

MANUAL DE PRÁCTICAS

FITOPATOLOGÍA (AEJ-1028)

Programa Académico de Ingeniería en Agronomía

Profesor: MC. Pablo Santiago Sánchez Azcorra



Juan Sarabia, Quintana Roo

DICIEMBRE 2018



DIRECTORIO

Secretario de Educación Pública

Subsecretario de educación Superior e Investigación Tecnológica

Director General del Tecnológico Nacional de México

Coordinador Sectorial Académico

Coordinador Sectorial de Planeación y Desarrollo del Sistema

Coordinador Sectorial de Administración y Finanzas

Coordinador Sectorial de Promoción de la Calidad

MC. Carlos Tiburcio Martínez Martínez

Encargado del Despacho de la Dirección del T Zona Maya

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
PRÁCTICA 1. COLECTA DE MATERIAL.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. COMPETENCIA ESPECÍFICA.....	1
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	1
3.1. Materiales.....	1
3.1.1 Preparación de soluciones fijadoras.....	2
3.2. Metodología.....	2
3.3 Cuestionario de colecta.....	3
3.4 Datos del laboratorio.....	4
3.5 Usos del material colectado.....	4
4. CUESTIONARIO.....	4
5. BIBLIOGRAFÍA.....	5

PRÁCTICA 2. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1 Aislamiento.....	6
1.2 Medios de cultivo.....	7
1.2.1 Clasificación de los medios de cultivo.....	7
1.2.1.1 Composición.....	7
1.2.1.2 Consistencia.....	7
2. COMPETENCIA ESPECÍFICA.....	8
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
3.1. Materiales.....	8
3.2. Metodología.....	8
3.2.1 Preparación de los medios de cultivo.....	8
3.3.2 Vaciado del medio de cultivo a cajas de Petri.....	9
3.4 Aislamiento.....	9
3.4.1 Técnica de aislamiento de dilución en serie.....	9
3.4.2 Técnica de aislamiento de dilución en serie.....	10
4. CUESTIONARIO.....	10
5. BIBLIOGRAFÍA.....	10
 PRÁCTICA 3. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS.....	 12

1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. COMPETENCIA ESPECÍFICA.....	12
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
3.1. Materiales.....	12
3.2. Metodología.....	13
3.2.1 Técnica para realizar preparaciones temporales.....	13
3.2.2 Tinción de Gram.....	13
3.2.3 Tinción de flagelos de bacterias.....	13
3.2.3 Tinción de productos de excreción y cápsula de bacterias..	14
4. CUESTIONARIO.....	14
5. BIBLIOGRAFÍA.....	14
PRÁCTICA 4. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS.....	16
1. INTRODUCCIÓN.....	16
2. COMPETENCIA ESPECÍFICA.....	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1. Materiales.....	17
3.2. Metodología.....	17
3.2.1 Preparaciones temporales	17
3.2.2 Preparaciones permanentes	17
4. CUESTIONARIO.....	17
5. BIBLIOGRAFÍA.....	18

PRÁCTICA 5. IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS.....	19
1. INTRODUCCIÓN.....	19
2. COMPETENCIA ESPECÍFICA.....	19
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1. Materiales.....	19
3.2. Metodología.....	20
3.2.1 Extracción de nematodos por el método de tamizado-centrifugado.....	20
4. CUESTIONARIO.....	21
5. BIBLIOGRAFÍA.....	21
PRÁCTICA 6. IDENTIFICACIÓN DE SÍNTOMAS EN PLANTAS ENFERMAS.....	23
1. INTRODUCCIÓN.....	23
2. COMPETENCIA ESPECÍFICA.....	23
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
3.1 Materiales.....	24
3.2 Metodología.....	24
3.3. Clave de identificación de síntomas y signos.....	24
4. CUESTIONARIO.....	27

CUESTIONARIO.....			
5. BIBLIOGRAFÍA.....			27
PRÁCTICA BIOLÓGICO.....	7.	CONTROL	29
1. INTRODUCCIÓN.....			29
2. ESPECÍFICA.....		COMPETENCIA	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....			29
3.1 Materiales.....			29
3.2 Metodología.....			30
4. CUESTIONARIO.....			30
5. BIBLIOGRAFÍA.....			30



ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clave para la identificación de síntomas y signos..	24
Cuadro 2. Escala de clases para evaluar el grado de antagonismo de una especie	30





PRÁCTICA 1

COLECTA DE MATERIAL

1. INTRODUCCIÓN

El diagnóstico de las enfermedades de las plantas se refiere a la determinación oportuna del agente causal de una enfermedad, y es fundamental para el manejo del problema siendo una de las bases indispensables para lograr un control eficaz, permite la optimización de los recursos, la reducción de los efectos negativos en el medio ambiente y a la vez origina información respecto a la interacción patógeno hospedante. Un requisito previo para el control de cualquier enfermedad es la detección e identificación apropiada del organismo causal. La detección de patógenos en plantas con síntomas puede ser relativamente simple basándose en la experiencia y en las particularidades de los patógenos que los hacen inconfundibles, pero hay muchas otras que se confunden, y entonces el diagnóstico se complica, teniendo que realizar las siguientes actividades: colecta, aislamiento, identificación del patógeno, inoculación, reisolamiento y reidentificación.

La colecta del material enfermo es de suma importancia, puesto que de esto dependerá el que se puedan realizar las técnicas conducentes a una identificación acertada del patógeno en cuestión e inicia con una observación de alteraciones en nuestro cultivo, y será más precisa si el que la realiza ha examinado de manera personal la enfermedad en el campo. Un observador cuidadoso puede obtener datos valiosos que faciliten todo el proceso. Es importante notar la presencia de focos de infección inicial, a partir de los cuales se extiende la enfermedad, debido a que esa información da idea del patrón de disseminación y de la fuente de inóculo primario.

2. COMPETENCIA ESPECÍFICA

Manejar las técnicas más comunes de colecta y preservación de material de estudio fitopatológico para Identificar el agente causal de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Pala recta, tijeras de podas, serrucho, cámara fotográfica, etiquetas, papel secante, navaja de campo, lupa de campo, bolsas de papel secante, prensa botánica, periódico y cartón corrugado, libreta de campo, hielera portátil, ligas, engrapadora, frascos, soluciones fijadoras, cuestionario de colecta.

3.1.1 Preparación de soluciones fijadoras

F.A.A.

Formol al 40 %	10 mL
Ácido acético glacial	10 mL
Alcohol al 50 %	100 mL

SOLUCIÓN DE HESLER

Agua destilada	1000 mL
Cloruro de Zinc	50 mL
Formalina	25 mL
Glicerina	25 mL

3.2. Metodología

Los problemas fitopatológicos se pueden presentar en hojas, raíces, tallos, etc. y se detectan cuando las plantas crecen de modo anormal, se secan o se mueren, disminución de la cosecha, alteraciones en el crecimiento, decoloraciones, sobrepigmentaciones, manchas, rayados, pudriciones, marchitamientos, etc. Es conveniente disponer del mayor número de elementos vegetales colectados que permitan lograr la identificación del agente causal.

Las partes vegetales que deben colectarse dependen del tipo de cultivo que se trate: Para partes vegetales carnosas, como frutos y bulbos, se deben coleccionar en frascos con soluciones fijadoras. En el caso de que la planta presente nodulaciones en la raíz, es muy probable que se trate de infestaciones de nematodos, por lo que se deben tomar muestras del suelo que hayan estado en contacto con la raíz. En el

caso de que las plantas sean pequeñas, se debe sacar la planta entera y, sin sacudir el suelo de las raíces, se debe meter en una bolsa de plástico junto con aproximadamente 250 gr de suelo y cerrarla con una liga para evitar que los nematodos mueran. Las bolsas no deben exponerse al sol.

Es indispensable que todos los ejemplares que se colecten, se acompañen de la mayor cantidad de datos posibles, que se anotarán en la libreta de campo.

El material coleccionado puede emplearse para realizar aislamientos del agente causal, en cuyo caso se puede pensar o conservarse en refrigeración, o bien, como material de herbario, empleándose el prensado o la preservación en fijadores como el alcohol al 70 %, el F.A.A. o la solución de Hesler.

El material de herbario se debe montar en cartulinas blancas de 30 x 40 cm, siguiendo las técnicas de herbario acostumbradas. Todo material preservado debe llevar su etiqueta correspondiente.

3.3 Cuestionario de colecta

Es indispensable que todos los ejemplares que se colecten, vayan acompañados con los siguientes datos:

1. Datos generales

Muestra No. _____ Variedad _____
Localidad _____ Edad del cultivo _____
Fecha _____ Cultivos anteriores _____
Cultivo (hospedero) _____ Predio _____

2. Apariencia general del cultivo

Marchitez _____ Tizones _____
Amarillamiento _____ Desarrollo anormal _____
Áreas muertas _____ Otros _____
Manchas foliares _____

3. Partes atacadas de las plantas

Raíz _____ Brotes o tallos _____
Hojas _____ Flores _____
Frutos _____

4. Distribución de la enfermedad

Plantas aisladas _____ Manchones o grupos de plantas _____
Áreas grandes _____ Áreas pequeñas _____
Bandas o franjas _____ Bordos de cultivo _____

5. Condiciones prevalcientes durante la aparición de los primeros síntomas y el desarrollo de la enfermedad

Precipitación _____ Humedad relativa _____
Vientos _____ Heladas _____
Granizo _____ Otros _____

6. Labores culturales

Frecuencia de riego _____ Fertilizaciones _____
Incorporación de materia orgánica _____ Aclareos _____
Podas _____ Otros _____

7. Químicos aplicados al cultivo (concentraciones y dosis)

Fertilizantes _____ Fungicidas _____
Herbicidas _____ Insecticidas _____
Defoliantes _____ Otros _____

8. Características del suelo

Drenaje _____ Textura _____
pH _____ Otros _____

3.4 Datos del laboratorio

Datos del laboratorio que nos ayudarán al diagnóstico de la enfermedad y a la identificación del agente causal.

- a) Características de las lesiones.
- b) Presencia de esporas, micelio, cuerpos fructíferos o cualquier estructura (hacer esquemas).
- c) Exudaciones (color, consistencia etc.)
- d) Presencia de insectos o ácaros.
- e) Evidencia de daños mecánicos.

3.5 Usos del material colectado

El material colectado puede emplearse para:

- a) Realizar aislamientos del agente causal. En este caso se puede prensar o preservarse en refrigeración.
- b) Como material de herbario, empleándose el prensado, o bien la preservación en fijadores como alcohol al 70 %, F.A.A. o solución de Hesler. En el primer caso los ejemplares deben ser montados en cartulinas blancas de 25 x 45 cm., siguiendo las técnicas de herbario acostumbradas. Todo el material preservado debe llevar su etiqueta correspondiente.

4. CUESTIONARIO

1. ¿Qué es el diagnóstico de las enfermedades?
2. ¿Por qué es indispensable llevar a cabo un diagnóstico?
3. ¿En cuáles casos es fácil diagnosticar una enfermedad?
4. ¿Qué es una colecta?
5. ¿Por qué y cuándo se debe realizar una colecta?
6. ¿Qué observaciones se deben hacer en el campo?
7. ¿Cómo se detectan los problemas fitopatológicos?
8. ¿Qué es una solución fijadora?

5. BIBLIOGRAFÍA

Echandi, E. 1975. Manual de Laboratorio de Fitopatología General. Herrero Hnos. México.

Dhingra, O. D., and Sinclair J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. 355 pp.

González, L.C. 1977. Introducción a la Fitopatología. I.I.C.A. San José de Costa Rica.

López A.G. 1978. Técnicas de uso común en el manejo de Hongos fitopatógenos. Tesis. E.N.A. Méx.

Narayanasamy, P. 2001. Plant pathogen detection and diseases diagnosis. Marcel Dekker Inc. 518 pp.

Roberts, G. y C. Boothroyd. 1972. Fundamentos de Patología Vegetal. Acribia. Zaragoza.

Tuite, J. 1964. Plant Pathological Methods, Fungi and Bacteria. Burges Pobl. Co. Minneapolis.

Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S., 2004, Plant pathology, Concepts and Laboratory. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washinton, D.C., 413 pp.

PRÁCTICA 2

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y TÉCNICAS DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

1. INTRODUCCIÓN

En el diagnóstico de las enfermedades vegetales, el trabajo de laboratorio es de suma importancia debido a que ahí se efectúa la identificación del agente causal, lo que posibilita la aplicación de los métodos de control más adecuados.

El proceso de identificación de un patógeno requiere el aislamiento del mismo, para lo que es necesaria la elaboración de medios de cultivo que permitan el desarrollo de dicho patógeno.

Una identificación científica debe realizarse según los Postulados de Koch, que revisten una importancia dentro de la Fitopatología, y deben seguirse siempre que se está frente a una enfermedad de la que se desconozca o se dude del agente causal. Los Postulados de Koch son los siguientes:

1. El organismo o agente causal debe estar constantemente asociados con la enfermedad.
2. El organismo debe ser aislado y cultivado en cultivo puro (identificación).
3. Al inocular una planta susceptible sana, debe desarrollarse la enfermedad original.
4. El organismo patógeno debe ser aislado de la planta infectada bajo condiciones experimentales (reidentificación).

1.1 Aislamiento

En la naturaleza abundan los microorganismos que se desarrollan estrechamente relacionados entre sí, de manera que encontramos bacterias, hongos y otros organismos de muy diversos tipos, tanto de vida libre como parásitos. Para poder estudiarlos y conocerlos se deben cultivar en medios adecuados aislándolos del suelo o de partes vegetales enfermas. A partir de la primera muestra que se coloca en un medio de cultivo, se obtiene un cultivo mixto del que se deben tomar nuevas muestras para realizar otros cultivos, seleccionando las diferentes colonias hasta

lograr que en el medio se desarrolle un solo tipo de organismo, consiguiendo de esta forma un cultivo puro.

Para realizar aislamientos a partir del suelo, existen diversas técnicas como la de placa directa y la de dilución en serie. En el caso de que el patógeno se encuentre en las partes vegetales, se puede proceder a realizar aislamientos directos, utilizar cámaras húmedas, colocar partes vegetales en el medio de cultivo a través de trampas, etc.

1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo son mezclas de sustancias nutritivas que se utilizan para el aislamiento, determinación, desarrollo, reproducción e identificación de aquellos organismos productores de enfermedades de las plantas, que se comportan como parásitos facultativos. Para lograr el desarrollo y reproducción de las diferentes especies fitopatógenas, los medios de cultivo deben reunir características especiales, tomando en cuenta los factores que se mencionan a continuación:

Nutrientes. En el medio de cultivo deberán estar presentes elementos nutricionales tales como fuentes de carbono, nitrógeno, macroelementos (P, K, Mg, Ca), microelementos (Fe, Zn, Mn, Cu, Mo), vitaminas, etc.

Humedad. Deberá proporcionarse una humedad relativa favorable a los fitopatógenos que se desee cultivar. Por lo general requieren del 50 % o más.

Temperatura. Los valores óptimos de ésta son muy variables para cada especie, pero la mayoría de ellas pueden crecer en un rango de 20 a 25 °C. Este es un factor determinante para el desarrollo y la reproducción.

pH. También en este caso los valores óptimos son muy variables, pero en general los hongos fitopatógenos se desarrollan y reproducen mejor en pH ligeramente ácidos, mientras que las bacterias prefieren los ligeramente alcalinos.

Luz. Este factor en algunos casos afecta la reproducción de los hongos fitopatógenos, pero en general no influye.

Asepsia. Los medios de cultivo deben esterilizarse y mantenerse a salvo de cualquier contaminación por otros microorganismos.

1.2.1 Clasificación de los medios de cultivo

Los medios de cultivo pueden ordenarse de acuerdo con su composición o a su consistencia, quedando de la siguiente manera:

1.2.1.1 Composición

Medios de cultivo sintéticos. Son aquellos medios de cultivo en los que se conoce con exactitud la composición de cada uno de sus componentes, por ejemplo, agar y Czapek.

Medios de cultivo complejos o semisintéticos. En estos la composición de uno de sus elementos no se conoce de manera exacta, o bien, se integran de sustancias naturales y sustancias sintéticas, por ejemplo PDA (papa-dextrosa-agar).

Medios de cultivo naturales. Se forman a partir de material vegetal natural, por ejemplo: hojas, tallos, vainas, tubérculos, raíces, etc.

1.2.1.2 Consistencia

Entre los medios de cultivo de uso frecuente en Fitopatología están los siguientes:

Medios sólidos. Contienen esencialmente agar, gelatina, albúmina, etc., materiales que al enfriarse quedan sólidos por completo. Son muy empleados para el aislamiento y la reproducción de hongos y bacterias.

Medios semisólidos. Contienen bajas proporciones de agar y gelatina mezclados o separados; al enfriarse permanecen en estado coloidal. Se emplean para mantener cultivos por largo tiempo.

Medios líquidos. Son preparados sin agar, gelatina u otras sustancias solidificantes, por lo que permanecen líquidos aun al enfriarse. Se emplean cuando se necesita incrementar el inóculo de hongos o bacterias.

Entre los medios de cultivo de uso frecuente en Fitopatología están los siguientes:

1. PDA (papa-dextrosa-agar)
2. AN (agar nutritivo)
3. HFA (harina de frijol-agar)
4. VM (Ougo Va agar)
5. AVA (avena-agar)
6. TSA (jugo de tomate-sal-agar)
10. HMA (harina de maíz-agar)
11. JFA (jugo de frijol-agar)
12. JTA (jugo de tomate-agar)
13. MSA (malta-sal-agar)
14. BA (Bonner Addoat)
15. BK (medio B de King)

7. MM (medio de Martin)
8. VFA (vainas de frijol-agar)
9. AA (agua-agar)

2. COMPETENCIA ESPECÍFICA

Que el alumno aprenda la preparación de medios de cultivo y las técnicas de aislamiento de agentes fitopatógenos más utilizados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Asa microbiológica	Mechero	Balanza granataria
Pinzas de disección	Soporte con anillo	Papa, jugo de tomate, etc.
Agujas de disección	Tela de asbesto	Partes vegetales enfermas
10 cajas de PETRI		

3.2 Metodología

3.2.1 Preparación de los medios de cultivo

Cada equipo elaborará el medio de cultivo que le indique el profesor, de acuerdo con sus necesidades

3.3.2 Vaciado del medio de cultivo a cajas de Petri

Para llenar las cajas de PETRI con el medio de cultivo de una manera aséptica se deben realizar los siguientes pasos:

- Limpiar la mesa con una solución de cloro 5:1 en agua.
- Colocar y encender el mechero o lámpara de alcohol.
- Poner las cajas y recipientes con el medio sobre la mesa.
- Tomar el recipiente con el medio de cultivo y destapando con la mano izquierda, pasar la boca del recipiente sobre la llama del mechero. Conservar el tapón en la misma mano con que se sostiene el recipiente del medio.

- Tomar con la mano derecha una caja de PETRI y levantar la tapa lo suficiente para verter el medio de cultivo. Vaciar en cada una de 10 a 12 mL.
- Colocar la tapa de la caja de PETRI suavemente, y tapar el recipiente del medio de cultivo.
- Distribuir de manera uniforme el medio con movimientos de rotación.
- Colocar las cajas en una superficie horizontal y dejar solidificar.
- Una vez solidificado el medio, realizar pruebas de esterilidad por incubación a 35 °C durante 48 hr.

3.4 Aislamiento

Todos los aislamientos deben hacerse en un medio estéril, es decir, a la flama del mechero, para evitar contaminaciones. Existen varias técnicas de aislamiento. El aislamiento que se va a llevar a cabo es el que utiliza las partes vegetales enfermas, con sus tres variantes.

Aislamiento a partir de partes vegetales enfermas

3.4.1 Técnica de aislamiento de dilución en serie

Aislamiento directo. Si se observan las fructificaciones o el micelio en el ejemplar enfermo, se toma una muestra de este material con una aguja de disección estéril y se coloca en directo sobre el medio de cultivo. Se incuba a 24 °C y se observan resultados después de 4 a 5 días.

Partes vegetales en medio de cultivo. La porción vegetal que muestra los síntomas se desinfecta con una solución de cloro (NaOCl) y agua destilada estéril 5:1. Se enjuaga con agua destilada estéril y se coloca en cajas de Petri con medio de cultivo. Se incuba a 24 °C y se observan resultados después de cuatro a cinco días.

Cámara húmeda. Cuando las partes vegetales afectadas presentan micelio, pero no hay fructificaciones, o cuando no se aprecia el crecimiento del patógeno, se recurre al uso de la cámara húmeda. Se toma una porción del tejido enfermo y se desinfecta en una solución de cloro (NaOCl) y agua destilada estéril 5:1. Se enjuaga con agua destilada estéril y se coloca en cajas de Petri con un papel filtro en su interior, previamente esterilizadas. Se humedece con agua destilada estéril y se tapa la caja. Se incuba a 24 °C y se observan resultados después de cuatro a cinco días.

3.4.2 Técnica de aislamiento de dilución en serie

1. Se pesa un gramo de suelo y se agrega a un tubo de ensayo con 10 mL de agua destilada estéril.
2. Se agita manualmente durante un minuto.
3. Se toma una alícuota de 1 mL con una pipeta y se agrega a otro tubo que contenga 9 mL de agua destilada estéril agitándose de igual manera durante un minuto.
4. Se repite la operación hasta llegar a la dilución 10⁻⁴.
5. De cada dilución se toma una alícuota de 1 mL y se siembra en placas Petri que contengan medio de cultivo PDA distribuyendo uniformemente.
6. Se sellan con parafilm y se incuban en posición invertida a una temperatura de 26 °C durante siete días.
7. Transcurrido este tiempo, se hace el conteo de las colonias de microorganismos presentes.

4. CUESTIONARIO

1. ¿A qué tipo de medios de cultivo (natural, semisintético o sintético) pertenecen los utilizados en esta práctica? Explique su respuesta.
2. ¿Qué es la esterilización y cuáles son los métodos más frecuentes para esterilizar materiales fitopatológicos?
3. Describa los tipos de colonias que surgieron en los aislamientos a partir del suelo y partes vegetales enfermas.
4. Calcule el número de organismos que surgieron en los aislamientos a partir del suelo por el método de dilución, de la siguiente manera:

En donde

C= Número de colonias

D=Dilución empleada

VI=Volumen inicial

NO= Número de organismos presentes en un MI

5. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier academic Press. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 992 pp. *

Dhingra, O. D., and Sinclair J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. 355 pp.

Echandi, 1975. Op. cit.

French, E.R. y Her. 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. IICA. Costa Rica.

Gaviño, G. C., C. Juárez y H. Figueroa. 1975. Op. cit.

López A.G. 1978. Op. cit.

Narayanasamy, P., 2001, Plant pathogen detection and disease diagnosis. Marcel Dekker Inc., 518 pp.

Schots, A., Dewey, F. M. and Oliver, R., 1994. Modern assay for plant pathogenic fungi. C A B International, 267 pp.

Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S., 2004, Plant pathology, Concepts and Laboratory. CRC Press, Boca Raton, London, New York, Washinton, D.C., 413 pp.

PRÁCTICA 3

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FITOPATÓGENAS

1. INTRODUCCIÓN

En el proceso de diagnóstico de las enfermedades de las plantas, la identificación del agente causal ocupa un lugar preponderante. Las técnicas de identificación particularizan en los agentes bióticos que causan enfermedades, en decir, en los microorganismos fitopatógenos, entre los que encontraremos virus, fitoplasmas, espiroplasmas, bacterias, hongos y nemátodos. Los virus son tan pequeños y requieren de técnicas tan elaboradas para su observación que es imposible llevarla a cabo en un laboratorio como éste. En cambio, es completamente factible observar a las bacterias (y organismos semejantes a ellas), a los hongos y a los nemátodos.

Las bacterias son microorganismos pertenecientes al Reino Procaryotae. Se encuentran distribuidas con amplitud en la naturaleza. Su forma puede ser esférica, de bacilo o de espiral. Se encuentran constituidas con las siguientes estructuras: cápsula de secreción, pared celular, membrana celular y citoplasma, este último conteniendo gránulos de grasa, vacuolas, pigmentos y material genético disperso, es decir, carecen de membrana nuclear (procariontes). Algunas bacterias tienen flagelos y pueden desplazarse en medios líquidos. La pared celular determina la forma de las bacterias y es selectiva, pudiendo contener aminoácidos aromáticos, proteínas, ácidos teitoicos y diferentes azúcares. Dependiendo de la cantidad de éstos, las bacterias pueden teñirse de rojo o de violeta al seguir la técnica de tinción de Gram. Se conocen aproximadamente mil 600 especies de bacterias. La mayoría son saprófitas obligadas y como tales benefician al hombre porque ayudan descomponiendo grandes cantidades de materia orgánica y desechos animales y vegetales.

2. COMPETENCIA ESPECÍFICA

Reconocer las características morfológicas que distinguen a las bacterias en preparaciones temporales y permanentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Portaobjetos	Cristal violeta	Sulfato de cobre
Cubreobjetos	Safranina	Alcohol etílico
Agujas de disección	Agua destilada	Lugol
Cultivos de bacterias		

3.2 Metodología

NOTA: Antes de iniciar los trabajos deberá desinfectar su mesa de trabajo con cloro

3.2.1 Técnica para realizar preparaciones temporales

- Trabaja cerca de la flama. Flamea el asa o la aguja de disección hasta obtener el rojo vivo, para evitar contaminaciones.
- Con el asa o aguja toma una pequeña muestra de bacterias del cultivo, colócala en un portaobjetos limpio con una gota de agua destilada.
- Coloca el cubreobjetos inclinado, evitando que se formen burbujas. Cuando el fluido se extiende por el borde, se deja caer suavemente.
- Observa la preparación al microscopio utilizando diferente objetivos. Siempre debes empezar con el aumento de 10X y avanzar de manera progresiva. Recuerda que con el objetivo de 100X debes agregar una gota de aceite de inmersión sobre la preparación, antes de colocar el lente.
- Si observas bacterias, puedes teñir la preparación, utilizando alguna de las técnicas sugeridas.

3.2.2 Tinción de Gram

- En una gota de agua coloca una pequeña masa de bacterias esparciéndolas a lo largo del portaobjetos. El cultivo debe ser de preferencia de 24 horas.

- Fija la preparación al aire o directamente a la flama.
- Cubre la preparación con cristal violeta durante un minuto y decanta.
- Cubre la preparación con lugol durante un minuto y lava con agua corriente.
- Decolora con alcohol etílico por 30 segundos agitando para una decoloración homogénea. Lava con agua corriente.
- Cubre con safranina durante un minuto y lava con agua corriente.
- Absorbe el agua con papel.
- Observa al microscopio. Si las bacterias tiñen de rojo son Gram (-), y si tiñen de violeta son Gram (+). Esquematiza lo observado.

3.2.3 Tinción de flagelos de bacterias

- Se prepara un frotis y se seca al aire.
- Se añade el mordiente filtrado y se deja de uno a cinco minutos.
- Se lava con agua cuidadosamente.
- Se cubre con cristal violeta se deja actuar dos minutos.
- Se repite el lavado de la misma forma.
- Se seca la preparación al aire.
- Se observa al microscopio con el objetivo de inmersión.

3.2.3 Tinción de productos de excreción y cápsula de bacterias

- Coloque en un portaobjetos una gota de tinta china bacteriológica, agregue una pequeña muestra de bacterias, coloque el cubreobjetos y observe.
- Haga un frotis, séquelo al aire, agregue cristal violeta durante dos minutos. Lave con Sulfato de Cobre al 2 %. Séquelo con papel absorbente. Las cápsulas aparecen en color azul y violeta y los cuerpos bacterianos en azul oscuro.

4. CUESTIONARIO

1. Los primeros sistemas de clasificación se basaban principalmente en el número y distribución de los flagelos. La posición de tales flagelos se indican mediante las siguientes expresiones:

- **Monotrico:** _____
- **Lofotrico:** _____
- **Anfitrico:** _____
- **Peritrico:** _____

2. Cuando se permite que una sola bacteria se desarrolle (se reproduzca) sobre la superficie o en el interior de un medio sólido, su progenie en poco tiempo produce una masa notoria denominada _____

3. La multiplicación bacteriana tiene lugar por _____ y no existen procesos de reproducción sexual

4. El diagnóstico correcto de las bacteriosis es indispensable para disertar estrategias racionales de control. Mencione de manera general, el procedimiento que se sigue en el laboratorio:

5. Los métodos de control de las bacteriosis fitopatógenas se basan en medidas preventivas y curativas. Mencione usted cuales son las medidas curativas utilizadas

5. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier academic Press. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 992 pp.

Barne H, H. L. end Hunter B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. MacMillan Publishing Company. 218 pp.

Bridge, P. D. 1998. Applications of PCR in mycology. CAB, International.

Cummins, G. B. and Hiratsuka, Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. Third Edition. APS Press 225 pp.

Dhingra, O. D., and Sinclair J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. 355 pp

French, E.R.; Herbert, T.T. 1980 Métodos de investigación fitopatológico, I.I.C.A. San José, Costa Rica.

Hanlin, R. T. 1997. Illustrated genera of ascomycetes. Volume 1. APS Press. 263 pp.

León Gallegos, H. M. y Cummins, G. B. 1981. Uredinales (royas) de México. SARH. Vol 1. 440 pp. y Vol 2 492 pp.

Kálman Vánky. 2002. Illustrated genera of smut fungi. APS Press. Second edition. 238 pp.

Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. 2002. UAM IB UNAM. 90pp.

Muller, G. M., Bills, F. G. and Foster, S. M., 2004, Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods, Elsevier Academic Press. 777pp.

Narayanasamy, P., 2001, Plant pathogen detection and disease diagnosis. Marcel Dekker Inc., 518 pp.

Schots, A., Dewey, F. M. and Oliver, R., 1994. Modern assay for plant pathogenic fungi. C A B International, 267 pp.

Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S., 2004, Plant pathology, Concepts and Laboratory. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 413 pp.

PRACTICA 4

IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS

1. INTRODUCCIÓN

Los hongos y los organismos semejantes a estos comprenden el grupo más numeroso de microorganismos fitopatógenos (ocho mil especies) y son los causantes de la mayoría de las pérdidas económicas agrícolas, debido al gran número de enfermedades que ocasionan. Se considera que todas las plantas son atacadas al menos por un hongo, y muchas son afectadas por un gran número de estos organismos.

El hábitat de los hongos es muy amplio, puesto que se encuentran en el suelo, en el agua y en las plantas y animales. Pueden desarrollarse en condiciones climáticas muy variadas, en todo tipo de ecosistemas.

Los organismos semejantes a los hongos pertenecen a los reinos Protozoa y Chromista, y los hongos al reino Fungi. Son microscópicos y macroscópicos, uni y pluricelulares. Presentan pared celular y carecen de clorofila.

Están constituidos por células redondas u ovals solitarias o en plasmodios, o más frecuentemente por estructuras alargadas y ramificadas llamadas hifas, cuyo conjunto se denomina micelio. Cada hifa está conformada por una pared celular que protege a la membrana celular y al contenido protoplasmático, en donde se encuentran dispersos sus núcleos verdaderos, así como las mitocondrias, ribosomas, retículo endoplásmico y gránulos de sustancias de reserva. Si las hifas están separadas en celdas, se dice que el micelio es septado, y si el protoplasma es continuo en las hifas el micelio es cenocítico. En algunos hongos el micelio llega a formar pseudotejidos. Prosénquima y pseudoparénquima.

Entre las estructuras de reproducción asexual están los oídos, clamidosporas, esporangios y conidios, estos últimos solitario o agrupados en sinemas, esporodocios, acérvulos o picnidios. Las esporas sexuales son las siguientes: cigosporas, oosporas, ascas-libres o en apotecios, peritecios y cleistotecios- y

basidios, que nacen de forma directa de una espora de resistencia o en basidiocarpo, o dentro de basidiocarpos.

2. COMPETENCIA ESPECÍFICA

Reconocer las características morfológicas que distinguen a los hongos en preparaciones temporales y permanentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Portaobjetos	Agua destilada	Agujas de disección	Lugol
Cubreobjetos	Azul de metileno	Cultivos de hongos	Rojo congo

3.2 Metodología

3.2.1 Preparaciones temporales

- Pon una gota de agua en un portaobjetos, y agrega una masa de micelio y esporas de un cultivo de hongos.
- Observa al microscopio.
- Si hay micelio y esporas, agrega una pequeña gota del colorante para una mejor observación de las estructuras.
- Coloca el cubreobjetos y observa nuevamente al microscopio. Esquematiza lo observado.

3.2.2 Preparaciones permanentes

- Pon una gota de lugol en un portaobjetos, y agrega una masa de micelio y esporas de un cultivo de hongos.
- Observa al microscopio.
- Si hay micelio y esporas, agrega una pequeña gota del colorante para una mejor observación de las estructuras.

- Coloca el cubreobjetos y observa de nueva cuenta al microscopio. Esquematiza lo observado.
- Sella tu preparación con barniz transparente y etiquétala.

4. CUESTIONARIO

1. Mencione usted de que está formada la pared celular de los hongos
2. Según el nivel de parasitismo, diga usted como pueden ser los hongos
3. El organismo vivo infectado por el parásito se llama
4. Característica principal de los hongos inferiores
5. Característica principal de los hongos superiores
6. Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de sus
_____ y _____

5. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier academic Press. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 992 pp.

Barne H, H. L. end Hunter B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. MacMillan Publishing Company. 218 pp.

Bridge, P. D. 1998. Applications of PCR in mycology. CAB, International.

Cummins, G. B. and Hiratsuka, Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. Third Edition. APS Press 225 pp.

Dhingra, O. D., and Sinclair J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. 355 pp.

French, E.R.; Herbert, T.T. 1980 Métodos de investigación fitopatológico, I.I.C.A. San José, Costa Rica.

Hanlin, R. T. 1997. Illustrated genera of ascomycetes. Volume 1. APS Press. 263 pp.

León Gallegos, H. M. y Cummins, G. B. 1981. Uredinales (royas) de México. SARH. Vol 1. 440 pp. y Vol 2 492 pp.

Kálman Vánky. 2002. Illustrated genera of smut fungi. APS Press. Second edition. 238 pp.

Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. 2002. UAM IB UNAM. 90 pp.

Muller, G. M., Bills, F. G. and Foster, S. M., 2004, Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods, Elsevier Academic Press. 777 pp.

Narayanasamy, P., 2001, Plant pathogen detection and disease diagnosis. Marcel Dekker Inc., 518 pp.

Schots, A., Dewey, F. M. and Oliver, R., 1994. Modern assay for plant pathogenic fungi. C A B International, 267 pp.

Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S., 2004, Plant pathology, Concepts and Laboratory. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 413 pp.

PRÁCTICA 5

IDENTIFICACIÓN DE NEMATODOS FITOPATÓGENOS

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos son organismos que pertenecen al reino Animalia, y son quizá los animales pluricelulares más abundantes en el mundo, después de los insectos. Su tamaño fluctúa entre unas cuantas micras hasta 0.5-1 mm.

Los nematodos son gusanos cilíndricos con cuerpo alargado y delgado con simetría bilateral. Su cutícula es lisa, son no segmentados y carecen de patas u otros apéndices. Presentan todos los sistemas fisiológicos principales de todos los animales, como lo son los sistemas excretor, nervioso, reproductor y digestivo.

Durante su ciclo de vida, los nematodos llegan a presentar cinco estados y cuatro mudas. En algunas especies la primera y segunda etapas larvales no pueden infectar a las plantas, realizando sus funciones metabólicas a expensas de la energía almacenada en el huevecillo.

Los nematodos fitopatógenos presentan géneros ectoparásitos, los cuales pasan toda su vida en el suelo y se alimentan externamente de las raíces de las plantas hospederas, como es el caso de *Cricononemoides*, *Hemicycliophora* y *Cacopaurus*. Otros géneros son endoparásitos, produciendo lesiones internas en los tejidos vegetales. Por lo general se ubican en el parénquima cortical, o bien llegan hasta el cilindro central de las raíces hospederas, en donde permanecen o migran hacia otros órganos de las plantas, por ejemplo, *Aphelenchoides*, *Anguina* y *Ditylenchus*. Otros más pasan parte de su vida como endoparásitos y la otra en el suelo que se encuentra alrededor de las raíces que parasitan, por lo que se les conoce como semiendoparásitos, entre los que destacan: *Meloidogyne*, *Heterodera* y *Tylenchus*.

2. COMPETENCIAS ESPECÍFICAS

Reconocer las características morfológicas que distinguen a los nematodos en preparaciones temporales (extracción) y permanentes.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Materiales

Plástico de 1 m	Tubos de centrífuga
Probeta	Vasos de precipitados
2 cubetas	Centrífuga
Tamices de 100, 200 y 350 mallas	Agitadores
Piseta	Cajas de Petri pequeñas
Caolín	Solución azucarada (55 gr/100 ml H ₂ O)
Muestras de suelo	

3.2 Metodología

Las actividades que se llevarán a cabo en esta práctica son cuatro:

1. Extracción de nematodos.
2. Observación de nematodos vivos.
3. Observación de preparaciones permanentes y temporales de nematodos.
4. Esquemización de lo observado, indicando los nombres de las estructuras.

3.2.1 Extracción de nematodos por el método de tamizado-centrifugado

1. Se coloca la muestra de suelo sobre un plástico, se deshacen los terrones y se retiran las basuras, piedritas, raíces, etc. Se remueve bien la tierra para homogeneizarla.
2. En una probeta o vaso de precipitados se ponen 200 mL de agua y se agrega suelo hasta que la marca de agua llegue a 400 mL. Esto se hace con el objeto de tener una referencia del tamaño de la población que se encuentra en 200 mL de suelo, sobre todo si se desea hacer un estudio cuantitativo.
3. Esta mezcla se vacía en la cubeta "A" con un poco más de agua, se deshacen los grumos y se vacía el sobrenadante en los tamices de 100, 200 y 325 sobrepuestos y se recoge en la cubeta "B". Esta operación se repite dos veces más.

4. La arenilla que quedó en el tamiz de 325 se recoge en un vaso de precipitados con una pizeta, procurando que el ángulo que forma el chorro de agua con el tamiz sea lo más agudo posible, nunca recto, puesto que de esta forma el agua ayudaría a pasar a los nematodos a través de la malla del tamiz y los dañaría.
5. El agua que se recogió en la cubeta "B" se vierte a través del tamiz de 325 y se recoge en la cubeta "A". Esta operación se repite dos veces más.
6. La arenilla que quedó en el tamiz se recoge con una pizeta de la forma indicada en el número 4 y se pasa al mismo vaso de precipitados.
7. La arenilla recogida se distribuye en los tubos de centrífuga y se le agrega un poco de caolín a cada tubo. Se agitan bien.
8. Se centrifugan durante cinco minutos a 2900 rpm.
9. Se tira el sobrenadante.
10. Al sedimento se le agrega la solución azucarada y se agita bien.
11. Se centrifugan durante tres minutos a 2900 rpm.
12. Se pasa el sobrenadante por el tamiz de 325 y se lava perfectamente bien hasta eliminar por completo la solución azucarada.
13. Se recoge el sedimento con una pizeta y se pasa a una caja de Petri pequeña con un poco de agua.
14. Se observa al microscopio.

Este método de extracción brinda la oportunidad de obtener casi todos los nematodos del suelo de una forma rápida. El suelo retenido en los tamices se centrifuga para separar a los nematodos de las partículas orgánicas mediante la flotación de los mismos en una solución de gravedad específica mayor de la que poseen los nematodos. Se emplea el caolín para sedimentar a los nematodos y poder eliminar el agua sobrenadante de la muestra. La solución azucarada, como tiene una gravedad específica mayor a la que presentan los nematodos, hace que éstos floten y queden suspendidos en la solución.

4. CUESTIONARIO

1. Los nematodos carecen de aparato circulatorio y respiratorio, diga usted como se efectúa la circulación y respiración en ellos
2. Diga usted como se efectúa y puede ser la reproducción en los nematodos
- 3 Es el género del nematodo agallador, La hembra adulta es esférica o tiene forma de pera con un cuello alargado mientras que los machos tienen forma de gusano

(vermiforme), Los juveniles y las hembras son endoparásitos que causan agallas, El estilete es delgado con nódulos basales, Los huevos se depositan en una matriz gelatinosa.

4. Es el nematodo (género) causante del anillo rojo del cocotero
5. Es el nematodo (género) barrenador del platano
6. Es el nematodo (género) lesionador de los cítricos

5. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier academic Press. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 992 pp.

Barne H, H. L. and Hunter B. B. 1987. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. MacMillan Publishing Company. 218 pp.

Bridge, P. D. 1998. Applications of PCR in mycology. CAB, International.

Cummins, G. B. and Hiratsuka, Y. 2003. Illustrated genera of rust fungi. Third Edition. APS Press 225 pp.

Dhingra, O. D., and Sinclair J. B. 1985. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press. 355 pp.

French, E.R.; Herbert, T.T. 1980 Métodos de investigación fitopatológico, I.I.C.A. San José, Costa Rica.

Hanlin, R. T. 1997. Illustrated genera of ascomycetes. Volume 1. APS Press. 263 pp.
León Gallegos, H. M. y Cummins, G. B. 1981. Uredinales (royas) de México. SARH. Vol 1. 440 pp. y Vol 2 492 pp.

Kálman Vánky. 2002. Illustrated genera of smut fungi. APS Press. Second edition. 238 pp.

Mier, T., Toriello, C. y Ulloa, M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de laboratorio. 2002. UAM IB UNAM. 90 pp.

Muller, G. M., Bills, F. G. and Foster, S. M., 2004, Biodiversity of fungi inventory and monitoring methods, Elsevier Academic Press. 777 pp.

Narayanasamy, P., 2001, Plant pathogen detection and disease diagnosis. Marcel Dekker Inc., 518 pp.

Schots, A., Dewey, F. M. and Oliver, R., 1994. Modern assay for plant pathogenic fungi. C A B International, 267 pp.

Trigiano, R. N., Windham, M. T. and Windham, A. S., 2004. Plant pathology, Concepts and Laboratory. CRC Press, Boca Raton, London, New York, 413 pp.

PRÁCTICA 6

IDENTIFICACIÓN DE SÍNTOMAS EN PLANTAS ENFERMAS

1. INTRODUCCIÓN

La Sintomatología es la rama de la Fitopatología que estudia los síntomas y los signos que producen los patógenos en las plantas que atacan. Su conocimiento es indispensable para el diagnóstico de las enfermedades.

Un síntoma es la manifestación visible de una condición patológica en una planta sensible, y un signo es la estructura o evidencia del patógeno mismo, producida dentro o fuera de los tejidos del hospedero.

Debido a la gran cantidad de síntomas que existen, se han agrupado bajo diversas denominaciones, dependiendo de múltiples factores tales como el lugar de aparición, del efecto del medio ambiente, del número de patógenos involucrados, etc. Así, tenemos que los síntomas que ocurren en los órganos directamente atacados por los patógenos se llaman síntomas primarios, en cambio, a los que aparecen en otro órgano de la planta no atacado de forma directa por el patógeno, sino como una secuela de éste, se les llama síntomas secundarios. En algunas ocasiones los hospederos son atacados de manera simultánea por más de un patógeno, provocando síntomas complejos. Otras veces los síntomas no se expresan del todo, debido a condiciones ambientales favorables al patógeno, denominando a éstos síntomas enmascarados. De modo típico, cada enfermedad produce varios síntomas característicos, que en lo habitual aparecen en series subsecuentes durante el curso de la enfermedad; a este conjunto de síntomas se le conoce con el nombre de síndrome.

Desde el punto de vista morfofisiológico, los síntomas se agrupan en necrosis (muerte de células, tejidos, órganos o la planta completa), hipoplasias (disminución del desarrollo) e hiperplasias (exceso en el desarrollo).

2. COMPETENCIA ESPECÍFICA

Identificar los diferentes síntomas y signos que ocurren en las enfermedades vegetales, mediante la observación de material fresco.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Diez ejemplares fitopatológicos por equipo, prensados y con datos de identificación.
Ejemplares vegetales fitopatológicos frescos
Ejemplares vegetales fitopatológicos montados
Microscopio estereoscópico
Agujas de disección
Navaja
Cartulinas para herbario
Etiquetas

3.2 Metodología

1. Identificación de síntomas y de signos en ejemplares vegetales enfermos utilizando la clave de identificación de síntomas y signos.
2. Los ejemplares a identificar se observan cuidadosamente, utilizando la lupa y el microscopio cuando sea necesario, siguiendo la Clave de identificación de Síntomas y Signos.

3.3. Clave de identificación de síntomas y signos

SÍNTOMAS

1. NECROSIS. Caracterizadas por la degeneración y muerte celular.

Si se presentan antes de que ocurra la muerte celular

1.1. PLESIONECROSIS

1.2. HOLONECROSIS

Si se manifiestan hasta que las células y los tejidos mueren

Cuadro 1. Clave para la identificación de síntomas y signos

1.1. PLESIONECROSIS	
El tejido foliar toma coloraciones amarillentas debido a la destrucción de la clorofila	AMARILLAMIENTO
Presencia de tejidos débiles y flácidos debido a la pérdida de la turgencia celular provocada por la carencia de agua, casi siempre por el taponamiento de los vasos conductores a causa de los patógenos.	MARCHITEZ
Manchas traslúcidas, acuosas, como pequeñas gotas de agua contenidas dentro de los espacios intercelulares. Estas acumulaciones de líquidos provienen de células que han sufrido daños en sus membranas celulares.	HIDROSIS
1.2. HOLONECROSIS	
Si se presentan en tejidos de almacenamiento	1.2.1
Si se presentan en tejidos verdes	1.2.2
Si se presentan en tejidos leñosos	1.2.3
1.2.1. Tejidos de almacenamiento	
Los tejidos sufren rápidamente una descomposición	1.2.1.1. PUDRICIÓN
1.2.1.1. PUDRICIÓN	
Si es antecedida por hidrosis y con un reblandecimiento de los tejidos	PUDRICIÓN BLANDA
El agua es eliminada muy rápido de los tejidos, por lo que el órgano atacado se seca, quedando con un aspecto arrugado, duro y seco	MOMIFICACIÓN
1.2.2. Tejidos verdes	
Marchitez y caída de las plantitas de almácigo, como consecuencia de la muerte (necrosis) de las células del cuello del tallo	AHOGAMIENTO O "DAMPING-OFF"
Necrosis localizada alrededor del borde de la hoja	CHAMUSCADO
Necrosis extendida en toda la lámina foliar	TIZÓN
Zonas de tejido necrótico bien definidas, de diversos colores y tamaños, en ocasiones rodeadas por un borde púrpura o de algún otro color	MANCHADO
Manchas necróticas muy pequeñas que después se rasgan	TIRO DE MUNICIÓN

y se caen dejando pequeños orificios	
Manchas necróticas sobre las que existe crecimiento micelial oscuro	RONCHA ERUPCIÓN 0
Manchas necróticas muy pequeñas extendidas en todo el órgano	ABIGARRADO
Zonas alargadas de necrosis, a lo largo de venas y tallos	RAYADO
Zonas necróticas alargadas, en las regiones intervenales de la lámina	BANDEADO
Repentina desecación, debilitación y muerte de toda la hoja debido a la acción indirecta de la actividad del patógeno	QUEMADURA
Necrosis epidérmica que da como resultado un blanqueado de la epidermis y de los tejidos adyacentes en el fruto y las hojas	ESCALADADURA
Muerte repentina de brotes o yemas foliares	AGOSTAMIENTO
Necrosis extensiva que provoca la caída de los frutos	DESGRANAMIENTO
1.2.3. Tejidos leñosos	
Necrosis restringida a los tejidos corticales del tallo o raíz, generalmente rodeado de un callo de tejido sano	CÁNCER O CANCRO
Necrosis extensiva que se origina en el ápice de brotes y corre hacia la base, por lo general después de la hibernación	MUERTE REGRESIVA
Exudado de tejidos leñosos, de consistencia acuosa, generalmente de colores vivos	SANGRADURA
Exudados de consistencia viscosa o gomosa, generalmente en frutos	GOMOSIS
3. HIPERPLASIA. Existe un desarrollo excesivo en tamaño y color de algún órgano de la planta o de la planta completa, o bien por un desarrollo precoz de los órganos	
Desarrollo excesivo de la planta en general	3.1. GIGANTISMO
Acumulación excesiva de pigmentos	3.2. HIPERCROMÍA
Los órganos se desarrollan fuera de lugar o con otras formas	3.3. METAPLASIA
3.1 GIGANTISMO	
Se da un torcimiento de los brotes o enrollamiento de las hojas por crecimiento excesivo de una parte del órgano	VERRUCOSIS O ENCHINAMIENTO
Marchitez causada por hinchamientos de las células epidérmicas y subepidérmicas, provocada por la	COSTRA O ESCARA

acumulación excesiva de agua	
Sobrecrecimiento de tejido epidérmico, en forma de pequeñas lesiones, ásperas, elevadas, formadas por células con paredes suberizadas	INTUMESCENCIA
Hinchazón provocada por la acumulación excesiva de material nutritivo, generalmente encima de un área constreñida	SARCOSIS
Hinchazón localizada que envuelve a órganos completos	TUMEFACCIÓN (tumores, nódulos agallas)
Desarrollo de órganos adventicios alrededor de un punto local	FASCICULACIÓN "ESCOBA DE BRUJA"
Crecimiento laminar de tallos u otros órganos cilíndricos, provocando que estos tomen forma aplanada y extendida	FASCICACIÓN
Desarrollo continuado después de que se alcanza el desarrollo normal	PROLIFERACIÓN
3.2. HIPERCROMIA	
Coloración verdosa en tejidos normalmente carentes de clorofila, debido a la producción y acumulación de ésta en los órganos	VIRESCENCIA
Coloración púrpura resultante del desarrollo excesivo de antocianinas	ANTOCIANESCENCIA
Coloración cobriza como resultado de diversos procesos que acumulan pigmentos, como puede ser la deficiencia de potasio	BRONCEADO
3.3 METAPLASIA	
Desarrollo de órganos en posiciones anormales	HETEROTROPÍAS
Desarrollo de pétalos u otros órganos florales en forma de hojas	FILODIOS
Desarrollo de hojas juveniles en plantas maduras	JUVENILODIOS
SIGNOS	
Exudados bacterianos de tipo cremoso y de color blanquecino	ZOOGLEAS
Se observa el crecimiento de organismos semejantes a los hongos, en particular sus micelios y esporangios, que dan una apariencia de fieltro suave, localizado en el envés de	MILDIU O CENICULLA VELLOSA

las hojas. Casi siempre se observa en el haz una mancha en correspondencia. Son producidos por Peronosporales	
Se observa el crecimiento vegetativo del hongo, como un micelio de color blanquecino o grisáceo, en pequeños manchones o de forma continua, que aparentas polvo sobre las hojas. En algunas ocasiones se observan conidios y cleistotecios. Todos son producidos por Erisifales	OÍDIO O CENICILLA POLVOSA
Presencia de pústulas que contienen una gran cantidad de esporas de hongos Uredinales. Son circulares en dicotiledóneas y alargadas en monocotiledóneas. Su color varía entre amarillo, naranja y café oscuro, dependiendo del tipo de espora que contengan (uredosporas o teliosporas)	ROYA
Se presenta una masa de color negro, compuesta por teliosporas de hongos Ustilaginales, la cual puede estar cubierta por una membrana de la planta, o bien puede estar desnuda	CARBÓN
Micelio y conidios de hongos de color oscuro, producidos por Melioalaceas o Capnodiaceas. A pesar de que son saprófitos, llegan a formar verdaderas costras sobre la epidermis de las hojas, de los frutos o de las ramas que disminuyen el área fotosintética	FUMAGINA

4. CUESTIONARIO

1. Diga usted a que hace referencia un síntoma
2. Diga usted a que corresponde un signo
3. Mencione en que parte de la planta se presenta el mildiu
4. Mencione dos géneros que producen pudrición blanda en los frutos
5. Mencione usted el género que causa la enfermedad conocida como "huitlacoche"

5. BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. 5th ed. Elsevier academic Press. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo. 992 pp.

Blancard, Dominique. 1990. Enfermedades del Tomate: Observar, Identificar, Luchar. Mundi-Prensa. España.

Blancard, Dominique. 1991. Enfermedades de Cucurbitaceas: Observar, Identificar, Luchar. Mundi-Prensa. España.

Brunt, Alan; Crabtree K., Gibbs A. 1990. Viruses of Tropical plants. Descriptions and List from the VIDE Database. CAB International Australian Center for International Agricultural Research (ACIAR). U.K. Redwood Press Ltd. London. 707 pp.

Shew H.D. and G.B. Lucas 1991. Compendium of tobacco diseases. St. Paul Minnesota American Phitopatological Society. U.S.A.

Hull, R. 2002. Matthews' Plant Virology. Fourth Ed. Academic Press. San Diego, San Francisco, New York, Boston, London, Sydney, Tokyo. 1001 pp.

Kurstak, R.E.F. 1991. Plant virus infections. Elsevier/North-Holland. Biomedical Press.

Matthews, R.E.F. 1991. Plant Virology. Academic Press. New York. London, Toronto, Sydney, S. Francisco. 897 pp.

Matthews, R.E.F. 1992. Diagnosis of Plant Virus Diseases, Ed. C.R.C. Press. USA. 374 pp.



PRÁCTICA 7

CONTROL BIOLÓGICO

1. INTRODUCCIÓN

En la agricultura convencional moderna, los fungicidas son la principal herramienta empleada para el control de hongos fitopatógenos. El uso continuado de estos productos químicos para el control de estos microorganismos ha provocado a través del tiempo el desarrollo de resistencia a los fungicidas utilizados y la contaminación en los agroecosistemas productivos, afectando de manera negativa los servicios ambientales básicos. Por ello, la tendencia actual ha sido racionalizar el uso de fungicidas y desarrollar nuevas alternativas de control a través del uso de agentes de control biológico. En la actualidad, se han desarrollado biopreparados con base en microorganismos antagonistas como *Trichoderma spp*, que pueden reducir el impacto de los patógenos vegetales. Este hongo antagonista permite el control de patologías fungosas en árboles frutales, forestales y hortalizas, es posible aislarlo localmente y reproducirlo en forma masiva para su aplicación a nivel de campo.

2. COMPETENCIA ESPECÍFICA

Comprobar el efecto antagonista de *Trichoderma* spp. con algunos hongos fitopatógenos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales

Cepas puras de *Trichoderma* spp.
Cajas de Petri estériles con PDA
Papel parafilm
Alcohol en matraz Erlenmeyer
Alcohol en atomizador
Papel absorbente
Campana de flujo laminar

Cepas puras de hongos Fitopatógenos
Mechero
Bisturí
Incubadora
Cerillos
Agua destilada estéril

3.2 Metodología

1. Preparar la campana de flujo laminar y trabajar en la zona de asepsia.
2. Rotular las cajas de Petri en donde se van a llevar a cabo las pruebas duales.
3. Esterilizar el bisturí y enfriarlo.
4. De la cepas puras de cada una de las especies antagónicas se toma un cuadro de aproximadamente 1 cm² y se coloca dentro de uno de los extremos de la caja Petri, opuesto a éste y de forma equidistante se coloca un cuadro del mismo tamaño pero de la especie fitopatógena correspondiente.
5. Se incuba a 27 °C, cuando desaparezca la condensación en el botton de la caja de Petri sellar las cajas con papel parafilm.
6. Se hacen las observaciones hasta que los crecimientos cubran la totalidad de la superficie de crecimiento de las cajas de Petri.
7. Clasificar el grado de antagonismo de las pruebas duales de acuerdo con la escala de Bell et al (1982) (tabla 1)-.

8. A los siete días de crecimiento de las colonias antagonicas, medir los centímetros de crecimiento de cada una de ellas. Registre los datos en una tabla comparativa entre los géneros evaluados.

Cuadro 2. Escala de clases para evaluar el grado de antagonismo de una especie

Clase 1	El agente de control biológico crece completamente sobre la colonia del patógeno y cubre toda la superficie del medio de cultivo.
Clase 2	El agente de control biológico crece al menos sobre dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo.
Clase 3	El agente de control biológico y el patógeno cubren aproximadamente la mitad de la superficie del medio de cultivo.
Clase 4	El patógeno crece al menos en las dos terceras partes del medio de cultivo limitando el crecimiento del agente de control biológico.
Clase 5	El patógeno crece sobre la colonia del agente de control biológico ocupando toda la superficie del medio de cultivo.

4. CUESTIONARIO

1. Diga usted que es el control biológico
2. En que se sustenta el control biológico
3. Mencione al menos tres géneros de hongos utilizados en el control biológico
4. Diga usted que es un hongo antagonista
5. Diga usted como es el modo de acción de *Trichoderma ssp.*

5. BIBLIOGRAFÍA

Bell, D.K., Well, H.D. and Markham, C.R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six plant pathogens. *Phytopathology* 72: 279-382.

Chet I. 1987. *Trichoderma*- application, mode of action, and potential as a biocontrol agent of soilborne plant pathogenic fungi. In *Innovative approaches to plant disease control* (I. Chet,Ed.), pp. 137-159. Wiley, New York.

Harman, G.E.; Howell .Ch; Viterbo, A; Chet. I. and Lorito. M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic a virulent plant symbionts. *Nature reviews microbiology* 2:43-56.

Sutton, J.C. and Peng, G. 1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in Strawberry leaves. *Phytopathology* 83:615-621.

