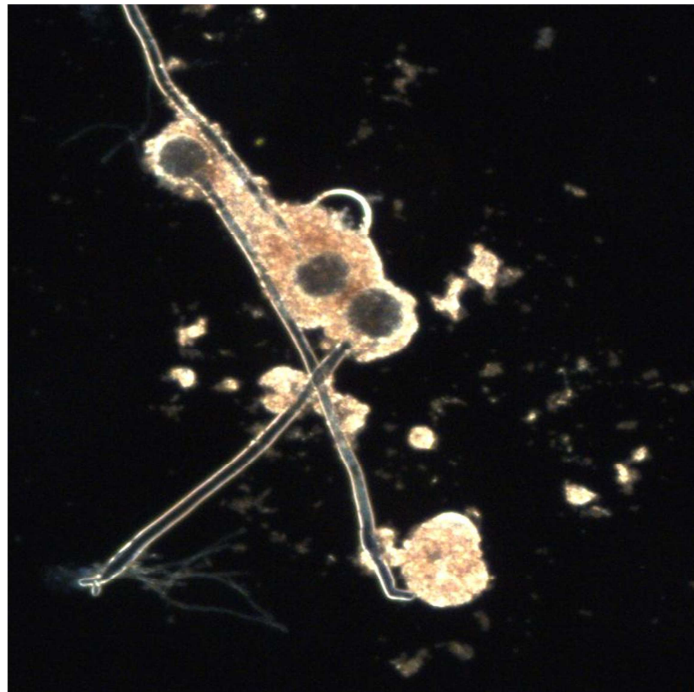
**Fotografía 33.** Estructuras del hongo observado con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



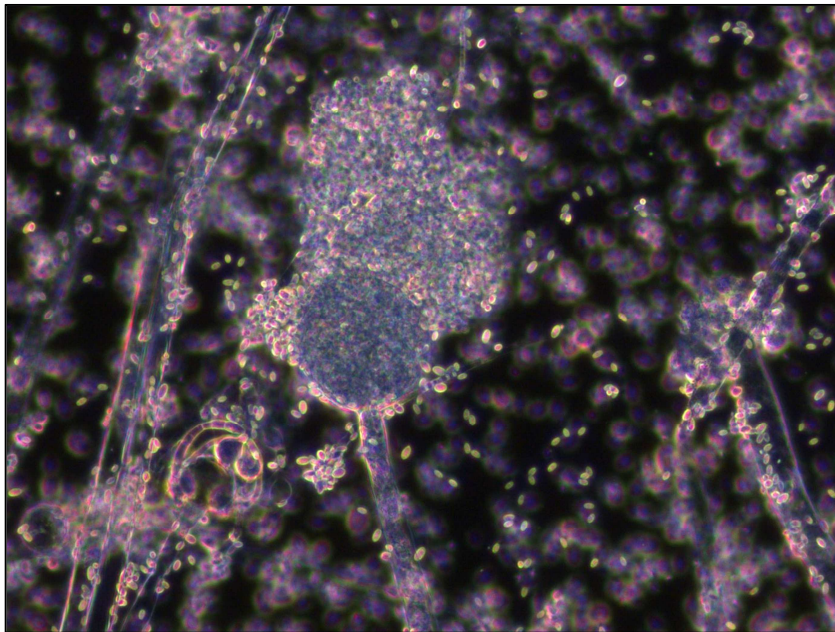
**Fotografía 34.** Esporangio en su madures máxima observado con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



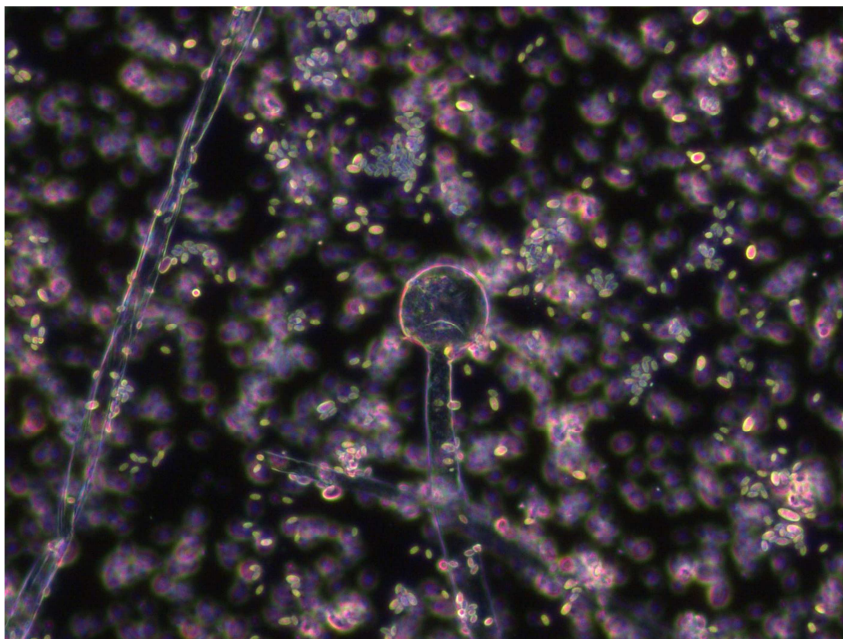
**Fotografía 35.** Debilitamiento del esporangio observado con un lente de 4x

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 36.** Rompimiento del esporagio observado con un lente de 20x

**Fuente:** Pacheco Wilson



**Fotografía 37.** Esporangiósporas liberadas observadas con un lente de 4x

**Fuente:** Pacheco Wilson

## ANEXO 6

### COSTOS

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

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