

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI



UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TESIS DE GRADO

TITULO:

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE HONGOS
FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE MORA DE CASTILLA
(*Rubus glaucus Benth*) SECTOR HUACHI CHICO-AMBATO-
TUNGURAHUA, 2014 ”**

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

Autor:

Patricia Elizabeth Banda Vichicela

Director:

Ing. Paolo Chasi

Latacunga – Ecuador

Noviembre 2014



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE COTOPAXI

UNIDAD ACADÉMICA DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y RECURSOS
NATURALES

Latacunga – Ecuador

AUTORÍA

Los criterios emitidos en el presente trabajo de investigación “**CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus Benth*) SECTOR HUACHI CHICO-AMBATO-TUNGURAHUA, 2014**”, son de exclusiva responsabilidad del autor.

.....
Banda Vichicela Patricia Elizabeth

C.I. 050340323-0



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

AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS

En calidad de Director del Trabajo de Investigación sobre el tema: **“CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN EL CULTIVO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus Benth*) SECTOR HUACHI CHICO-AMBATO-TUNGURAHUA, 2014”**, de Banda Vichicela Patricia Elizabeth, postulante de la carrera de Ingeniería Agronómica, considero que dicho Informe Investigativo cumple con los requerimientos metodológicos y aportes científico-técnicos suficientes para la validación del Anteproyecto y de ello desarrollar la tesis.

Latacunga, Noviembre, 2014

El Director

.....
Ing. Paolo Chasi

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 MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus Benth*) SECTOR HUACHI CHICO-AMBATO-TUNGURAHUA, 2014”**, de autoría del egresada Patricia Elizabeth Banda Vichicela, **CERTIFICAMOS** que se ha realizado las respectivas revisiones, correcciones y aprobaciones al presente documento.

Aprobado por:

Ing. Paolo Chasi
DIRECTOR DE TESIS

Ing. Karina Marín
PRESIDENTA

Ing. Mg. Guadalupe López
MIEMBRO

Ing. David Carrera
OPOSITOR

DEDICATORIA

A mi madre, por brindarme todo el apoyo necesario en mi trayectoria de vida con sus consejos y también haber recibido el gran amor que me lo demuestra diariamente. A mi padre, por ser el pilar fundamental de la familia quien con su esfuerzo pudo apoyarme para cumplir mi meta. A mis tíos maternos quienes a pesar de la distancia siempre estuvieron ahí para escucharme y generar un gran ánimo para continuar con mis estudios, demostrándome que los valores son quienes hacen a la persona. A mi abuelita Cecilia Almachi por estar siempre junto a mí en las buenas y en las malas compartiendo momentos especiales y teniendo una acogida de madre ejemplar. A mis hermanas y hermano en especial a Verito por ser mi cómplice amiga y consejera, por el apoyo mutuo que compartimos las dos.

Patricia Banda

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la oportunidad de vivir pionero de cada paso que doy quien ilumino mi mente para con ello alcanzar mi gran anhelo de ser profesional.

A la Universidad Técnica de Cotopaxi, por abrirme sus puertas ya que en todo mi trayecto estudiantil fue aquí donde forme cada uno de mis conocimientos adquiridos.

A mis maestros, docentes quienes a lo largo del camino formamos una familia más siendo amigos, cómplices quienes nos brindaron el conocimiento necesario para mi formación profesional.

Mi gratitud a mi Director de Tesis, Ing. William Paolo Chasi Vizuete por su valiosa colaboración, su predisposición, durante el desarrollo de este trabajo. Y quienes también conformaron mi corte de miembros de tribunal a la Ing. Karina Marín, Ing.Mg. Guadalupe López, Ing. David Carrera, por su apoyo desde el inicio hasta la culminación del presente trabajo.

A todos mis compañeros, amigos de la carrera de Ingeniería Agronómica porque en transcurso de esta etapa estudiantil compartimos inolvidables momentos alegres y de tristeza, fomentando así una amistad verdadera con agradables recuerdos que perduran para siempre.

Patricia Banda

RESUMEN

La presente investigación caracterización morfológica de hongos fitopatógeno en el cultivo de mora de castilla *Rubus glaucus Benth* en el sector de Huachi Chico- Ambato-Tungurahua. 2014. Misma que se realizó en el laboratorio de la Universidad Técnica de Cotopaxi ubicada en la Parroquia Eloy Alfaro, cantón Latacunga, provincia Cotopaxi, tuvo como objetivo determinar el hongo fitopatógeno de mayor impacto en la producción del cultivo, información que permitió el avance de la investigación determinando que *Botrytis cinerea* es el principal limitante en la producción de mora de castilla *Rubus glaucus Benth* desvalorizando económicamente con un 50% en la pérdida de producción y comercialización de la fruta.

Se tomó las muestras en campo en el cultivo de mora de castilla *Rubus glaucus Benth* identificando signos y síntomas de *Botrytis cinerea*, mismas que fueron trasladadas al laboratorio utilizando el medio de cultivo papa-destroza-agar (PDA), medio para valorar el aspecto morfológico y de uso generalizado para el aislamiento de hongos, utilizando cajas petri de plástico se realizaron 5 aislamientos utilizando trozos vegetales de 3mm de tallos, hojas, flores y frutos contenidas con el hongo *Botrytis cinerea* consiguiendo mayor eficacia con la utilización de trozos de 3mm del fruto, son introducidas en la incubadora a una temperatura de 23°C, en 28 horas se obtuvo ya el desarrollo del ciclo de vida tratándose de una temperatura alta que ayudo a la germinación y actividad del desarrollo del hongo, se caracteriza macro y micro estructuras del patógeno con la utilización del microscopio con lentes de 20X y 100X lentes de mayor aumento, describiendo así también el ciclo de vida en condiciones de laboratorio gracias a las fotografías tomadas con la cámara digital se pudo concluir obteniendo la información necesaria para realizar la guía didáctica fomentando sobre la evolución de crecimiento de cada hongo fitopatógeno que afecta al cultivo de la Mora de castilla, proporcionando ayuda legible para el conocimiento de la etiología de cada organismo para que con ello, los productores mejoren el rango de productividad minimizando los gastos de producción.

SUMMARY

The present research of MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI IN MORA DE CASTILLA CROPS *Rubus Glaucus Benth* IN THE HUACHI CHICO FIELD - AMBATO-TUNGURAHUA. 2014. Research conducted at the Technical University of Cotopaxi laboratory, located in the Eloy Alfaro parish, Latacunga city, and Cotopaxi province, the main aim was to determine the phytopathogenic fungus with greatest impact on crop production, information that allowed the development of the research determining that *Botrytis cinerea* is the main limiting factor in the production of mora de Castilla *Rubus glaucus Benth*, devaluating economically with 50 percent loss in the production and marketing fruit.

It was taken samples field in mora de Castilla crops identifying signs and symptoms of *Botrytis cinerea*, which were transferred to the laboratory employing the harvest method papa-destroza-agar (PDA), means for evaluating the morphological appearance and widely used for the isolation of fungi, using plastic petri boxes, five isolations were performed using pieces of 3mm plant stalks leaves, flowers and fruits with the fungus *Botrytis cinerea* contained, achieving greater efficiency with the use of pieces of 3mm of fruit, are introduced into the incubator at 23 ° C , in 28 hours we have already got the development of the life cycle in the case of a high temperature that helped the germination and growth of the fungus activity, macro and micro structures of the pathogen were characterized with the microscope using 20X and 100X lens of higher magnification, describing as well the life cycle under laboratory conditions, thanks to photographs taken with a digital camera it was concluded that obtaining the information needed for the tutorial, encouraging the evolution of growth of each phytopathogenic fungus that affects the cultivation of Mora de Castilla, providing legible assistance for the understanding of the etiology of each organism to thereby producers improvement the range of productivity minimizing production costs.

INDICE DE CONTENIDOS

AUTORÍA.....	ii
AVAL DEL DIRECTOR DE TESIS.....	iii
AVAL DE LOS MIEMBROS DEL TRIBUNAL	iv
DEDICATORIA	v
AGRADECIMIENTO	vi
RESUMEN.....	vii
SUMARY	viii
INDICE DE CONTENIDOS	ix
INDICE DE TABLAS	xiii
INDICE DE GRÁFICOS	xiv
INDICE DE ANEXOS.....	xiv
INTRODUCCIÓN	1
JUSTIFICACIÓN	2
OBJETIVOS	3
GENERAL	3
ESPECÍFICOS	3
PREGUNTAS DIRECTRICES	4
CAPITULO I.....	5

1.	FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA.....	5
1.1.	MARCO TEÓRICO.....	5
1.1.1.	Cultivo de la mora de castilla	5
1.1.1.1.	Origen	5
1.2.	HONGOS FITOPATÓGENOS	7
1.2.1.	Características generales	8
1.2.2.	Estructuras somáticas	8
1.2.3.	Hongos como patógenos en las plantas.....	9
1.3.	ENFERMEDAD	10
1.3.1.1.	Descripción	10
1.3.1.2.	Características morfológicas.....	11
1.3.1.3.	Diseminación	11
1.3.1.4.	Síntomas.....	12
1.3.1.5.	Taxonomía	13
1.3.1.6.	Ciclo de vida	14
	CAPITULO II	16
2.	DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	16
2.1.1.	Recursos y Materiales	16
2.1.1.1.	Recursos institucionales.....	16
2.1.1.2.	Recursos humanos	16

2.1.1.3. Materiales de campo	17
2.1.1.4. Recursos Tecnológicos	17
2.1.1.5. Materiales de Oficina.....	19
2.2. DISEÑO METODOLÓGICO	20
2.2.1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES.....	20
2.2.2. Tipo de investigación.....	20
2.2.3. Métodos.....	21
2.2.3.1. Métodos lógicos.....	21
2.2.3.1.1. Método descriptivo analítico.....	21
2.2.3.1.2. Método deductivo.....	21
2.2.4. Técnicas	22
2.3. METODOLOGÍA.....	23
2.3.1. En campo	23
2.3.1.1. Ubicación Política.....	24
2.3.1.2. Ubicación Geográfica	24
2.3.1.3. Condiciones edafoclimaticas del sector Huachi Chico.....	25
2.3.2.1. Ubicación Política	25
2.3.2.2. Ubicación Geográfica	26
2.3.3. Toma de Muestras.....	26
2.3.3.1. Procedimiento en la Toma de Muestras.....	27

3.3.2.2. Almacenamiento	27
3.3.2.3. Identificación de la muestra en laboratorio previa a la siembra	27
3.3.4. Elaboración del medio de cultivo	28
3.3.6. Identificación	32
3.3.7. Descripción	32
CAPITULO III	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
3.2. CARACTERIZACIÓN DE MACRO Y MICROESTRUCTURAS DEL PATÓGENO	38
3.3. DESCRIPCIÓN DEL CICLO DE VIDA DEL PATÓGENO EN CONDICIONES DE LABORATORIO	44
4. CONCLUSIONES	48
5. RECOMENDACIONES	49
6. GLOSARIO TÉCNICO	50
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8. ANEXOS	58

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Taxonomía de Mora de castilla <i>Rubus glaucus</i> Benth.....	6
Tabla 2.- Taxonomía de <i>Botrytis cinerea</i> fase Asexual.	13
Tabla 3.- Taxonomía de <i>Botrytis cinerea</i> fase Sexual.....	13
Tabla 4.- Operacionalización de las variables.....	20
Tabla 5.- Condiciones edafoclimáticas del sector.....	25
Tabla 6.- Síntomas de <i>Botrytis cinerea</i>	35
Tabla 7.- Signos de <i>Botrytis cinerea</i>	37
Tabla 8.- Micelio de <i>Botrytis cinerea</i>	38
Tabla 9.- Conidioforos de <i>Botrytis cinerea</i>	40
Tabla 10.- Conidio de <i>Botrytis cinerea</i>	41
Tabla 11.- Esclerocios de <i>Botrytis cinerea</i>	43
Tabla 12.- Formación y Germinación, de <i>Botrytis cinerea</i> (Ciclo de vida).	44
Tabla 13.- Esporulación y Germinación de esporas de <i>Botrytis cinerea</i> (Ciclo de vida).	46

INDICE DE GRÁFICOS

Grafico 1.-Ubicación geográfica del lugar de recolección Huachi Chico.....	24
Grafico 2.-Ubicación geográfica de la delimitación del laboratorio Salache.	26

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1.-Costos.....	58
Anexo 2.-Medio de cultivo	61
Anexo 3.-Preparación del medio de cultivo PDA.....	62
Anexo 4.-Recoleccion de las muestras.	65
Anexo 5.-Cultivo Botrytis cinerea	65
Anexo 6.-Visita del tutor al laboratorio.	66
Anexo 7.-Materiales y equipos.	66
Anexo 8.- Guía Didáctica.	¡Error! Marcador no definido.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) ha gozado de gran aceptación por parte de los productores consumidores tanto nacionales como extranjeros principalmente, por consiguiente motivo atraviesa numerosos problemas fitopatógenos en la etapa de desarrollo y producción. En el país no se encuentra el material suficiente para la identificación de los hongos fitopatógenos y que este sea manejable por el productor de la Mora de Casilla.

Se estima que la productividad óptima de la mora debe ser superior a 5 kg/planta/año, pero en la actualidad la producción de mora está en manos de pequeños agricultores que obtienen bajos rendimientos (3 kg/planta/año), debido a desconocimiento sobre manejo, aplicación de técnicas como nutrición, podas, identificación de los agentes causales, control de plagas, enfermedades y uso inadecuado de pesticidas, afectando la salud de los trabajadores y consumidores, esto sumado a la falta de crédito en función del cultivo impide obtener mejores rendimientos del fruto. (MARTÍNEZ A. 2011).

De esta manera en este trabajo investigativo se pretende reevaluar la caracterización morfológica de los hongos fitopatógenos de la Mora de Castilla, a través de un proceso de cultivo de la enfermedad en los respectivos medios de cultivo utilizando métodos comparativos través de fotografías microscópicas y macroscópicas, donde se obtendrán un estudio del proceso evolutivo del hongo forma, estructura, color característico, halo de crecimiento.

JUSTIFICACIÓN

El cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glauca Benth*) se ha incrementado considerablemente en los últimos años, debido al aumento de la demanda de la fruta tanto para el consumo humano y agroindustrial de alimentos, como para la exportación, de esta manera se constituye en una alternativa de producción generadora de ingresos para los pequeños y grandes productores (ROTTA, 2001).

Para conocer en forma científica los problemas fitopatógenos de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*). Y ayudar a los productores a manejar estas condiciones producidas por los mismos, para optimizar los cultivos con la identificación de hongos fitopatógenos en busca de la obtención de altos rendimiento sin que éstas afecten el ecosistema, es un reto de la agricultura moderna. Las técnicas convencionales de producción dan mayor importancia al uso indiscriminado de agroquímicos que se convierten en un enemigo no solo de los cultivos sino también de los productores y consumidores.

Con los resultados obtenidos se pretende mejorar, reduciendo los costos de producción, ante esta situación es importante que con la identificación de los hongos fitopatógenos aplicar una serie de medidas ya que actualmente los productores de esta fruta desconocen sobre los grados de pérdidas a causa de los hongos, teniendo como reto el cambio en el manejo de producción de la mora en el sector.

OBJETIVOS

GENERAL

- Caracterizar morfológicamente el hongo fitopatógeno que causa mayor impacto de producción en el cultivo de Mora de castilla (*Rubus glauca Benth*), en el Sector Huachi Chico-Ambato-Tungurahua 2014.

ESPECÍFICOS

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

PREGUNTAS DIRECTRICES

- ¿Se reconoció signos y síntomas del hongo fitopatógeno en el cultivo de Mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) en base a la observación realizada?
- ¿Cuál es el principal hongo fitopatógeno de mayor impacto económico que afecta en el cultivo de Mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) en el sector de Huachi Chico?
- ¿Cuáles son las características del hongo fitopatógeno encontrado?

CAPITULO I

1. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

1.1. MARCO TEÓRICO

1.1.1. *Cultivo de la mora de castilla*

1.1.1.1. *Origen*

El centro de origen de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), en las siguientes palabras: “esta excelente fruta es oriunda de los Andes Ecuatorianos (*Rubus glaucus Benth*) y de otros países de la América-Intertropical y ha merecido la atención y el cuidado de los agricultores, en varios lugares del país, como: Ibarra, Otavalo, Quito, Ambato, en donde la vienen cultivando en pequeña escala comercial desde hace más de 30 años”. (POPENOE, 1921), citado por (DE LA CADENA Y ORELLAN, 1985).

Existen más de 30 especies de la mora, aunque solo unas nueve tienen valor comercial. A nivel mundial, las variedades de mora cultivada proviene de las especies *Rubus occidentalis* o de hibridaciones con *Rubus idealius*. (DUQUE, et al., 2005).

1.1.1.2. *Taxonomía*

Tabla 1.-Taxonomía de Mora de castilla *Rubus glaucus* Benth.

Reino:	Vegetal
División:	Antofita
Clase:	Dicotiledónea
Subclase:	Arquiclamídea
Orden:	Rosales
Familia:	Rosácea
Género:	<i>Rubus</i>
Especie:	Glaucus
Nombre Científico:	<i>Rubus glaucus</i> Benth
Nombre Vulgar:	Mora de Castilla, zarzamora, zarza andina

Fuente: (AGRIOS, 2007).

1.1.1.3. *Morfología*

La mora pertenece al género *Rubus*, muy cercana al orden de los Rosales, es una planta perenne, arbustiva, semi erecta y con tallos rastreros o semi erguidos que forman macollas. (FRANCO y GIRALDO, 1999; CADENA y ORELLANA, 1985).

RAÍZ: Ramificada, ésta permite la propagación al presentar yemas vegetativas.

TALLO: Está cubierto por espinas curvas, pueden ramificarse y emiten constantemente brotes en la base, cuando están maduros son leñosos.

HOJAS: Son compuestas, trifoliadas, de peciolo blancuzco, cilíndrico y cubierto de espinas, que también se hallan en nervios, en la cara inferior de la lámina.

FLORES: Son compuestas y actinomorfas, típicamente peripinas, son blancas.

FRUTO: Compuesto y agregado, está formado por 70 a 100 drupas, de forma esférica a elipsoide.

SEMILLAS: De color café, de forma esférica.

1.2. HONGOS FITOPATÓGENOS

Manifiesta que los biólogos utilizan el término hongo para incluir organismos eucarióticos, esporógenos, sin clorofila. (HERRERA M. , 1994).

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

Los hongos son organismos filamentosos simples, no tienen clorofila y dependen de una planta hospedera para obtener su alimento. Son más grandes que las bacterias y se identifican con mayor facilidad, algunas de las estructuras que producen se pueden ver a simple vista y sirven en su identificación.

1.2.1. 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 M. y., 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 M. y., 1994).

1.2.2. 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.

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.

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 M. y., 1994).

Los hongos atacan las plantas hospederas susceptibles a través del movimiento de sus estructuras reproductivas. Las esporas se diseminan fácilmente por medios

mecánicos, corrientes de aire y el agua, por ejemplo: los hongos se transfieren fácilmente de los sustratos o suelos contaminados a las plantas o partes de estas, por lo que es necesario eliminarlas ya que son fuente de inóculos (transmisores de la enfermedad).

Los fungicidas se utilizan para el control de enfermedades causadas por hongos, los hay específicos y de amplio espectro, de contacto y sistémicos (se traslocan por el interior de la planta). Las principales enfermedades causadas por hongos son mildius, oídios, royas y carbonos.

1.2.3. 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. (HERRERA 1. , Fitopatología General, 1994).

1.3. ENFERMEDAD

1.3.1. BOTRYTIS (*Botrytis cinerea*)

El hongo es un parásito facultativo que tiene numerosos hospederos incluyendo malezas; causa una gran cantidad de enfermedades comunes y ampliamente distribuidas, principalmente en cultivos hortícolas, ornamentales y frutales de climas fríos y fríos moderados en todo el mundo. Las principales fuentes de inóculo primario son las conidias (esporas asexuales) que provienen de la germinación de los esclerocios (estructuras de supervivencia), formados sobre tallos de mora en descomposición, además del micelio formado en hojas muertas y frutos momificados (HAUSBECK, 1996).

Las especies del género *Botrytis* producen esclerocios, que actúan como estructuras de resistencia para proteger al patógeno de condiciones climáticas desfavorables o adversas. (ZOLEZZI, et al, 2010).

1.3.1.1. Descripción

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos ampliamente conocido, en el que podemos encontrar especies que parasitan a una sola especie vegetal, como *B. tulipae*, *B. squamosa* o *B. fabae*, patógenos de tulipán, cebolla y haba respectivamente, y una especie, denominada *B. cinerea*, capaz de infectar al menos 235 especies de plantas distintas (ELAD, 1997).

La enfermedad conocida como “Podredumbre Gris” o “*Botrytis*”. Entre los hospedadores de *B. cinerea* se incluyen una enorme variedad de plantas ornamentales (rosas, geranios, tulipanes, claveles, etc.), plantas frutales (vid, fresa, kiwi, etc.) y verduras y hortalizas (tomate, lechuga, pimiento, alcachofa, calabaza, etc.). En cada

uno de los cultivos y bajo condiciones de humedad relativa alta, la podredumbre gris puede afectar a frutos, flores, tallos, plántulas, hojas, bulbos, raíces y semillas. Además, el ataque no sólo se produce sobre cultivos en el campo o en invernaderos, donde el hongo destruye rápidamente los tejidos y coloniza la planta, sino que también provoca enfermedades post-cosecha, comenzando con una infección latente en el cultivo y desarrollándose posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (COLEY-SMITH et al., 1980).

1.3.1.2. Características morfológicas

Botrytis cinerea, posee conidios hialinos con forma semejante a un huevo formado en ramas de conidióforos sobre la superficie, no en cuerpos fructíferos especiales. La organización de las esporas en forma de racimos da el nombre este género, en griego *Botrytis* significa grupos de uvas. Forma esclerocios lisos de color negro en forma de barra o hemisferio debajo de la cutícula o de la epidermis del huésped y se aferran firmemente a esta. (SYNGENTA, 2007)

Los pedúnculos o tallos florales se necrosan, lo cual afecta el “cuajado” de los frutos, pues estos mueren y se momifican rápidamente. Pueden permanecer adheridos a los racimos, donde el hongo continúa esporulando. El hongo también causa lesiones de color café claro en el ápice de las hojas; por el envés, estas lesiones presentan un crecimiento afelpado de color café oscuro donde se observan las esporas y conidióforos del hongo (esporulación) que causa la enfermedad (TAMAYO, 2003).

1.3.1.3. Diseminación

La incidencia y severidad del moho gris es variable según la época del año y la zona de producción, aumentando durante la temporada invernal, debida a que la alta humedad relativa hace que el hongo esporule rápidamente.

El hongo se establece en los pétalos de la flor, los cuales son particularmente susceptibles cuando comienzan a envejecer y ahí produce micelio abundante (AGRIOS, 1995).

El hongo ocasiona la pudrición basal del fruto, la cual avanza y puede destruir una parte o su totalidad, bien puede extenderse hacia otros frutos que entran en contacto con los que ya han sido infectados. Los frutos infectados y tallos suculentos se ablandan y se vuelven aguanosos, y más tarde los tejidos que han sido invadidos adquieren un color café claro. Conforme se pudren los tejidos, la epidermis del fruto se rompe y el hongo produce numerosos cuerpos fructíferos. Los conidióforos y los racimos de conidios se asemejan en un racimo de uvas, el hongo libera fácilmente sus conidios cuando el clima es húmedo y luego estos son diseminados por el viento (SÁNCHEZ, 2002).

1.3.1.4. Síntomas

Los síntomas se manifiestan principalmente en las estructuras reproductivas de la planta y pueden ocasionar la pérdida total de la producción. Las flores afectadas presentan coloraciones pardas en los pétalos (GÓMEZ, 2001).

Los pedúnculos o tallos florales se necrosan, lo cual afecta el “cuajado” de los frutos, pues estos mueren y se momifican rápidamente. Pueden permanecer adheridos a los racimos, donde el hongo continúa esporulando. El hongo también causa lesiones de color café claro en el ápice de las hojas; por el envés, estas lesiones presentan un crecimiento afelpado de color café oscuro donde se observan las esporas y conidióforos del hongo (esporulación) que causa la enfermedad (TAMAYO, 2003).

1.3.1.5.Taxonomía

Tabla 2.-Taxonomía de *Botrytis cinerea* fase Asexual.

FASE ASEJUAL	
Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Ascomycetes filamentosos
Subclase:	Deuteromycetes
Género:	<i>Botrytis</i>
Especie:	<i>cinerea</i>

Fuente: (AGRIOS, G. 1997)

Tabla 3.-Taxonomía de *Botrytis cinerea* fase Sexual.

FASE SEXUAL	
Reino:	Fungi
División:	Ascomycota
Clase:	Ascomycetes filamentosos
Género:	Botryotinia
Especie:	fuckeliana

Fuente: (AGRIOS, G. 1997)

1.3.1.6.Ciclo de vida

Botrytis inverna en el suelo en forma de esclerocios o de micelio, el cual se desarrolla sobre restos de plantas en proceso de descomposición. Los esclerocios germinan y forman micelio en una amplia gama de temperaturas formando conidias, y en óptimas condiciones (15 -18 °C, humedad relativa alta y luz), las conidias se pueden formar solo en 8 horas. La liberación de las conidias tiene lugar principalmente durante el día y está influenciada por cambios en la humedad relativa. Las conidias pueden ser transportadas a largas distancias por las corrientes de aire y en las gotas de agua. Los procesos de germinación e infección dependen mucho más de la humedad que de la temperatura. En general cuando más altas son las temperaturas, hasta un máximo de 15-20oC más corto es el periodo de humedad requerido. No es necesaria la lluvia si la humedad relativa es superior al 98%. El conidio invade y penetra a los tejidos y las células infectadas se colapsan y desintegran causando la pudrición del tejido (AGRIOS, 1995).

1.4. MEDIO DE CULTIVO

1.4.1. AGAR PAPA DEXTROSA (PDA).

1.4.1.1. *Fundamento*

El Agar Papa Dextrosa es un medio utilizado para el cultivo de hongos y levaduras a partir de muestras de alimentos, derivados de leche y productos cosméticos. Los hongos crecen en este medio para desarrollar una morfología típica. (M.C.D. LAB, 2007).

La base del medio es altamente nutritiva y permite la esporulación y la producción de pigmentos. Los carbohidratos y la infusión de papa promueven el crecimiento de

mohos y levaduras, y el agar es adicionado como agente solidificante. El pH debe ser ajustado a aproximadamente $3,5 \pm 0.1$ con ácido tartárico al 10 %, para inhibir el crecimiento bacteriano. Además, para asegurar la inhibición del crecimiento bacteriano se factible adicionar Cloranfenicol como antibiótico en una concentración de 0,1g/L. (M.C.D. LAB, 2007).

CAPITULO II

2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. MARCO ADMINISTRATIVO.

2.1.1. *Recursos y Materiales*

2.1.1.1. *Recursos institucionales*

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

2.1.1.2. *Recursos humanos*

- Autor: Patricia Elizabeth Banda Vichicela
- Director de tesis: Ing. Paolo Chasi
- Miembros del tribunal:
 - Ing. Karina Marín
 - Ing. Mg. Guadalupe López
 - Ing. David carrera

2.1.1.3. *Materiales de campo*

- Recolección de muestras del hongo fitopatógeno en el cultivo de la Mora de castilla (*RubusglaucusBenth*).
- Tijeras
- Fundas de Papel
- Fundas ziplop
- Bisturí
- GPS
- Libro de Campo

2.1.1.4. *Recursos Tecnológicos*

- MATERIAL DE ASEO
 - Pala para basura
 - Escoba
 - Trapeadores
 - Detergente
 - Limpiones
 - Lava
 - Desinfectantes
 - Lavacaras
 - Escobillas de laboratorio

- MATERIAL DE LABORATORIO
 - Goteros de plástico
 - Papel aluminio
 - Pizeta
 - Marcadores permanentes
 - Aguja de disección

- Asa de siembra
- Reposeros plásticos con tapa
- Cajas Petri
- Papel absorbente
- Parafilm de laboratorio
- Porta objetos
- Cubre objetos
- Vaso de precipitación de 600-100-500-1000 ml
- Erlenmeyer de 500-1000 ml
- Tubos de ensayo de 10 ml
- Algodón
- Tarrinas de ½ litro transparente
- Fundas ziplop
- Cinta adhesiva transparente
- Pinzas
- Bisturí
- Tijeras
- Cuchillo
- Estilete
- Olla
- Colador metálico
- Cucharas
- Pirutines
- Mecheros
- Fosforera
- Ajitador
- Ph-metros
- REACTIVOS
 - Agua destilada
 - Agar

- Dextrosa o sacarosa
- Alcohol antiséptico
- Ácido cítrico
- Levadura granulada

- EQUIPOS

- Incubadora IN110
- Balanza de precisión
- Cocineta eléctrica
- Cámara digital
- Microscopio Trinocular CX31
- Refrigeradora R1-425 QUARZO INDURAMA
- Termómetro digital
- Cámara de flujo laminar aurora mini con base
- Autoclave semiautomática 2540-23 litros
- Cuenta colonias
- Desecador 250mm de diámetro con tapa
- Cámara científica infinity 1-2CB
- Destilador de agua waterwise 9000

2.1.1.5. *Materiales de Oficina*

- Computadora
- Internet
- Flash memory

2.2. DISEÑO METODOLÓGICO

2.2.1. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 4.-Operacionalización de las variables.

CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	ÍNDICE	TÉCNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de mora	Talo	Tipo	Observación	Microscopio
	Hifas	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

Fuente: Realizado por Investigador.

2.2.2. Tipo de investigación

La metodología descriptiva puntualiza como se ocasionaron los fenómenos a investigar, se ocupa de la descripción de datos y características de una población.

Esta investigación se realizó dentro del tipo descriptiva, porque para su desarrollo y avance de la investigación necesita ser descrito sigilosamente, la misma que me permitió recopilar información de la característica morfológica que presenta el hongo

fitopatógono *Botrytis cinerea*. Además de ser descriptiva por los resultados que fueron procesados de tal modo que se pudo analizar, discutir y puntualizar el desarrollo conjuntamente con el avance del ciclo vital de dicho hongo, evaluando aspectos relevantes que ayudaron a desarrollar la investigación.

2.2.3. Métodos

2.2.3.1. Métodos lógicos

2.2.3.1.1. Método descriptivo analítico

Utilice este método en esta investigación porque describí el ciclo de vida del hongo determinado de mayor impacto a la producción del cultivo de mora de castilla *Rubus glaucus Benth*, esta descripción se realizó a condiciones de laboratorio.

2.2.3.1.2. Método deductivo

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

Para el avance de la investigación se empleó este método porque permitió recopilar información de las característica morfológicas que presentan el hongo fitopatógono,

identificando signos y síntomas del hongo en el cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*).

2.2.3.1.3. Método comparativo

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

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

2.2.4. Técnicas

2.2.4.1. Observación

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

La observación permitió conocer la realidad en la que se desarrolló el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, además permitió observar macro y micro estructuras del patógeno. Como instrumento se utilizó el microscopio.

2.2.4.2.Fichaje

Se utilizó la técnica del fichaje, con la cual se realizó el levantamiento de información tanto en campo (selección de plantas), como en el laboratorio (siembras) donde se analizó a detalle y profundidad las características estructurales del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* con la cual se pudo cumplir se pudo cumplir cada actividad establecida..

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. *En campo*

Delimitación del Lugar de Recolección

Las muestras se recolectaran en el Sector de Huachi Chico, se encuentra ubicado en el cantón AMBATO perteneciente a la provincia TUNGURAHUA, Ecuador.

2.3.1.1. Ubicación Política

País: Ecuador

Provincia: Tungurahua

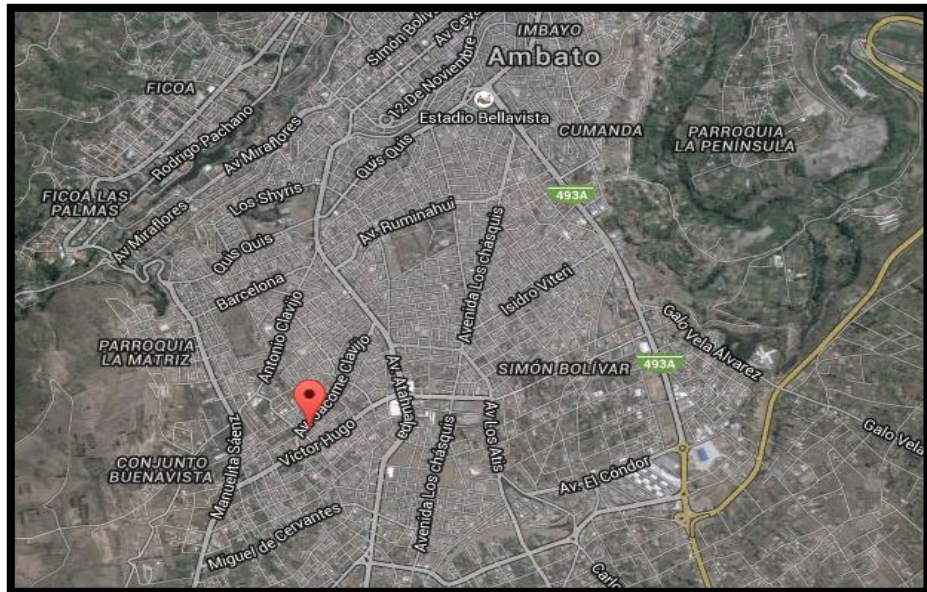
Cantón: Ambato

Parroquia: Huachi Chico

3.3.1.2. Ubicación Geográfica

- **Latitud:** 1.26667
- **Longitud:** 78.6333
- **Altitud:** 2.500 msnm

Grafico 1.-Ubicación geográfica del lugar de recolección Huachi Chico



Fuente: Google Maps

3.3.1.3. Condiciones edafoclimaticas del sector **Huachi Chico**

Tabla 5.-Condiciones edafoclimaticas del sector.

CLIMA	Equinoccial templado y seco
TEMPERATURA	15° C
PRECIPITACIÓN MEDIA ANUAL	700 mm

Fuente: Realizado por Investigador.

3.3.1.4. Características del suelo

La parroquia Huachi Chico presentan una textura franco-arenosa; profundos con buena fertilidad y buen contenido de materia orgánica, presentan un pH de ligeramente ácido a neutro con una pendiente del 2%.

3.3.2. Delimitación del Laboratorio

3.3.2.1. Ubicación Política

- **País:** Ecuador
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Cantón:** Latacunga
- **Parroquia:** Eloy Alfaro

3.3.2.2. Ubicación Geográfica

- **Latitud:** 00°59'57" s
- **Longitud:** 78°37'14" w
- **Altitud:** 2725 msnm.

Grafico 2.-Ubicación geográfica de la delimitación del laboratorio Salache.



Fuente: Google Maps

3.3.3. Toma de Muestras

Se realizó la toma de muestras al azar de hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* en el cultivo de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*), recogiendo seis muestras (2 de en tallo, 2 en hojas, 2 en fruto) que presentaban mayor porcentaje de infección presente en el cultivo para trasladar las muestras al laboratorio para su respectivo proceso de caracterización.

En el momento del traslado de las muestras no se presentó problemas con el material contenidas de la enfermedad en hojas y tallos trasladadas en fundas plásticas herméticas y con papel para evitar la transpiración de las mismas, pero si hubo problemas con el material contenidas de la enfermedad en el fruto considerando que es muy sensible y para su traslado utilice una tarrina plástica que fue útil para no echar a perder las muestras, mismas que son colocadas dentro de una hielera para evitando el maltrato.

3.3.2.1.Procedimiento en la Toma de Muestras

Se extrajeron plantas afectadas, utilizando un bisturí y tijeras para facilitar la recolección de las muestras, en cada corte se esterilizo los materiales con alcohol y las muestras vegetales fueron envueltas con papel para que el exceso de humedad sea absorbido por el mismo, posteriormente se procedió a colocar las muestras en fundas ziplop con su respectiva codificación y se trasladó en una hielera para evitar la deshidratación, contaminación y maltrato de las muestras.

3.3.2.2.Almacenamiento

Las muestras fueron colocadas en la nevera a una temperatura de 6 a 8°C para evitar que el hongo se prolifere y al mismo tiempo mantener al hongo vivo, material que será indispensable para una posterior siembra.

3.3.2.3.Identificación de la muestra en laboratorio previa a la siembra

Dentro del laboratorio se siguió un proceso minucioso de identificación para obtener muestras más óptimas, donde se verifico que era el hongo *Botrytis cinerea*, mediante

la utilización de bibliografías existente de los síntomas que presenta el hongo con la observación de la muestra en el microscopio.

3.3.4. *Elaboración del medio de cultivo*

Se elaboró el medio de cultivo optando por PDA (papa – dextrosa - agar), tiene la infusión de papa como fuente de almidones y la dextrosa son la base para el crecimiento de hongos y levaduras, utilizando:

50gr de papa

125ml de agua

3,75gr de agar

5gr de glucosa

0,5gr de levadura

Las cantidades detalladas anteriormente abarcan para una capacidad para cinco cajas petri, las mismas que contienen 25ml de PDA (papa – dextrosa - agar).

Procedimiento:

Pelar y poner a hervir la papa 50gr en 125ml de agua en un tiempo de 10 a 15 minutos, el extracto se filtra y se adiciona hasta completar los 125ml para reponer lo que evaporo a continuación se agregan los otros ingredientes y se calienta a fuego lento moviendo constantemente durante de 1 a 2 minutos hasta que queden totalmente disueltos. Obtenido ya el medio de cultivo se procede a colocar la mezcla en el erlenmeyer el cual debe ser tapado con papel aluminio de una forma segura, cuando empiece a hervir dentro del autoclave esta no sea derramada en el interior, luego el

erlenmeyer es colocado dentro del autoclave durante 35 minutos a una temperatura de 121°C para que la solución sea completamente esterilizada.

Después de haber transcurrido el tiempo establecido se realiza una previa apertura al autoclave para que los vapores sean expulsados, posteriormente se verifica que los vapores han sido expulsados en su totalidad con ello se procede a abrir completamente el autoclave, se obtiene el medio de cultivo y se coloca rápidamente 25ml de PDA en las cajas petri misma que ya están esterilizadas, ya que si se las expone mucho tiempo al aire libre pueden ser contaminada, después que el medio de cultivo ha sido colocado en las cajas petri estas deben mantenerse cerradas hasta que con la temperatura ambiente se enfríen para poder realizar la siembra.

3.3.5. Siembra

La siembra se realizó en cajas petri, previamente ya colocadas el medio de cultivo PDA (papa – dextrosa - agar), la misma que se realizó tomando pequeños segmentos (tallos, hojas y futo) de las muestras del cultivo de mora con la presencia del micelio del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, la cual se realiza dentro de la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación del medio de cultivo durante la siembra, utilizando materiales desinfectados como bisturís, pinzas, aza de siembra y mecheros.

Una vez sembradas las muestras se procede a sellar las cajas petri con parafilm y luego son colocadas en la incubadora a una temperatura de 23°C la que infiere para la proliferación del hongo *Botrytis cinerea*.

Para la obtención del hongo *Botrytis cinerea* se realizaron cinco siembras:

Primera siembra: se siembra en el medio de cultivo PDA a un pH de 8, el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* utilizando partes vegetativas de tallos y hojas, siendo colocadas en la incubadora a una temperatura de 21°C, las cuales fueron revisadas en el lapso de 48 horas, donde se observó los contenido de los cinco medios de cultivo

se obtuvo como resultado la presencia de bacterias y endógenos contaminantes, por lo tanto no se pudo encontrar el hongo requerido.

Segunda siembra: se realiza la siembra con frutas recolectadas en campo contenidas de micelio del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, los medios de cultivo con un pH de 8 de igual manera fueron colocadas en la incubadora a una temperatura 21°C, a las 24 horas son revisadas las mismas que contienen inicios de contaminación de bacterias, mismas que a las 48 horas se apreció dentro del medio de cultivo partes acuosas de color blanquecinas, verdes, rojas y tomates, iniciándose a los extremos la proliferación de estas son rápidamente afectando totalmente el medio de cultivo. Una de ellas identificadas dentro del género *Bacillus* que son comúnmente encontradas en el suelo. Con ello tampoco se pudo cultivar el hongo.

Tercera siembra: Al apreciar las dos primeras siembras que fueron totalmente contaminadas se opta por realizar una desinfección a la muestra utilizando la fruta con micelio presente del hongo *Botrytis cinerea*, en un vaso de precipitación al 1% con alcohol se sumerge la muestra en la fórmula durante unos segundos previniendo que la misma no sufra algún daño la desinfección debe ser rápida ya que se pretende retirar restos de polvos problema que se obtuvo con las anteriores muestras que son los causantes de la presencia de contaminantes dentro del medio de cultivo, se realiza la siembra con las muestras desinfectadas, los medios de cultivo fueron colocados dentro de la incubadora a una temperatura de 21°C, a las 24 horas se pueden apreciar que los medios de cultivo contienen cantidades mínimas de puntos acuosos blanquecinos ya con la presencia del hongo que se busca.

Cuarta siembra: se procede a la siembra utilizando la muestra obtenida de la s3m4, misma que será aislada en los cinco medios de cultivo, como se pudo apreciar esta muestra tiene un porcentaje mínimo de contaminación de la bacteria blanca se pretende obtener un cultivo limpio de agentes contaminantes se toma micelios del patógeno previamente ya identificado en el microscopio y comparado con la descripción bibliográfica, tome una muestra de este material con una aza de siembra estéril y colóquelo directamente sobre el medio de cultivo, mismos que son colocados en la incubadora a una temperatura de 23°C, la revisión fue realizada a las 24 horas todavía se encuentra la contaminación en unos medios de cultivo, pero se cuenta con un medio totalmente limpio con la presencia del hongo que se busca.

Quinta siembra: la siembra se realiza utilizando la s4m3 que se obtiene este medio completamente limpio, para realizar un buen manejo del cultivo es necesario tener muestras limpias de contaminantes para ello también se debe tomar en cuenta el pH del medio de cultivo donde bajo pH (3.5) se evita el crecimiento de las bacterias, pero se trata de un pH muy ácido se opta bajar a un pH de 6.5 tomando en cuenta que el medio se encontraba a un pH de 8, se realizó la siembra tomando una muestra de este material con una aza de siembra estéril y coloqué directamente sobre el medio de cultivo, los cuales son colocados en la incubadora a una temperatura de 23°C se realiza la revisión a las 48 horas se obtiene los cinco cultivos totalmente limpios con la presencia del hongo que se busca *Botrytis cinerea* mismo que será útil para el desarrollo de la investigación.

Se ha reportado que las conidias germinan a una humedad relativa de más de un 90% y a un rango de temperatura entre 1 a 30°C, con un óptimo entre 18 y 23°C. Para que se desarrolle adecuadamente, esporule, libere y germine sus esporas produciendo la infección. *Botrytis cinerea* inverna en el suelo en forma de esclerocios, estos son negros, duros, irregulares en tamaño y forma, y de 1-15 mm de longitud, germinan produciendo filamento miceliales e infectan directamente a los tejidos del hospedante. Esta flexibilidad extrema conlleva a que un cierto nivel de inóculo exista en casi

todas partes y a que la extensión epidemiológica de la enfermedad pueda ser inhibida sólo cuando prevalecen condiciones secas. (AGRIOS, 1999).

3.3.6. Identificación

3.3.6.1. Observación microscópica

Técnica de cinta pegante: Se realizó un dobléz de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostuvo con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo *Botrytis cinerea*, después se colocó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procedió a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 20x y 100x.

Montaje por disección: Con un asa estéril se tomó una pequeña muestra del hongo y se colocó en un portaobjetos con una gota de agua destilada, con el mismo asa se extendió el micelio, se colocó el cubreobjetos y se procedió a observar al microscopio de 20x y 100x.

3.3.7. Descripción

Caracterización morfológica del hongo fitopatógeno: para esto se utilizó el método comparativo a través de fotos microscópicas y macroscópicas y el uso de claves taxonómicas. (H.C.Finch, Ph.D) .

De las cepas aisladas se hizo observaciones microscópicas y macroscópicas tales como: color característico del medio de cultivo, halo, estructuras y crecimiento del hongo.

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, forma y tamaño de las esporas o conidios.

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

- Se preparó cajas petri con las cepas de hongos aislados, una en cada caja Petri.
- Se tomó un trozo de cinta masking transparente de 4cm de largo y se fijó en el cuerpo fructífero, tomando directamente de la caja Petri, donde se encontraban las cepas puras.
- Se observó en el microscopio y se procedió a tomar fotografías microscópicas de las diferentes estructuras con una cámara de 20 megapíxeles.
- Se creó un archivo con las fotografías tomadas de las cepas del hongo *Botrytis cinerea* y realice una guía didáctica de la caracterización morfológica del hongo.

CAPITULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El presente trabajo previo a la realización de la investigación con el tema caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de mora de castilla en el sector Huachi Chico- Ambato-Tungurahua.2014., se determinó el hongo de mayor impacto en la producción del cultivo, obteniendo como resultado a *Botrytis cinerea*, hongo fitopatógeno muy extendido como parásito facultativo y polífago actúa como saprófito en tejidos necróticos o en descomposición o también como parásito en tejidos suculentos o tiernos, se encuentra distribuida a nivel mundial. (AGRIOS, 1999).

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno que causa importantes pérdidas económicas en un amplio rango de cultivos de importancia agrícola, constituyendo actualmente en Ecuador y otros países, uno de los principales problemas fitosanitarios. Este patógeno puede atacar a los cultivos en cualquier estado de su desarrollo e infectar cualquier parte de la planta, colonizando tallos, hojas, flores y frutos, por lo que las infecciones por este hongo afectan no solo el rendimiento; sino además la calidad de los cultivos, provocando deterioros de gran magnitud incluso durante las etapas de transporte y almacenamiento de los productos (RIBERA, 2007).

Corroborando con las bibliografías expuestas y las aclaraciones de los agricultores en el sector de Huachi Chico el moho gris o pudrición nombres comunes dotados por los mimos, señalan que han tenido pérdidas hasta de un 50% ya sea en plantas y en frutas



cosechadas esta enfermedad avanza rápidamente sobre todo con la presencia de los vientos abarcando todo el cultivo a veces provocando severas podas.

3.1. IDENTIFICACIÓN DE SIGNOS Y SÍNTOMAS DEL HONGO FITOPATÓGENOS *Botrytis cinerea* EN EL CULTIVO DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus Benth*)

SÍNTOMAS: Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de su enfermedad (AGRIOS ,1995).

SIGNOS: Patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante (AGRIOS, 1995).

Tabla 6.- Síntomas de *Botrytis cinerea*.

SÍNTOMAS	
	
Fuente: INIAP.2009	Fuente: tomada por el Investigador.



Fuente: realizada por el Investigador.

Los síntomas provocados por este patógeno, incluyen: frutos de consistencia blanda, tizones en inflorescencias, pudrición en frutos, marchites del tejido, pústulas y manchas foliares, caída de plántulas, canchales en los tallos. Las lesiones pueden desarrollarse en cualquier punto de su superficie, pero en la mayoría de los hospedantes es más fácil que aparezcan en la corona o en la base de esos órganos. La enfermedad raramente ocurre en botones florales cerrados, pero cuando estos se abren las estructuras florales aparecen colonizadas. (AGRIOS, 1995).

Efectivamente como nos muestra la imagen del INIAP, los síntomas cuentan con una similitud corroborando con la descripción dada por AGRIOS, al causar la pudrición del fruto dentro de los racimos se encontraron frutos podridos con presencia de un moho gris, ocasionalmente provocando la caída de las hojas y flores, estos ataques pueden ocasionar las pérdidas de algunos brotes jóvenes, el cultivo muestra características como sarnamientos contando con la marchitez del tejido, se puede observar también cancro en los tallos no son comunes pero se da ya en un cultivo avanzado por esta enfermedad.

La diseminación de esta enfermedad se realiza mediante el viento las esporas volatilizan hasta llegar a una planta hospedera infecta principalmente a los órganos fructíferos de la planta (flores y frutos), pero también es capaz de originar pudriciones en todos los órganos de la planta.

Tabla 7.-Signos de *Botrytis cinerea*.

SIGNOS	
	
Fuente: INIAP, 2009	Fuente: tomada por el Investigador.

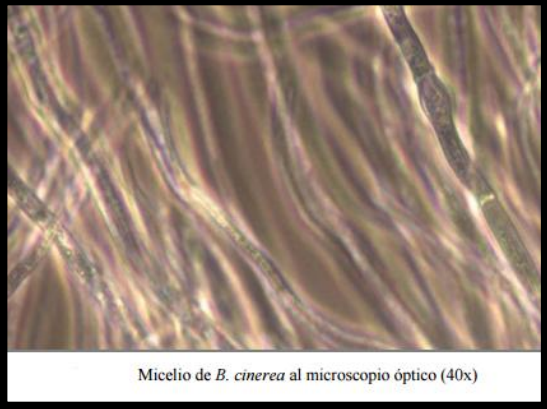
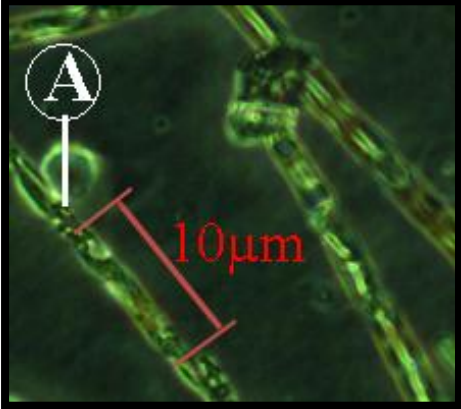
Fuente: realizada por el Investigador.

Los signos de *Botrytis cinerea* se produce un micelio blanquecino y de aspecto lanoso en el tejido infectado, el cual se vuelve gris durante la esporulación, lo cual puede ocurrir dentro de unos pocos días luego de que la infección se ha iniciado, las enfermedades causadas, por este hongo son comúnmente denominadas “pudrición gris” (RIBERA, 2007).

Entre la fotografía facilitada por el INIAP, y la cita bibliográfica de RIBERA, se pudo identificar que las características de los signos de esta enfermedad son autenticadas mostrando la presencia del micelio blanquecino lanoso tomándose a gris cubriendo totalmente la parte afectada, la presencia de esta característica se puede ver claramente en las fotografías teniendo presente al micelio frecuentemente en el fruto.

3.2.CARACTERIZACIÓN DE MACRO Y MICROESTRUCTURAS DEL PATÓGENO

Tabla 8.- Micelio de *Botrytis cinerea*.

Micelio Bibliografía.	Fot.(A) Micelio
 <p data-bbox="444 989 786 1010">Micelio de <i>B. cinerea</i> al microscopio óptico (40x)</p> <p data-bbox="298 1104 597 1138">(ESPINOSA.M. 2006.)</p>	 <p data-bbox="927 1104 1398 1465">Fotografía tomada utilizando el microscopio en campo oscuro Ph1, a una exposición de 500, con ganancia 5.3, gama 1, con el lente óptico de 20x. Se presenta el micelio distribuido en su totalidad similar a la fotografía bibliográfica.</p>

Fuente: Realizado por el Investigador.

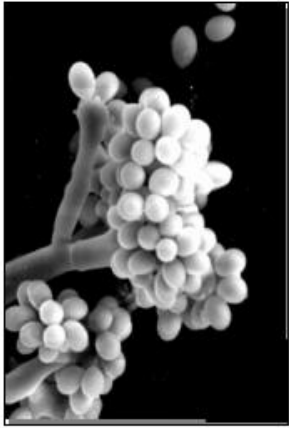
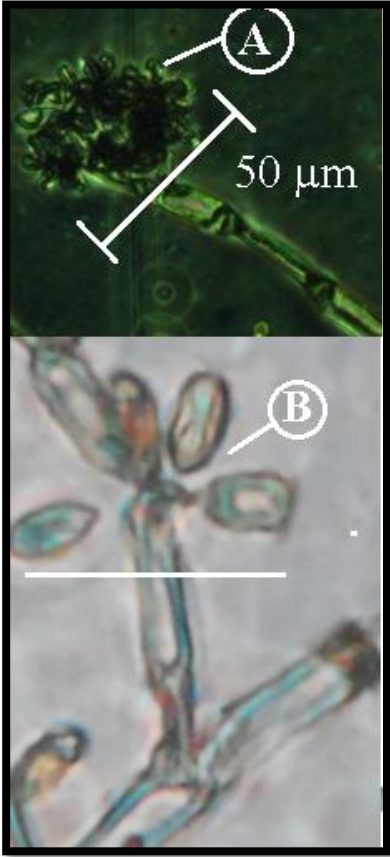
Micelio

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados cilíndricos que se multiplican vegetativamente mediante la división citoplasmática, siendo común que tenga lugar una división nuclear sin que haya producido división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas y el diámetro de las hifas son muy variables, dependiendo en gran medida de las condiciones de desarrollo del micelio (MOSHIN, 1990.).

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

A demás el micelio debe cumplir como una estructura de propagación de la enfermedad quien es causada por la dispersión de restos vegetales (tallos y hojas) infectados por el micelio, también se puede considerar una estructura de resistencia ya que esta puede sobrevivir por periodos y tiempos considerables.

Tabla 9.- Conidioforos de *Botrytis cinerea*.


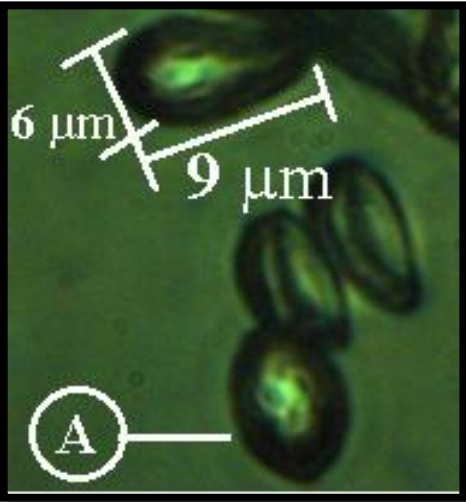
Conidioforo Bibliografía.	Conidioforo
<div data-bbox="305 436 829 968" style="border: 1px solid black; padding: 5px;">  <p data-bbox="321 888 808 953">Estructura del macroconidioforo de <i>B. cinerea</i> al: Microscopio óptico (4x),</p> </div> <p data-bbox="298 1360 597 1392">(ESPINOSA.M. 2006.)</p>	<div data-bbox="886 436 1273 1287" style="border: 1px solid black; padding: 5px;">  </div> <p data-bbox="873 1360 1404 1780">Fot. (A): esta fotografía concuerda con la de la bibliografía fue tomada en campo oscuro Ph1 a una exposición 500 con ganancia 5.1 a gama 1 con un lente óptico de 100x mayor aumento. Fot. (B): señala claramente la forma de los conidioforos tomados con un lente óptico de 100x en campo claro.</p>

Fuente: Realizado por el Investigador.

Conidióforos o macroconidioforos

Los conidióforos o macroconidioforos se originan principalmente de la masa hifal aunque también pueden hacerlo de los esclerocios, como se puede observar en las fotografías A y B. Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias. Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de esta, se disponen los conidios los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal, de manera que al separarse de este se quede una herida en la región de 50 μm . los conidios se forman a partir de la germinación de células formadoras de conidios, las cuales se sitúan en las vesículas globosas.

Tabla 10.- Conidio de *Botrytis cinerea*.

Conidio Bibliografía.	Fot. (A). Conidio
 <p>Conidios de <i>B. cinerea</i> al microscopio óptico (40X)</p>	 <p>6 μm 9 μm A</p> <p>Continúa....</p>

<p>Continúa.... (ESPINOSA.M. 2006.)</p>	<p>Claramente en la fotografía se observa que los conidios son ovalados, fotografía tomada en campo oscuro Ph1a una exposición 500 con ganancia 5 en gama 1 con el lente óptico de 100x de mayor aumento.</p>
--	---

Fuente: Realizado por el Investigador.

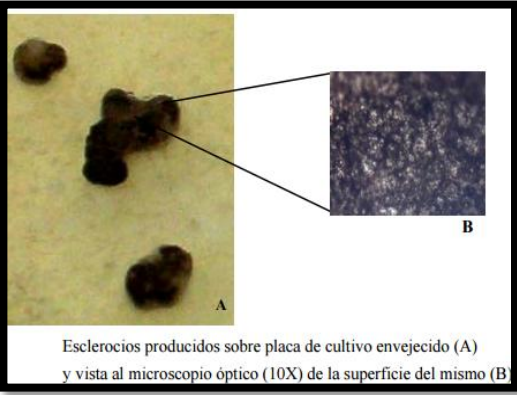
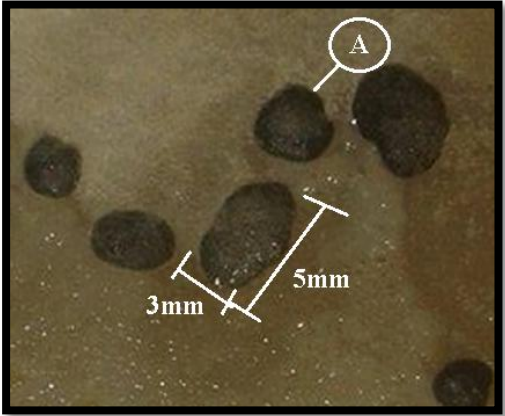
Conidios o macroconidios

Constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *Botrytis cinerea* son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante la etapa del crecimiento del cultivo (ELAD, et al., 2004).

Son estructuras ovaladas, globosas o elípticas, separadas del pedicelo por un septo transversal y sus dimensiones oscilan entre 6-8.4µm de sección transversal y los 8.8-11 µm de longitud.

Corroborando con la bibliografía de ELAD el conidio obtenido en la investigación mantiene las mismas características tanto como su forma, tamaño longitudinal 9µm de transversal de 6µm, conidio denominado eje principal de transmisión de infección de la enfermedad.

Tabla 11.- Esclerocios de *Botrytis cinerea* .

Esclerocio Bibliografía.	Fot. (A)Esclerocio
 <p>Esclerocios producidos sobre placa de cultivo envejecido (A) y vista al microscopio óptico (10X) de la superficie del mismo (B)</p> <p>(ESPINOSA.M. 2006.)</p>	 <p>En esta fotografía se puede observar un esclerocio envejecido teniendo dimensión longitudinal de 5mm y 3mm de diámetro acordando con las dimensiones mencionadas anteriormente en la bibliografía.</p>

Fuente: Realizado por el Investigador.

Esclerocios

Son las principales estructuras de resistencia de *Botrytis cinerea*, son órganos pluricelulares, de morfología plano-convexa, cuyas dimensiones oscilan entre 1-5mm de sección transversal y de 1-15 mm de sección longitudinal, dependiendo de las condiciones del cultivo, estas están compuestas por el 75% de carbohidratos, 10% de proteínas, 5% de glucosamina y 0.21 % de lípidos.


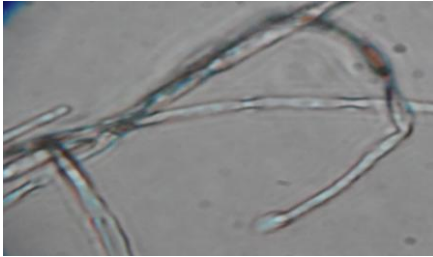
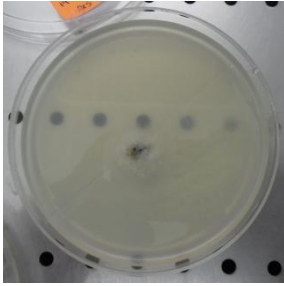

La presencia de los esclerocios se obtuvo en las cajas que ya permanecían días almacenados en la refrigeradora, contenían una contextura rígida de color gris se

puede observar que tiene distintas dimensiones, en uno de ellos se realizó las mediciones con una dimensión de 3mm y en longitud de 5mm. Estos esclerocios se mantienen latentes, manteniendo viva la enfermedad son utilizados para realizar un aislamiento de *Botrytis cinerea*.

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

Botrytis cinerea es un hongo pleomórfico, con una fase sexual o perfecta y una fase asexual o imperfecta, la cual se detecta con mayor frecuencia en la naturaleza y por tanto, la que se considera más ligada al desarrollo del hongo. Sin embargo, recientes estudios moleculares de la población han proporcionado evidencias de que la reproducción sexual ocurre más frecuentemente de lo que se pensaba hasta ahora (PRINS. et al., 2000).

Tabla 12.- Formación y Germinación, de *Botrytis cinerea* (Ciclo de vida).

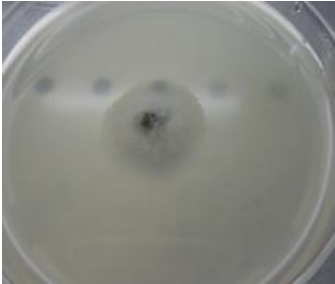
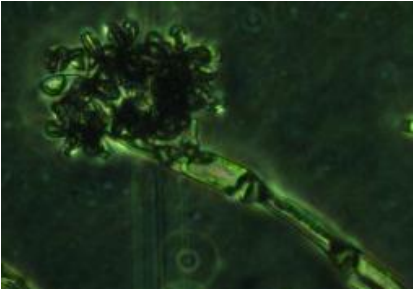

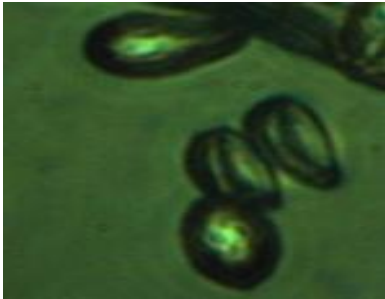
Actividad	Tiempo/horas	T°	imagen	microscopio
Formación de esclerocios	12 horas	15°C		
Germinación	18 horas	23°C		

Fuente: Realizada por el Investigador

Como se puede observar en la tabla 11, la primera etapa como es la formación de esclerocio tubo la presencia de invernadero micelio en condiciones favorables los esclerocios puede evolucionar de dos formas en forma de apotecios que encierran a los ascos y ascosporas la cual se da la reproducción sexual. Y en los en forma de conidióforo que son portadores de conidios que se trata de la reproducción asexual que es la más frecuente. En este caso el inóculo primario son las conidias, que son liberadas gracias a mecanismos higroscópicos, (AGRIOS, 2005; DOSS, R et. al.1995).

A continuación en el proceso de germinación en la fotografía microscópica se puede observar la germinación de un conidio y la formación del hongo iniciando como hifa alargada quien dará paso para el hospedaje de los conidióforos. El apotecio que ya se encuentra dentro de las ascas empieza a evolucionarse, la fase reproductiva de *Botrytis cinerea* es instantánea. Para dar paso al racimo de conidios más conidióforos.

Tabla 13.-Esporulación y Germinación de esporas de *Botrytis cinerea*(Ciclo de vida).

Actividad	Tiempo/horas	T°	imagen	microscopio
Esporulación	24 horas	23°C		
Germinación de esporas	28 horas	23°C		

Fuente: Realizado por el Investigador.

En la tabla 12, se obtiene ya la formación completa de conidios y conidióforos, ya que las ascosporas han sido germinadas para complementar el proceso evolutivo, el proceso de esporulación se dio a las 24 horas con una temperatura dentro de la incubadora de 23°C.

En la última fase que es proceso de germinación de esporas o conidios quienes son los medios reproductivos y de infestación del hongo, cuando el hongo se encuentra maduro se obtiene la formación de esclerocios estructura de resistencia puede mantener en latencia al hongo por un tiempo determinado dentro del medio de cultivo toman un color gris con textura endurecida, si las condiciones del medio son las adecuadas las ascosporas pueden llegar a germinar y dar lugar a un nuevo micelio.

4. CONCLUSIONES

- Se determinó que *Botrytis cinerea* es un principal patógeno de mayor impacto el cual limita la comercialización y producción de mora de castilla *Rubus glaucus Benth*, corroborando con (MARTÍNEZ. A, 2007), quien menciona *Botrytis cinérea* ha afectado seriamente al cultivo habiéndose inclusive desalentado a agricultores teniendo como perdida de un 95% de frutos después de 48 horas de ser cosechados.
- Se identificó las muestras recolectadas en campo, presentando signos y síntomas de *Botrytis cinerea* conocida como pudrición gris, enfermedad que puede presentarse tanto de forma endógena (desarrollo interno), como de forma exógena (desarrollo de afuera hacia adentro).
- Disponiendo de libros, protocolos de la enfermedad *Botrytis cinerea* gracias a se caracterizó macroestructuras como micelio midiendo 10 μ m y esclerocios con tamaño longitudinal 5mm y de tamaño transversal de 3mm y microestructuras como conidióforos con su tamaño radial de 50 μ m y conidios con tamaño longitudinal 9 μ m y de tamaño transversal de 6 μ m, con la utilización del microscopio trinocular CX31 observando en los lentes de 20x y 100x.
- En condiciones de laboratorio, manteniendo las temperaturas sugeridas (15°C y 23°C) que se manejó en la incubadora para el cultivo de *Botrytis cinerea*, se complementó el ciclo de vida en 28 horas permitiendo describir el desarrollo de la formación del hongo.
- Obteniendo los datos necesarios de la investigación se desarrolló una guía didáctica, detallando la caracterización morfológica de *Botrytis cinerea*.

5. RECOMENDACIONES

- Considerando que (*Botrytis cinérea*) es una de las enfermedades más peligrosas debido a su gran velocidad de reproducción, se debe realizar protocolos de manejo material desechado por podas del cultivo, ya que esta enfermedad forma esclerocios quien pueden mantener al hongo en latencia por un largo tiempo.
- Se recomienda utilizar los protocolos de asepsia en laboratorio para evitar contaminación y poder así identificar el hongo en estudio.
- Se debe realizar un seguimiento minucioso para ir identificando ciertas estructuras desde la inoculación (siembra) hasta su esporulación, manejando temperaturas que ayuden a obtener su desarrollo en un menor tiempo.
- Difundir los resultados de la investigación mediante la exposición de la guía didáctica.
- Se recomienda continuar con esta investigación para profundizar el hongo en estudio.

6. GLOSARIO TÉCNICO

Actinomorfo.- flores que pueden dividirse en mitades simétricas por dos planos distintos a lo menos.

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

Aislamiento.- Separación de un patógeno a partir de un hospedante y su cultivo en un medio nutritivo.

Anamorfo: es un estado reproductivo asexual en el que se produce anamorfos. Para rizar aún más el rizo, cuando dichos anamorfos no son iguales se denomina sinanamorfos.

Aquenios.-Un aquenio o aqueno es un tipo de fruto seco producido por numerosas especies de plantas. Los aquenios son monocarpelados, forman un único carpelo, e indehiscentes, no se abre al madurar.

Biótrofos: infectan su huésped sin causar muerte celular, ya que necesitan mantenerlo vivo para cumplir su ciclo de vida.

Brácteas.-La bráctea es el órgano foliáceo en la proximidad de las flores y diferente a las hojas normales. A pesar de ser verdes (pueden ser de otro color), su función principal no es la fotosíntesis, sino proteger las flores o inflorescencias.

Cepa.- Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro; aislado; grupo de aislados similares; una raza.

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

Conidióforos.-Es una estructura microscópica especializada en la producción asexual de miles de esporas llamadas conidios. Se localizan en el extremo de hifas las cuales levantan el conidióforo en el aire con el fin de esparcir las esporas con más eficiencia.

Enfermedad.- Cualquier mal funcionamiento de las células y tejidos del hospedante, que resulta de la irritación continuada por un agente patogénico o factor ambiental y que lleva al desarrollo de síntomas.

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.

Facultativo.- que puede hacerse o dejar de hacerse sin voluntad.

Fitopatógenos.-Se denomina a un organismo, en general microorganismo, que causa enfermedades en las plantas por medio de disturbios en el metabolismo celular causado por la secreción de enzimas, toxinas y otras sustancias.

Hialino.-Que es transparente como el vidrio.

Hifa.- Ramificación simple de un micelio.

Holomorfo: cuando el hongo está desarrollado, incluyendo su estado anamorfo o teleomorfo

Hongos.-Los hongos son un grupo de seres vivos diferentes de las plantas y de los animales, razón por la cual se clasifican en un reino aparte llamado fungí. La ciencia que los estudia se llama Micología (Mykes=Hongo y Logos=Estudio).

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

Infestación.- Se denomina a la invasión de un organismo vivo por agentes parásitos externos o internos

Madurez fisiológica.-Cuando una fruta ha logrado un estado de desarrollo en el cual ésta puede continuar madurando normalmente para consumo aún después de cosechada.

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.

Mitospóricos.-Los hongos Mitospóricos, también llamados deuteromicetes, hongos imperfectos o anamorfos, carecen de fase sexual.

Necrótrofos: matan a las células de su huésped y descomponen el tejido para utilizarlo en su crecimiento.

Propiónico.-Es un ácido carboxílico monopólico tiene características físicas intermedias entre las de los ácidos carboxílicos más pequeños (como el ácido fórmico y acético), y los ácidos grasos más grandes.

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

Rizomorfos.- Haz de hifas de consistencia correosa y cierto grado de resistencia por engrosamiento de las paredes celulares.

Semiperemne.-Dicho de un vegetal, que pierde parcialmente el follaje se aplica también a la hoja Viene a ser equivalente a semicaduco.

Septado.- Que presenta septos o tabiques transversales, que dividen la estructura en unidades celulares.

Signo.-Patógeno o sus partes o productos que se observan sobre una planta hospedante.

Síntoma.- Reacciones o alteraciones internas y externas que sufre una planta como resultado de una enfermedad.

Teleomorfo: es un estado reproductivo sexual.

Trifoliadas.-Se dice de las hojas compuestas de tres folíolos, así como de las plantas que tienen esas hojas.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G. 1995.** Fitopatología. México: LIMUSA. 273 p.
- Agrios, G. 1997.** Fitopatología. . México: LIMUSA. 285 p.
- Agrios, G. 1999.** Fitopatología. 2a. ed. México: LIMUSA. 273 p
- Agrios, G. 2005.** Plant Pathology. Nueva York. Academic press.p
- Agrios, G. 2007.** Fitopatología. México: LIMUSA. 285-290 p.
- Calzada, B. 2002.**143 Frutales nativos. 1era. ed. Lima: Edit. “El Estudiante”. 316 p.
- Castro, D.; Hernández, M.;Monsalve, L. 1995.** Determinación de los Periodos de Desarrollo Productivo del Fruto de la Mora de Castilla (*RubusglaucusBenth.*) en Plantas Producidas por Acodos de Plantas Propagadas in vitro y Plantas Propagadas por Acodos Tradicionales. Antioquia, CO. Universidad Católica de Oriente. 8 p.
- Castro, R. y Díaz, G. 2001.**”Alternativas para el manejo integrado del cultivo de la mora de castilla (*RubusglaucusBenth*)”. Antioquia, CO. Universidad Católica de Oriente. P.28-34
- De la Cadena, J. y Orellana, A. 1984.** El cultivo de la mora: Manual del Capacitador. Quito, EC. Instituto Nacional de Capacitación Campesina. 116 p.
- Doss, R. P., Potter, S. W., Soeldner, A. H., Christian, J. K. & Fukunaga, L. E. (1995).** Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. Applied and Environmental Microbiology 61, 260-265.
- Duque,C.; Mayorga,H.; Knapp,H.; Winterhalter,P.; Bautista,E.; Morales,A. 2005.** El aroma frutal de Colombia . Colombia : Univ. Nacional de Colombia, 2005. 345p.

Elad, Y. (1997). Effect of filtration of solar light on the production of conidia by field isolates of *Botrytis cinerea* and on several diseases of greenhouse-grown vegetables. *Crop Protection* 16, 635-642.

Espinosa, M. 2006. Estudio de la Variabilidad Genética y Organización Cromosómica en el Hongo Fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Cádiz. 223p.

Forero de la Rotta, M.C y Muñoz V, H. 2001. Enfermedades de la mora de castilla. Boletín de Sanidad Vegetal N° 34 Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Produmedios. Bogotá. 36 pp.

Franco, G. 2002. El cultivo de la mora. Manizales, CO. CORPOICA. 130 p

Gómez, P. L. M. 2001. Desarrollo de un estudio epidemiológico en *Botrytis cinerea*, agente causal del moho gris en mora de castilla *Rubus glaucus* Benth., en los municipios de Manizales y Villa María. Manizales.

Hausbeck M.K. y G.W. Moorman. 1996. Managing *Botrytis* in greenhouse grown flower crops. *Plant Diseases*, 80:

Herrera, L. y Mayea, S. 1994. Fitopatología General. La Habana: Editorial Félix Varela “El Vedado”. 290-291 p.

INEC (Instituto Nacional De Estadísticas Y Censos, EC). 2000. III Censo Nacional Agropecuario. Quito, EC. 255 p.

INIAP (Instituto Nacional Autónomo De Investigaciones Agropecuarias, EC). 2009. Informe anual, Programa de Fruticultura. Quito, EC. 126 p.

M.C.D. LAB. Potato Dextrosa Agar . [En línea] 16 de Marzo de 2007. [Citado el: 30 de Octubre de 2012.] http://www.mcd.com.mx/pdfs/agar_dextrosa_papa.pdf

Martínez, A y Beltrán, O. 2007. Manual del cultivo de la mora de castilla (*Rubus glaucus* B). Ambato, EC. INIAP. 36 p.

Montalvo, D. 2011. Evaluación de calidad poscosecha de las accesiones seleccionadas de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*) provenientes de la provincia de Tungurahua y Bolívar. Tesis de grado. Quito, EC. Escuela Politécnica Nacional. 171 p.

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

Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. & Van Kan, J. A. L. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. En: J. W. Kronstad, (Ed), Fungal Pathology, Kluwer Academic Publishers., 33-64.

Popenoe, w. 1921. "Folleto Economic Fruit Bearing Plaust of Ecuador".

Ribera, A. 2007. Evaluación y Caracterización de la Actividad Antifúngica de la Especie Quillaja saponaria Mol. Cultivada In Vitro en *Botrytis cinerea* Pers. (En línea). Tesis para Doctor en Ciencias de Recursos Naturales, Universidad de la Frontera. 198 p. Consultado el 8 de oct. 2010. Disponible en: rnn.agroindustria.dm.cl/download_tesis.php?id....d

Romoleroux, K. 1991. Diversidad de las moras (*Rubus*spp.) en el Ecuador: Un recurso filogenético poco explotado. Quito, EC. 166p.

Rota, M. 2001. Blackberry and Raspberry (*Rubus spp.*).Editorial Routledge. Nueva York, USA. 104 p.

Ruiz, E. 2008. Evaluación de Fungicidas Sistémicos para el control del Mildiú Velloso (*Pseudoperonospora cubensis* Berk. & Curt.) Rost. en el Cultivo del Melón (*Cucumis melo* L.). Universidad Autónoma Chapingo. Consultado el 10 de jul. 2011. Disponible en: redalyc.uaemex.mx/pdf/609/60914110.pdf

Sánchez, M. 2002. Evaluación de un Producto Biológico, dos Ecológicos y dos Químicos para el Control de Botrytis cinerea en Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). Tesis Ing. Agropecuario Sangolquí – Ecuador. IASA (Instituto Agropecuario Superior Andino) ESPE.

Syngenta. 2007. Botrytis cinerea Boletín técnico. 50 p.

Tamayo, P. 2001. Principales enfermedades del tomate de árbol, mora, lulo. Antioquia, CO. CORPOICA. 38 p.

Tamayo, P.J. 2003. Principales enfermedades del tomate de árbol, la mora y el lulo en Colombia. Boletín Técnico N° 20. Corporación Colombiana de investigación Agropecuaria, CORPOICA, Regional N° 4 - Alcaldía de Medellín. 20 pp.

Zamorano,A.; Morillo,A. y.; Morillo, H.; Vásquez, J.; Muñoz. 2007. Caracterización morfológica de mora en los departamentos de Valle del Cauca, Cauca y Nariño, de Colombia. Acta Agronómica 56: 51-60.

8. ANEXOS

Anexo 1.-Costos

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
Materiales de aseo			
Escoba	1	2	2
Trapeador	2	3	6
Franela	2	4,5	9
Papel de cocina	2	3,5	7
Zapatones	15	0,35	5,25
Guantes	15	0,25	3,75
Mascarillas	15	0,25	3,75
Cofias	15	0,3	4,5
Reactivos de aseo			
Kalipto	1	4,3	4,3
Alcohol	1	5,5	5,5
Yodo	1	3,6	3,6
Material de laboratorio			
Pinzas	1	2,08	2,08
Lámpara de alcohol	3	3,99	11,97
Laminas porta-objetos	1	2,99	2,99
Cubre objetos	1	2,5	2,5
Hojas de bisturí estéril	10	0,04	0,4
Vasos de precipitación de 50ml, 100ml, 600ml y 1000ml.	4	2,5	10
Erlenmeyer d 500ml y 1000ml.	3	5	15
Asa de incubación de cromo	2	3,6	7,2 Continúa...

Continúa...			
Cajas mono petrií descartables	40	0,21	8,4
Papel parafilm	0,5	49	24,5
Juego de botellón de agua	1	28	28
Papel aluminio	1	3	3
Cajoneras de plástico	1	7,5	7,5
Colador	1	2	2
Tijeras	1	1,5	1,5
Cintas de pH	10	0,14	1,4
Varilla de agitación	1	3,5	3,5
Olla	1	4	4
Reactivos de laboratorio			
Bacto agar	0,5	88	44
Agua	1	2	2
Levadura	1	2	2
Sacarosa	1	2	2
Ácido Cítrico	1	2,5	2,5
Equipos			
Refrigeradora R1-425 QUARZO INDURAMA	1	767,97	767,97
Incubadora IN110	1	2665,7	2665,7
Microscopio Trinocular CX31	1	2455,68	2455,68
Cámara de flujo laminar aurora mini con base	1	6690	6690
Autoclave semiautomática 2540-23 litros	1	2999,47	2999,47
Destilador de agua waterwise 9000	1	511,3	511,3
Cámara científica infinity 1-2CB	1	2176,56	2176,56
Desecador 250mm de diámetro con tapa	1	229,8	229,8
			Continúa...

Continúa...			
Cocineta eléctrica	1	30	30
			280
Cámara digital	1	280	
Balanza	1	30	30
Termómetro digital	1	25	25
SUBTOTAL			19104,57
Imprevistos (10%)			1910,457
COSTO TOTAL			21015,027

Anexo 2.-Medio de cultivo

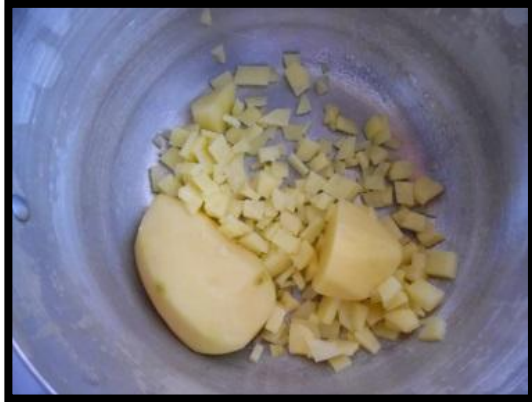
PAPA DEXTROSA AGAR (PDA)

- Papas partidas 250g
- Dextrosa 10g
- Agar 20g
- Agua destilada 1000 ml

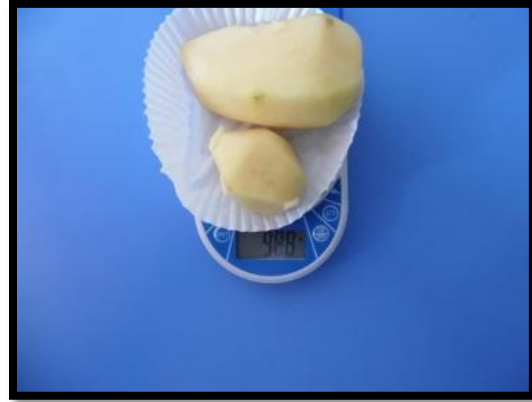
Preparación: se hierven las papas en 500 a 750 ml de agua destilada durante 15 a 20 minutos. La suspensión se filtra y se pasa por una gasa. Este filtrado se coloca en un matraz, se le agrega la dextrosa y el agar, y luego se afora con agua destilada hasta 1000 ml. Se sella el matraz con un tapón de algodón o papel de aluminio y se esteriliza. Se deja enfriar un poco y se vacía la suspensión en cajas de Petri (llenando a la mitad). Conforme se van llenando, las cajas se apilan para evitar la condensación.

Anexo 3.-Preparación del medio de cultivo PDA.

Picado de la papa



Pesado de la papa



Colocar los 125ml de agua



hervir por 15 minutos



Colar en un vaso de precipitación



Pesar la levadura, agar y la dextrosa



Colocar los ingredientes medidos anteriormente



Colocar en el vaso de precipitación que bien disueltos



Colocar en los erlenmeyers



Asegurar con papel aluminio



Colocar dentro del autoclave



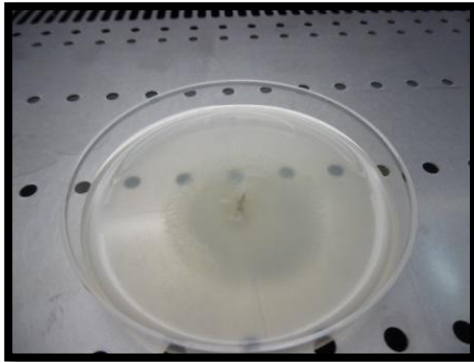
Colocar en las cajas petri



Anexo 4.-Recoleccion de las muestras.



Anexo 5.-Cultivo Botrytis cinerea



Anexo 6.-Visita del tutor al laboratorio.

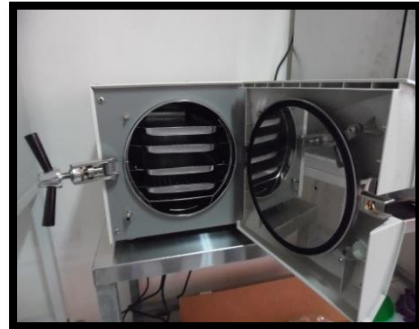


Anexo 7.-Materiales y equipos.

Camara de crecimiento o Incubadora



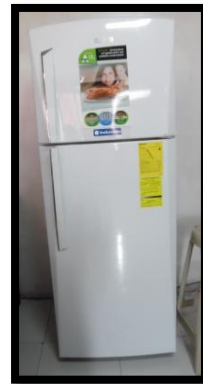
Autoclave



Cuenta colonias



Refrigeradora



Microscopio



Cámara de flujo laminar



Cocina



Destilador de agua



Cámara húmeda



materiales



Anexo 8.- Guía Didáctica.



UNIDAD ACADÉMICA DE RECURSOS AGROPECUARIOS Y RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**GUÍA DIDÁCTICA DE LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE
Botrytis cinerea EN EL CULTIVO DE MORA DE CASTILLA *Rubus glaucus*
*Benth.***

AUTOR: PATRICIA ELIZABETH BANDA VICHICELA

ÍNDICE

- Introducción
- Fundamentación
- Objetivo
- Ubicación
- Bloque I. Metodología
- Bloque II. Resultados
- Material de consulta sugerida

INTRODUCCIÓN:

A lo largo de la producción de frutas, verduras, legumbres, hortalizas, etc. Se determinan que existen ciertos problemas limitantes para la producción de las mismas, considerando a una fruta de gran potencialidad de comercialización cultivada en la provincia de Tungurahua sector Huachi Chico, tenemos el cultivo de mora de castilla *Rubus glaucus Benth*, esta fruta sin excepción presenta un sinnúmero de problemas principalmente identificado como es *Botrytis cinerea*, esta enfermedad es una de las más limitantes del cultivo de la mora de castilla *Rubus glaucus Benth*. Por lo consiguiente se elaboró una Guía didáctica que aportara técnicamente como es el hongo, su ciclo de vida métodos de propagación medios a desarrollarse, morfología con esta información se puede acercar más a la realidad para tener en consideración en que momento poder controlar al patógeno con ello mejorar la productividad económica de los productores.

FUNDAMENTACIÓN:

En el Ecuador existen aproximadamente 5247 Ha de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*), y en su mayor parte se encuentra en manos de pequeños y medianos productores, con promedios que van desde 200 hasta 2000 plantas en producción; las zonas productoras están en el callejón interandino entre los 2200 – 3200 m.s.n.m., en las provincias de: Tungurahua, Cotopaxi, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (MARTÍNEZ Y BELTRÁN 2007).

Tungurahua, es la principal zona productora con un 70% de superficie plantada (3673 Ha), y un rendimiento por hectárea de 5,45 t (INIAP, 2009).

La incidencia y severidad del moho gris es variable según la época del año y la zona de producción, aumentando durante la temporada invernal, debida a que la alta humedad relativa hace que el hongo esporule rápidamente. Las principales fuentes de inóculo

Ingeniería
Agronómica

primario son las conidias (esporas asexuales) que provienen de la germinación de los esclerocios (estructuras de supervivencia), formados sobre tallos de mora en descomposición, además del micelio formado en hojas muertas y frutos momificados (HAUSBECK, 1996).

Síntomas se manifiestan principalmente en las estructuras reproductivas de la planta y pueden ocasionar la pérdida total de la producción. Las flores afectadas presentan coloraciones pardas en los pétalos (GÓMEZ, 2001).

Diseminación el hongo se establece en los pétalos de la flor, los cuales son particularmente susceptibles cuando comienzan a envejecer y ahí produce micelio abundante (AGRIOS, 1997).

Control la recolección y quema del material enfermo. El Boro ayuda al control de este patógeno, podas de formación, control químico con benzoato de sodio, fungicidas a base de procimidona entre otros. (OLEAS, 2001)



OBJETIVO:

Desarrollar una guía didáctica con la caracterización morfológica de *Botrytis cinérea* bajo condiciones controladas en el laboratorio permitiéndonos conocer macro y microestructuras del hongo en estudio.

UBICACIÓN:

UBICACIÓN DEL LABORATORIO

- **Sitio:** Salache Bajo
- **Parroquia:** Eloy Alfaro
- **Cantón:** Latacunga
- **Provincia:** Cotopaxi
- **Latitud:**
- N: 9888.749,37.
- E: 764.660,386.
- **Altitud:** 2757,59 msnm.

BLOQUE I. METODOLOGÍA:

1. Recolección de la muestra en campo

Las muestras fueron recolectadas en la parroquia de Huachi Chico cantón Ambato provincia Tungurahua, donde se tomaron las suficientes muestras de mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*), quienes presentaban signos y síntomas de *Botrytis cinerea* conocida también como moho gris o pudrición conocido y nombrado así por los agricultores del sector.

Al contar con el material suficiente y utilizando cuidadosamente cada una de las muestras fueron almacenadas en fundas tetrapac, fundas de papel y en tarrinas para evitar el maltrato y contaminaciones, el transporte de las muestras se realizó en una hora y media de camino desde el sitio de recolección hacia el laboratorio.



Fig. 1 Frutas con presencia de *Botrytis cinerea*



Fig. 2 Plantas con signos y síntomas de *Botrytis cinerea*.

2. Almacenamiento y tratamiento de las muestras en el laboratorio.

Al tener las muestras en el laboratorio se procedió a colocarlas en el refrigerador temperaturas entre 4 a 5 °C, con objeto de que el material contenido con el patógeno se mantenga vivo, siendo indispensable para la utilización para las siembras necesarias, teniendo a consideración que *Botrytis cinerea* le favorece las condiciones bajas en temperaturas pudiendo almacenarse en material como hojas tallos y flores hasta unos 15 días mientras tanto que al tratarse de los frutos no más de 6 días.



Fig. 3 Muestras con *Botrytis cinerea* colocadas y etiquetadas en fundas tetrapac.



Fig. 4 Frutas con *Botrytis cinerea* colocadas en fundas tetrapac y tarrinas plásticas

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

Es un medio útil para valorar el aspecto morfológico y es de uso generalizado para el aislamiento de los hongos.

Paso1

En un vaso de precipitación medimos 500ml de agua de botellón, se recomienda utilizar este tipo de agua para evitar contaminaciones de bacterias pero teniendo en consideración que el pH óptimo para la preparación del medio es de 6.5 teniendo un rango de acidez para evitar la presencia de bacterias para bajar el pH se puede utilizar ácido cítrico.

Paso2

Se procede a pesar 200gr de papa pelada, en una olla picar la papa en cuadraditos para que sea más fácil la remoción del almidón durante la cocción, previamente la papa lista se coloca el agua en la olla y se procede a dejar que hierva durante 10 minutos.



Fig.5 paso1. 500ml de agua



Fig.6 paso2. Procedimiento de la papa, colocación de 500ml de agua

Paso3.



Fig.7 paso3. 15 gr. de agar, 20 gr. de dextrosa o sacarosa y 2 gr. de levadura



Fig. 8 paso3. Colocación y mezcla de las sustancias

Mientras tanto procedimos a pesar 15 gr. de agar, 20 gr. de dextrosa o sacarosa y 2 gr. de levadura sustancias que complementaran el medio, se obtiene ya los 10 minutos de cocción de la papa se tamiza en un vaso de precipitación, al instante se contabiliza la medida inicial al no contar con ello se complementa el agua que se perdió mediante la evaporación, se coloca a fuego lento de 2 a 3 minutos con ello enseguida se coloca los materiales previos medidos, con la barita de agitación se meste a dirección de las manecillas del reloj evitando que esta se condense con pequeñas partículas de masa.

Paso4.

Obtenida la mezcla homogénea se coloca en el erlenmeyer de 500ml tapando con papel aluminio para que esta no se derrame en el interior de la autoclave mismo que es expuesto a un tiempo de 35 minutos necesariamente para que sea esterilizado.



Fig. 9 paso4. Medio de cultivo colocados homogéneamente, en los erlenmeyer de 500 ml, los mismos tapados con papel aluminio.



Fig. 10 paso4. Colocado en el autoclave 35 minutos.

Paso5.

Una vez cumplido el tiempo necesario en el autoclave el medio de cultivo es colocado cuidadosamente en las cajas petri, determinando que ocupe una capa que cubra la parte superior de caja.



Fig. 11 paso5. Colocar las cajas Petri en posición adecuada para colocar el PDA.

Ingeniería
Agronómica

4. Siembra

La siembra luego de unos 10 minutos después de haber colocado el medio de cultivo en las cajas ya se obtiene el cuajado de la mezcla, consiguiendo con ello el estado adecuado para realizar la siembra, se coloca las cajas dentro de la cámara de flujo laminar conjuntamente con las muestras una vez previamente desinfectado todos los materiales a utilizar, se toma una parte de la muestra y se coloca dentro del medio misma que debe ser tapada y sellada con el parafilm evitando la entrada de contaminantes.



Fig. 12 utilizando la cámara de flujo laminar se realiza la siembra.

5. Cultivo del hongo *Botrytis cinerea*

Son colocadas las cajas petri en la incubadora a una temperatura regulada de 15°C y 23°C la que infiere para la proliferación del hongo *Botrytis cinerea*. Estas son monitoreadas constantemente para ir observando el crecimiento del hongo o al mismo tiempo si alguna caja fue contaminada se debe detectar al instante ya que se requiere un cultivo sano y libre de contaminaciones.



Fig. 13 las cajoneras con los cultivos dentro de la incubadora

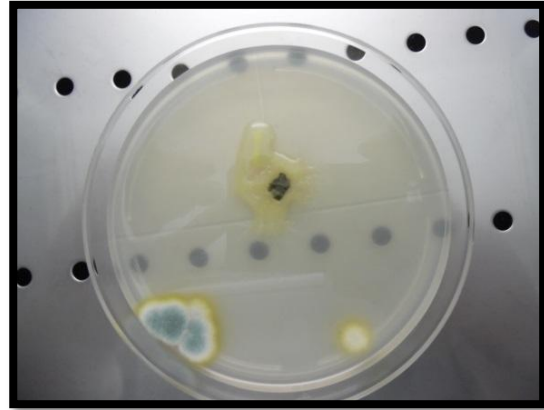


Fig. 14 presencia de bacteria y endógenos contaminantes.

6. Identificación

Se prevé utilizando material bibliográfico y mediante el microscopio y por ende teniendo un cultivo limpio y listo para su identificación.

Utilizando la cinta pegante: Se realizó un dobléz de una tira de cinta de 4 cm, con el lado adhesivo hacia fuera y se sostuvo con una pinza. Con el lado adhesivo se tomó con mucho cuidado una pequeña muestra de la colonia del hongo *Botrytis cinerea*, después se colocó una gota de agua destilada sobre el portaobjetos y se procedió a pegar la cinta sobre el portaobjetos para luego ser observado en el microscopio con un aumento de 20x y 100x.



Fig. 15 Placas previamente etiquetadas con muestras de *Botrytis cinerea*.



Fig. 16 Observando las placas con muestras de *Botrytis cinerea* en el microscopio.

7. Caracterización

Se obtiene un cultivo en las cajas petri totalmente limpio con la presencia del hongo que se busca *Botrytis cinerea* mismo que será útil para el desarrollo de la investigación, se procedió a realizar las suficientes placas y ser observadas en el microscopio, se trata de ir tomando foto tras foto con la cámara integrada en el microscopio, o para una mayor eficacia directamente con la cámara digital.

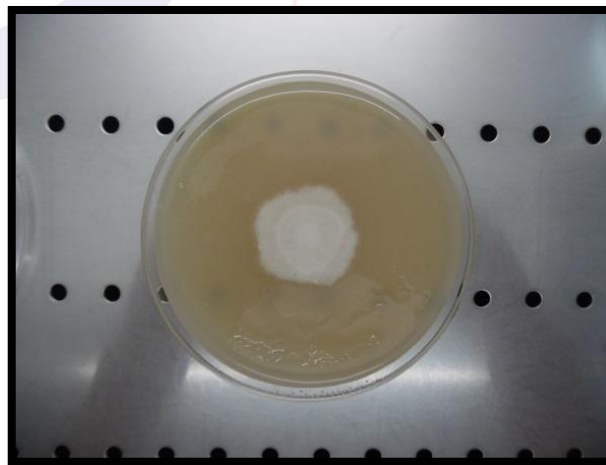


Fig. 17 Cultivo de *Botrytis cinerea*

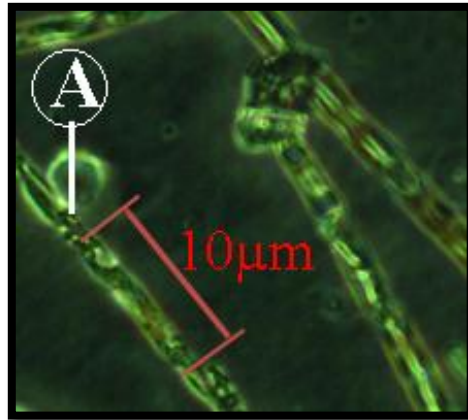
BLOQUE II. RESULTADOS:

CONCEPTUALIZACIÓN	INDICADOR	ÍNDICE	TÉCNICAS	INSTRUMENTO
Caracterización morfológica de hongos fitopatógenos en el cultivo de mora	Talo	Tipo	Observación	Microscopio
	Hifas	Tipo		
	Esporas	Tipo		
	Reproducción	Tipo		

MACRO Y MICRO ESTRUCTURAS DEL HONGO

Micelio

El micelio está constituido por un conjunto de hifas o filamentos tabicados cilíndricos que se multiplican vegetativamente mediante la división citoplasmática, siendo común que tenga lugar una división nuclear sin que haya producido división citoplasmática, lo que da lugar a hifas cenocíticas y el diámetro de las hifas son muy variables, dependiendo en gran medida de las condiciones de desarrollo del micelio (MOSHIN, 1990.).



Fotografía (A) tomada utilizando el microscopio en campo oscuro Ph1, a una exposición de 500, con ganancia 5.3, gama 1, con el lente óptico de 20x. Se presenta el micelio distribuido en su totalidad midiendo 10µm.

Conidióforos o macroconidióforos

Los conidióforos o macroconidióforos se originan principalmente de la masa hifal aunque también pueden hacerlo de los esclerocios. Su estructura consta de un microfilamento más o menos recto, que se ramifica en la zona apical de forma alterna; las ramificaciones constan a su vez de ramificaciones secundarias. Las distintas ramificaciones poseen en su zona terminal, un engrosamiento o vesícula globosa y sobre la superficie de esta, se disponen los conidios los cuales están separados del conidióforo por un septo transversal, de manera que al separarse de este se quede una herida en la región de 50 µm. los conidios se forman a partir de la germinación de células formadoras de conidios, las cuales se sitúan en las vesículas globosas.

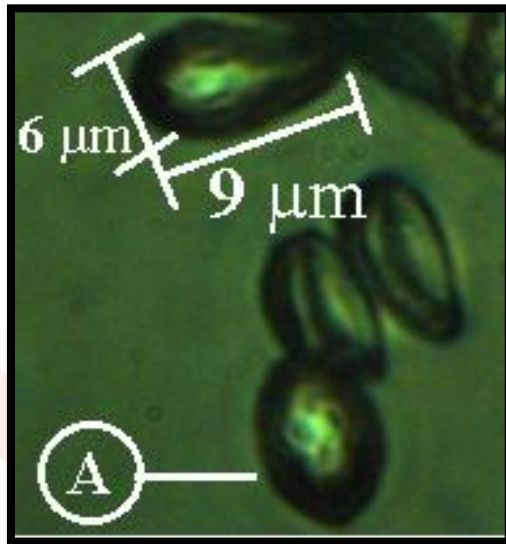


Fotografía (A). Esta fotografía concuerda con la de la bibliografía fue tomada en campo oscuro Ph1 a una exposición 500 con ganancia 5.1 a gama 1 con un lente óptico de 100x mayor aumento. Fotografía (B). Señala claramente la forma de los conidióforos tomados con un lente óptico de 100x en campo claro.

Conidios o macroconidios

Constituyen la principal estructura de dispersión del hongo así como, una de las estructuras de resistencia que presenta *Botrytis cinerea* son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva durante la etapa del crecimiento del cultivo (ELAD, et al., 2004).

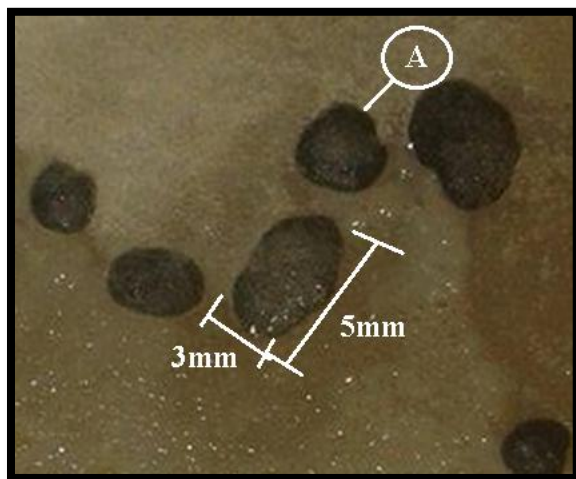
Son estructuras ovaladas, globosas o elípticas, separadas del pedicelo por un septo transversal y sus dimensiones oscilan entre 6-8.4 μm de sección transversal y los 8.8-11 μm de longitud.



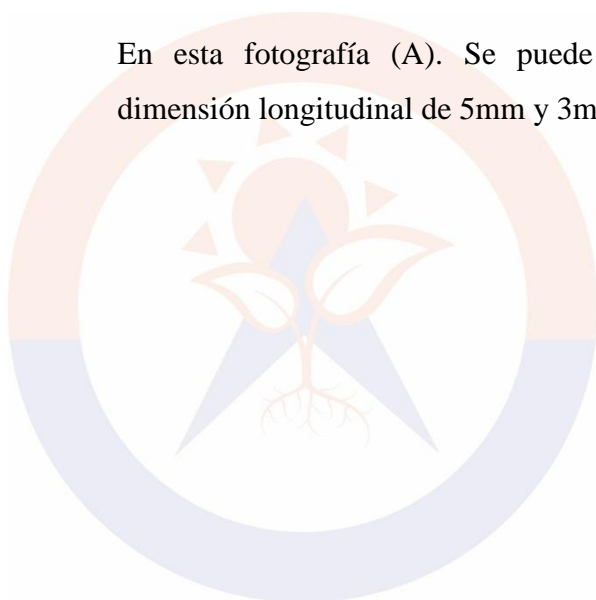
Claramente en la fotografía (A). Se observa que los conidios son ovalados, fotografía tomada en campo oscuro Ph1a una exposición 500 con ganancia 5 en gama 1 con el lente óptico de 100x de mayor aumento.

Esclerocios

Son las principales estructuras de resistencia de *Botrytis cinerea*, son órganos pluricelulares, de morfología plano-convexa, cuyas dimensiones oscilan entre 1-5mm de sección transversal y de 1-15 mm de sección longitudinal, dependiendo de las condiciones del cultivo, estas están compuestas por el 75% de carbohidratos, 10% de proteínas, 5% de glucosamina y 0.21 % de lípidos.



En esta fotografía (A). Se puede observar un esclerocio envejecido con una dimensión longitudinal de 5mm y 3mm de diámetro.



Ingeniería Agronómica

MATERIAL DE CONSULTA SUGERIDO:

Agrios, G. N. (1997). Plant Pathology. Academic Press. San Diego. California, USA., 362-363.

Elad, Y. & Stewart, A. (2004). Microbial Control of Botrytis spp. Ed.: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. Botrytis: Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, 223-241.

Gomez, P. L. M. 2001. Desarrollo de un estudio epidemiológico en Botrytis cinerea, agente causal del moho gris en mora de castilla *Rubus glaucus* Benth., en los municipios de Manizales y Villa María. Manizales.

Hausbeck M. K. y G. W. Moorman. 1996. Managing Botrytis in greenhouse grown flower crops. Plant Diseases, 80:

INIAP (Instituto Nacional Autónomo De Investigaciones Agropecuarias, EC). 2009. Informe anual, Programa de Fruticultura. Quito, EC. 126 p.

Martínez, A., Beltrán, O. (2007). Manual del cultivo de la mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth). Primera Edición INIAP. Ambato, Ecuador.

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

Oleas, A. 2001. Tratado de fertilización. Madrid, Mundi-Prensa. 585 p.