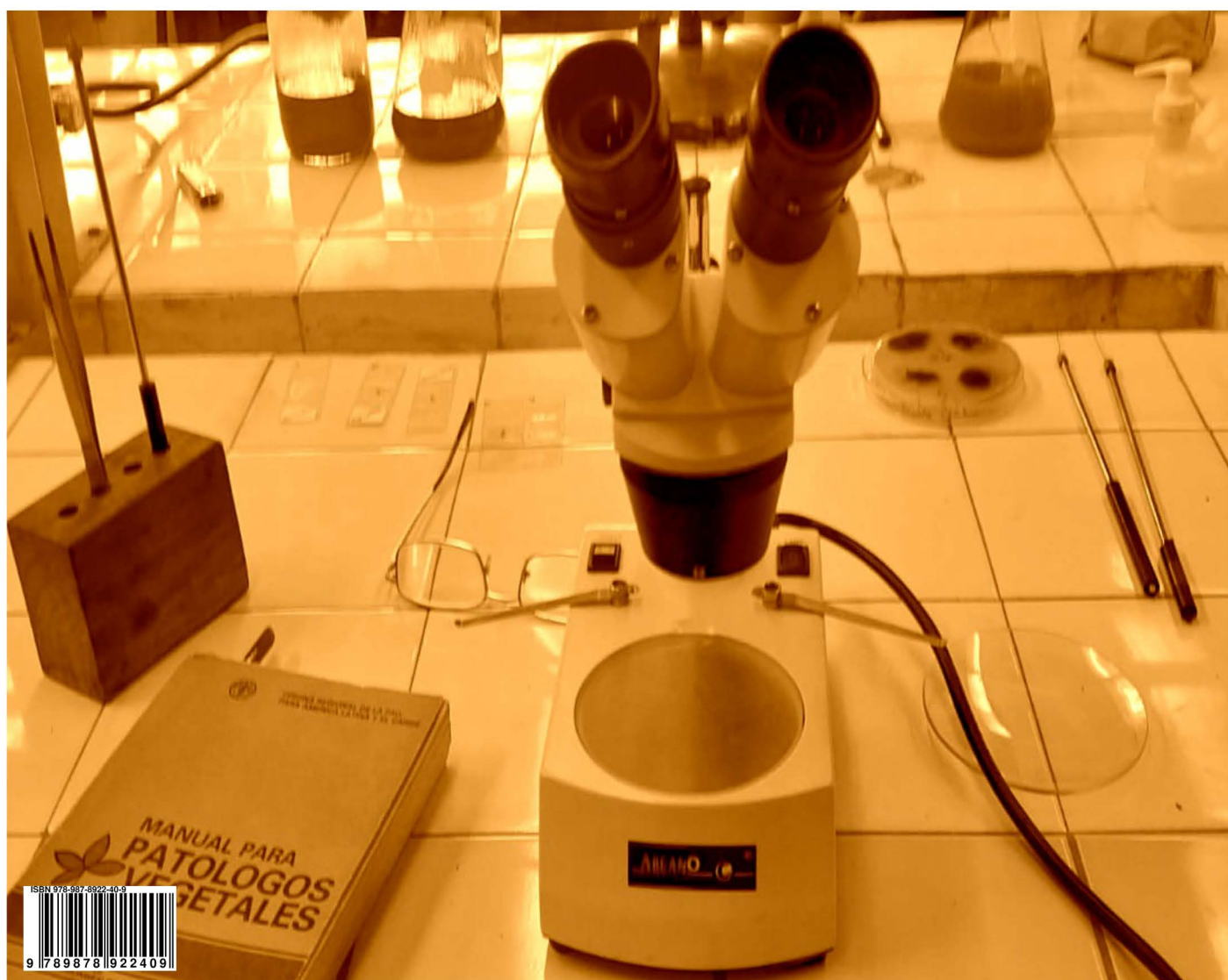




CÁTEDRA DE PATOLOGÍA FORESTAL

TÉCNICAS DE RUTINA APLICADAS EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA FORESTAL



Equipo docente: Dra. María Verónica Parra
Ing. Ftal. Dominga Ledesma

Parra, María Verónica

Técnicas de rutina aplicadas en el laboratorio de patología forestal :
cátedra de patología forestal / María Verónica Parra ; Dominga Victorina
Ledesma. - 1a ed - Santiago del Estero : Universidad Nacional de Santiago
del Estero - UNSE. Facultad de Ciencias Forestales, 2024.

Libro digital, PDF

Archivo Digital: descarga y online

ISBN 978-987-8922-40-9

1. Técnicas de Laboratorio. 2. Ingeniería Forestal. 3. Especies Forestales.
I. Ledesma, Dominga Victorina II. Título
CDD 577.3

INDICE

TP1. El Laboratorio de Fitopatología-----	1
TP2. Diagnóstico. Reconocimiento y diferenciación de tipos de síntomas. Signos-----	9
TP3. Preparación de materiales y esterilización-----	15
TP4. Medios de cultivos-----	24
TP5. Epidemiología -----	33
TP6. Morfología de Hongos-----	40
TP7. Bacterios-----	58
TP8. Fungicidas. Dosis y concentración -----	65
TP9. Siembra y aislamiento -----	71
TP10. Salida de Campo -----	79
TP 11. Patología de Semillas-----	91
TP12.Hongos destructores de madera. Determinación de pérdida de peso en probetas--	95

TRABAJO PRÁCTICO N.º 1

EL LABORATORIO DE FITOPATOLOGÍA. DEPENDENCIAS, EQUIPAMIENTO Y ACTIVIDADES

Objetivos:

Que el estudiante:

- Adquiera familiaridad con las dependencias, instrumental y actividades básicas de un laboratorio de Fitopatología.
- Conozca las normas de trabajo y de seguridad de un laboratorio.

Introducción

Las plantas, como se vio en clases pasadas, pueden enfermarse por diversas causas. Dentro de ellas, se encuentran las enfermedades causadas por organismos vivos (patógenos), a las que denominamos “enfermedades infecciosas”. Estas enfermedades, provocan, (en la mayoría de los casos) un “daño indeseable” que se traduce en “perdidas” de calidad y/o cantidad del producto final que se desea obtener (plantines, frutos, madera, fibra, aceite, vino, harina, etc.).

Cuando se sospecha que una planta de interés económico, está siendo afectada por un organismo patógeno, antes de emitir un juicio apresurado, el profesional responsable, debe tener la certeza, de quien es el “agente causal”, de la enfermedad. La finalidad de conocer cuál es el “agente causal”, es la de determinar las medidas que se deberán tomar para frenar el desarrollo de la enfermedad, y/o evitar que las plantas que aún se encuentran sanas no se enfermen.

Para llevar a cabo los estudios e investigaciones “fitopatológicas” se requiere disponer de dependencias que cubran las necesidades específicas.

Dependencias del laboratorio de Fitopatología

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

Un buen laboratorio de Fitopatología debe contar con las siguientes dependencias:

1. Recepción de material: en este lugar, se reciben las muestras de material enfermo, se selecciona, acondiciona y etiqueta el material que se analizará. El material descartado, debe ser eliminado, mediante quema.
2. Sala de preparación de medio de cultivo: como su nombre lo indica, en este espacio se prepara los medios de cultivo, cuya función es proveer los nutrientes que necesitan los microorganismos para desarrollarse.
3. Sala de Siembra: es una habitación de pequeñas dimensiones que posee una mesada y una luz ultravioleta donde se realizan las siembras.
4. Sala de esterilización: aquí, se esteriliza el material a utilizar (agua, medios de cultivos, cajas de Petri, pipetas).
5. Sala de lavado y acondicionamiento de material: en este lugar se recupera el material para ser reutilizado.
6. Sala de montaje y observación: aquí se realizan preparados y se observan al microscopio.
7. Invernáculo Fitopatológico: es el lugar donde se realizan inoculaciones ya sea para dar cumplimiento a los Postulados de Koch o para inocular plantas con el objetivo de seleccionar variedades resistentes.
8. Sala de conservación: consta de heladeras y equipamiento especializado que permite mantener las colecciones de cultivos en condiciones que aseguren su viabilidad.
9. Biblioteca: la bibliografía es un apoyo importante en el diagnóstico de una enfermedad. La distribución espacial de estas dependencias, debe ser tal que permita el buen

funcionamiento del laboratorio; teniendo en cuenta las particularidades de cada una de las actividades que en ellas se realizan.

10. Droguero y área de almacenamiento del instrumental: son espacios con armarios donde se almacenan drogas, material de vidrio, material de histología, soportes etc.

Equipamiento de un Laboratorio de Fitopatología

El equipamiento de un laboratorio de Fitopatología, es específico para las tareas que allí se realizan, por lo que difiere de un laboratorio de química, de botánica, de zoología etc. A su vez, también dependerá de la especificidad del mismo, es decir, que serán distintos los elementos e instrumentos que encontremos en un laboratorio que se dedique al diagnóstico de enfermedades producidas por virus, por ejemplo, de aquellos que se dediquen a diagnosticar enfermedades producidas por otros organismos.

En líneas generales, el equipamiento básico que encontramos en un Laboratorio de Fitopatología es:

1. Lupa binocular.
2. Microscopio.
3. Estufa para cultivos.
4. Heladera.
5. Material de vidrio: tubos de ensayo, Erlenmeyers, cajas de Petri, pipetas, embudos, vasos de precipitado, porta y cubreobjetos, goteros, probetas, varillas, frascos, matraces.
6. Material de histología: agujas, ansas, tijeras, pinzas, bisturí.
7. Mecheros.
8. Soportes.
9. Autoclave
10. Estufa de esterilización.
11. Cámara de flujo laminar.

12. Micrótopo.
13. Micromanipulador
14. Micrómetro ocular y objetivo.
15. Peachímetro.
16. Balanza de precisión.
17. Droguero.

A medida que el laboratorio aumenta su complejidad puede contar con otro tipo de complemento de apoyo como son la filmación, la fotografía y la computación.

Colecciones

El término “colección” procede del vocablo latino “collectio” y que hace mención al conjunto de cosas de una misma clase que se reúnen por su valor o por el interés que despiertan. En el Laboratorio de Fitopatología se trabaja con dos “tipos de colecciones”. La denominada comúnmente “EXSICATA” que está constituida por especímenes vegetales con algún tipo de afección (material vegetal enfermo) debidamente herborizados o conservados en líquidos preservante. La selección de los ejemplares que formarán parte de la exsicata debe ser cuidadosa, los mismos tienen que ser representativos de la especie y poseer los síntomas Y/o signos de la enfermedad. Una vez coleccionadas las plantas en el campo, se confecciona una etiqueta, donde se consigna la mayor cantidad de datos posibles del ejemplar, de la enfermedad y del sitio de recolección, tales como: nombre científico, nombre vulgar, familia a la que pertenece el hospedante, nombre de la enfermedad, nombre del agente causal, localidad de recolección (país, provincia, departamento), fecha y colector. Estas plantas se conservan largo tiempo, y constituyen un banco de información acerca de las enfermedades presentes de una región y /o cultivos determinados en un espacio reducido.

El otro tipo de colección con la que se trabaja en Fitopatología es la denominada “Colección de Cultivos” (C.C.), la cual está constituida por “cepas de microorganismos”. Las colecciones de cultivos proveen material de referencia para la correcta identificación y

determinación de patógenos, para estudios de taxonomía, de distribución geográfica, de rango de hospedantes, de variaciones estacionales y de estructura de poblaciones. Dentro del campo de la fitopatología, la colección es especialmente importante para pruebas de patogenicidad, biodeterioro de la madera, efectividad de fungicidas, protección biológica, así como en tesis, enseñanza e intercambio de cultivos con instituciones de investigación nacionales y extranjeras. Las colecciones también prestan ayuda importante en estudios de comparación entre especies identificadas y cepas desconocidas. Para mantener viables y puras las cepas durante períodos prolongados, se requiere la aplicación de técnicas de conservación tales como la crioconservación y la liofilización. A partir de 1972 las C.C. se agrupan en la organización internacional denominada World Federation for Culture Collection (WFCC). En Europa a su vez están agrupadas en la "European Culture Collection Organization (ECCO) que se fundó en 1982. En Latinoamérica se agrupan en la Federación Latinoamericana de Colecciones de Cultivos (FELACC). En nuestro país, existen varias C.C., entre ellas, se encuentran la Colección de Cultivos de Hongos Entomopatógenos en La Plata; la Colección de Fitopatógenos de Cultivos Hortícolas del INTA La Consulta, Mendoza; y el Banco Nacional de Microorganismos en la UBA.

El Trabajo en el Laboratorio de Fitopatología

Cuando se trabaja en el laboratorio, uno nunca debe perder de vista el objetivo del mismo, en este caso, es el de determinar cuál es el "agente causal" de la enfermedad problema. También sabemos, que hay muy variados tipos de microorganismos, (no solo los patógenos) y que están distribuidos en el aire, flotando; depositados en las superficies, en los materiales; en nuestras manos y ropa; en el material a estudiar (contaminantes o saprofitos). Todos estos organismos pueden interferir a la hora de realizar un diagnóstico, pudiendo obtenerse resultados erróneos si no se toman las debidas precauciones. Por esta razón, se deben excluir estos microorganismos. Esto se logra usando una o varias combinaciones de distintos métodos que iremos desarrollando en clases siguientes. Por ello, se hace necesario seguir una serie de normas básicas que se detallan a continuación:

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

1. Mantenga todo limpio: mesada, escritorio, material de vidrio y equipo. Lo primero que se debe hacer antes de realizar cualquier actividad en el laboratorio es, limpiar el área donde se trabajará, esto se hace con alcohol 70°, o con una solución de hipoclorito de sodio al 1%. En lo posible se debe elegir un sitio con menor corriente de aire y alejado de las zonas de circulación de otras personas.

2. Utilice un guardapolvo limpio: en especial cuando haga aislamientos y repiques. La costumbre de su uso también preservará su ropa. No olvide que debe trabajar con asepsia.

3. Los laboratorios funcionan según la especialidad y trabajos de rutina y/o investigación que desarrollan. Es necesario que Ud. se familiarice con la misma y sepa cuáles son sus tareas específicas.

4. Mantenga ordenado su lugar de trabajo y cada cosa en el lugar acordado, así se evitará pérdida de tiempo.

5. Antes de comenzar su trabajo interiorícese del mismo y controle si tiene lo necesario.

6. Mantenga sus manos limpias y secas. No se debe comer en el laboratorio.

7. En la mesada de trabajo ordene el material según secuencia de uso. Esto le facilitará la tarea, le evitará pérdida de tiempo y errores.

8. Cuide el instrumental a su cargo y manténgalo en condiciones. Interiorícese de cuál es la mejor forma de hacerlo.

9. Para preparar reactivos utilice envases de vidrio con buenas tapas que permitan un cierre hermético y compatible con el contenido. En raras ocasiones se le indicará lo contrario; algunos reactivos deben protegerse de la luz, en este caso use frascos color caramelo.

10. Si utiliza ácidos, hágalo con precaución. Los vapores de la mayoría de ellos son extremadamente irritantes. Siempre adicione el ácido al agua y nunca el agua al ácido.

11. No utilice pipetas indiscriminadamente. Debe usar una por cada solución y para cada concentración. Aprenda a utilizar las pipetas agrupándolas por capacidad. Es conveniente disponer de un porta pipetas para colocarlas después de utilizarlas evitando apoyarlas sobre la mesada.

12. Estudie las marchas o técnicas de coloración cuidadosamente antes de iniciarlas; si ya las conoce no viene mal repasarlas. Verifique si dispone de todos los reactivos y colorantes y el estado en que se encuentran. Casi todos pierden efectividad con el tiempo, de allí la necesidad de anotar en el rotulado la fecha de preparación.

13. Efectúe las pesadas con precisión.

14. No olvide tener todo rotulado donde se lea con claridad el contenido, concentración, pH y fecha de preparación.

15. Tenga un solo registro organizado para hacer las anotaciones.

16. Los frascos con xilol deben permanecer bien tapados.

17. No se desanime si al primer intento el resultado del trabajo no es el esperado. Vuelva a insistir y trate de detectar a donde se produjo la falla.

18. Sea crítico con su trabajo. Para ello analícelo objetivamente, de ese modo podrá interpretar los resultados del fenómeno estudiado, y en caso de fallas, podrá localizarlas en la etapa en la que se producen y hacer las correcciones correspondientes de ser necesarias. No olvide que Ud. debe ofrecer garantía de sus cualidades de trabajo.

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

19. Asegúrese que existan condiciones de seguridad. Ubique donde se encuentran el matafuego, llaves de paso de gas, luz y agua. Ante cualquier situación mantenga la calma y actúe.

20. Tenga a mano un botiquín de primeros auxilios.

21. Se trabaja con organismos vivos. Este último punto debe tenerse en cuenta a la hora de reutilización y desecho del material, debiéndose matar primero los microorganismos antes de realizar el lavado. Esto se realiza con la “mezcla sulfocrómica”, que desintegra todo lo que sea orgánico.

BIBLIOGRAFÍA

-De Ambrogio De Argüeso, A. D.1986. Manual de Técnicas de Histología Vegetal. Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires, Argentina. Pg.3.

-French, E. R. & Hebert T. Métodos de Investigación Fitopatológica. 1980. IICA, Costa Rica. Pg.27-29.

-Streets, R. B. 1992. Diagnóstico de Enfermedades de las Plantas. Hemisferio Sur S. A. Buenos Aires, Argentina. Pg. 14-16

TRABAJO PRÁCTICO N.º2

RECONOCIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DE TIPOS DE SÍNTOMAS Y SIGNOS.

Objetivos:

Que el estudiante logre habilidad en:

- Observación y reconocimiento de los distintos tipos de síntomas.
- Recolección y acondicionamiento del material vegetal enfermo para su posterior análisis en laboratorio.

Introducción:

1. SINTOMATOLOGÍA Y SÍNTOMAS

La sintomatología es la parte de la Fitopatología que se dedica a estudiar los síntomas de las enfermedades de las plantas.

Síntoma: es la manifestación en la planta del proceso de la enfermedad. Son los cambios que se observan como resultantes de la modificación del normal desarrollo morfológico y/o fisiológico de las mismas debido a la acción de microorganismos patógenos o a determinadas condiciones del ambiente.

2. CLASIFICACIÓN DE SÍNTOMAS

Existen varias clasificaciones de síntomas que tienen en cuenta distintos criterios. Las más usadas son las que se basan en las alteraciones, en la localización en el hospedante y en los agentes causales.

2.1. Por alteración en el hospedante los síntomas se clasifican en:

- Necróticos

- Alteración del crecimiento (síntomas plásticos)
- Alteración del color
- Otras alteraciones

2.1.1. Síntomas Necróticos

Se caracterizan por la **muerte** de células, tejidos y órganos, afectándolos parcialmente o causando la muerte de todo el órgano o bien de toda la planta. Dentro de este grupo se encuentran una gran cantidad de síntomas, cada uno con características propias. Entre ellos podemos nombrar:

a) Podredumbres: Se caracterizan por la **muerte** de células, tejidos y órganos, afectándolos parcialmente o causando la muerte de todo el órgano o bien de toda la planta pueden ser secas o húmedas, de consistencia blanda o dura y algunas van acompañadas de la producción de olores característicos.

b) Cancro: lesión necrótica generalmente deprimida en el centro, con bordes levantados y corchosos rodeada de tejido sano. Sobre tallos, ramas y frutos. Herida que no logra cicatrizar.

c) Tizón: muerte generalizada y repentina, total o parcial de la parte aérea de la planta que se torna de color pardo y aspecto de “quemada”.

d) Antracnosis: lesiones pardas, irregulares, deprimidas y con frecuencia aureoladas que terminan por ulcerarse.

e) Manchas foliares: lesión necrótica localizada de forma y tamaño definida, rodeadas o no de un halo amarillento o rojizo. Aisladas o confluentes. Algunas muy características como las viruelas, las pústulas, manchas acuosas y las de la antracnosis.

f) **Marchitamiento:** apariencia flácida de hojas, brotes o toda la planta por pérdida de turgencia.

g) **Amarillamiento:** Pérdida generalizada del color verde normal por destrucción de la clorofila, manifestándose los pigmentos amarillos.

h) **Gomosis:** Exudación de goma.

2.1.2. Alteración del crecimiento

Hipoplásticos: se observa una disminución del volumen celular y/o retardo en la multiplicación celular o en la formación de algún componente de la misma. Dentro de ellos se encuentran:

a) **Clorosis:** pérdida de la coloración verde intensa de un órgano sano, por disminución o demora en la producción de clorofila.

b) **Mosaicos:** síntoma donde las áreas cloróticas aparecen intercaladas con áreas sanas (verde más oscuro).

c) **Enanismo:** detención significativa del crecimiento.

d) **Achaparramiento:** acortamiento de entrenudos lo que da lugar al agrupamiento de hojas por lo que la planta adquiere un aspecto arrosetado.

Hipertróficos o Hiperplásticos: aumento de volumen y/o del número de células.

a) **Agallas o Tumores:** Sobrecrecimiento formado por células poco diferenciadas, por lo general, de forma aproximadamente esférica originado por el incremento de volumen celular (hipertrofia), o por aumento en la velocidad de división celular, (hiperplasia).

b) **Enaciones:** proliferación de tejido (excrecencias o verrugosidades), generalmente en el envés de las hojas asociadas a las nervaduras.

c) **Escoba de Bruja:** brotación de las yemas axilares por ruptura de la dominancia apical.

d) **Epinastia:** crecimiento diferencial por acumulación de etileno, hace que la hoja se doble hacia abajo.

e) **Sarna:** formaciones corchosas por aumento de la división celular a nivel epidérmico o cortical. Son lesiones salientes y ásperas.

f) **Enrullamiento y distorsión:** deformación foliar por aumento en el número de células por multiplicación anormal de las mismas.

g) **Fasciación:** transformación de tallos y raíces en órganos aplanados, unidos, ramificados y que forman una faja.

2.1.3. Alteración del color

Involucran la destrucción o inhibición de la formación de clorofila y la variación en el contenido de pigmentos antociánicos y caroténicos. Son generalmente producidos por virus. Se mencionan entre otros: metaplasia, mosaico, variegado, aclaramiento de nervaduras, clorosis internerval

2.1.4 Otras alteraciones:

a) **Restitución:** rebrote fuera de época por la pérdida prematura de las hojas.

2.2. *Por su localización en el hospedante*

a) **Primarios:** Son aquellos que se dan en el lugar donde se encuentra el agente etiológico.

b) **Secundarios:** Son los que se presentan alejados del lugar de acción del patógeno.

c) Localizados: Son los que se presentan alejados del lugar de acción del patógeno. Son subordinados a los primarios.

d) Sistémicos: Son aquellos que abarcan gran parte o todo el vegetal, se presentan alejados del lugar de acción del patógeno. Involucra un tipo de colonización y acción a distancia.

2. 3. Por proceso fisiológico interferido (Mc New)

a) Grupo I: Enfermedades que dañan órganos de almacenamiento.

b) Grupo II: Enfermedades que causan daños en plántulas.

c) Grupo III: Enfermedades que dañan raíces.

d) Grupo IV: Enfermedades que atacan el sistema vascular.

e) Grupo V: Enfermedades que interfieren en la fotosíntesis.

f) Grupo VI: Enfermedades que alteran el aprovechamiento de sustancias fotosintetizadas.

3. SIGNOS

El signo en Fitopatología es la expresión visible del patógeno. Sólo poseen signo visible las enfermedades causadas por hongos, bacterias y actinomicetes. Algunos son perceptibles a simple vista y otros requieren el uso de aumento para poder observarlos.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

1) Observar a ojo desnudo y con lupa el material recolectado

2) Describir los síntomas y signos si los hubiera y dibujar lo observado.

3) Realizar la clasificación de los síntomas según las clasificaciones presentadas, debiendo consignar la siguiente información:

-Hospedante (Nombre científico y vulgar de la planta):

-Tipo de Síntoma: según alteración y localización. Con una descripción precisa del mismo, en especial si se tratara de manchas foliares.

-Signo (si correspondiera): Descripción del mismo.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. Méjico. Limusa. (5° reimpresión en español). 766pg.
- Filho, A.B; Kimatii, H y Amorim L. (editores) 1995. Manual de Fitopatología. 3°ed. Vol. I. Principios e Conceitos. 919pg.
- Jauch, C. 1979. Patología Vegetal. (2°ed.) El Ateneo. 280pg.

TRABAJO PRÁCTICO N°3

PREPARACIÓN DE MATERIALES Y ESTERILIZACIÓN

Objetivos:

Que el alumno:

- Se familiarice con los métodos que existen para la esterilización de los materiales en el laboratorio de Fitopatología.
- Sea capaz de decidir cuál es el método o procedimiento de esterilización más adecuado según el material que desea esterilizar.

Introducción:

Esterilidad quiere decir “**ausencia total de microorganismos vivos**”. La **esterilización** es un proceso a través del cual un objeto o sustancia queda libre de todo organismo viviente ya sea por muerte o separación del mismo. Existen varios métodos prácticos para esterilizar la elección depende, fundamentalmente, de la naturaleza de los materiales a esterilizar y de la conveniencia.

La eliminación completa de todos los microorganismos presentes sobre cualquier material o dentro de él, es indispensable en la preparación de medios de cultivo y material de vidrio utilizado en el laboratorio de Fitopatología, así como también en los procedimientos quirúrgicos, en el envasado de alimentos.

En el laboratorio de Fitopatología, previo a la esterilización se realiza la limpieza del material. De acuerdo al uso previo que se le haya dado se buscará el método más adecuado. Por lo general, se realizan lavados con detergente que se elimina con sucesivos enjuagues. El enjuague final se realiza con agua destilada para eliminar los carbonatos. Cuando en el material de vidrio han quedado restos de materia orgánica o medio de cultivo adheridos se usa una solución limpiadora como la “**mezcla sulfocrómica**” que desintegra los residuos, luego se lava y enjuaga.

Los métodos de esterilización se pueden clasificar según se presenta en la figura 3.1

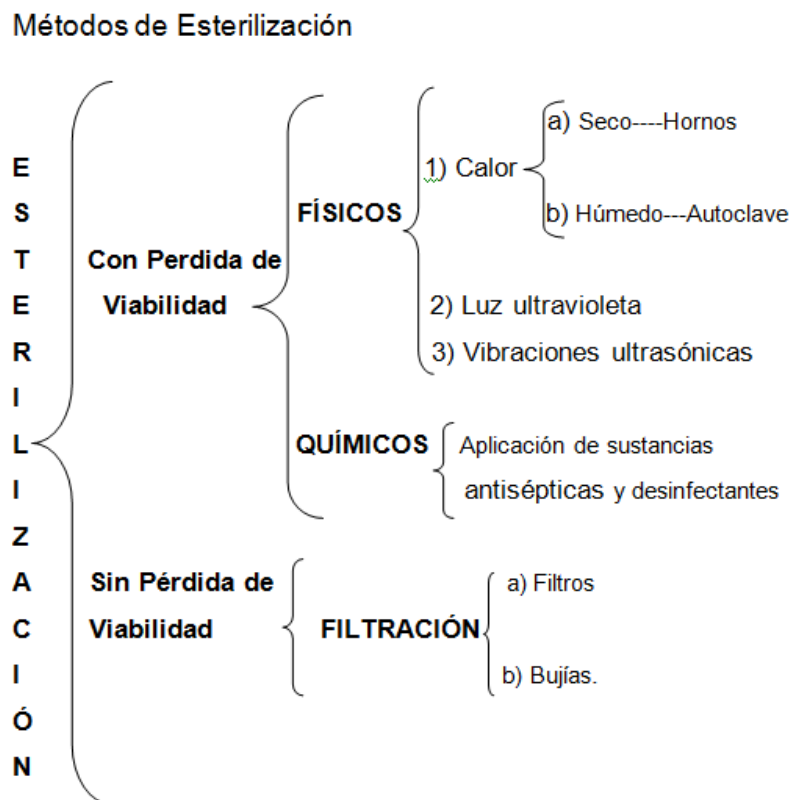


Figura 3.1: Clasificación de los métodos de esterilización

Métodos Físicos

1- Esterilización por calor: es uno de los métodos más económicos y más difundidos. Con este método se destruyen todos los organismos.

a) Calor Seco.

Los generadores de calor seco son **hornos de aire caliente**, y la esterilización se produce cuando los objetos fríos absorben el calor del aire caliente que los rodea. El calor seco destruye los microorganismos por oxidación de sus constituyentes esenciales. Para

realizar una esterilización efectiva el material debe permanecer durante 2 horas a 160°C. Esto se debe a que la absorción del calor es lenta, por lo que se requiere mayor tiempo que en la esterilización por autoclave.

A través de este método se esteriliza la mayor parte del material de vidrio (frascos, pipetas, tubos, jeringas) así como ceras de parafina, aceites y polvos de talco.

Precauciones:

1. Debe dejarse suficiente espacio entre los materiales ubicados en el interior del horno para que el calor se distribuya uniformemente.

2. El tiempo mínimo es de 2 horas a 160-165°C, pero en general se deja más tiempo ya que resulta muy difícil lograr la distribución uniforme del calor, en especial si la cantidad de material cargada en el horno es muy grande.

3. Una vez terminado el tiempo, es necesario permitir que los materiales se enfríen antes de abrir las puertas del horno para evitar bruscas contracciones que pudieran provocar la ruptura de los materiales.

Flameado.

Este método se usa para esterilizar rápidamente materiales de laboratorio sobre todo de metal tales como ansas, tijeras, pinzas, bisturíes, agujas, así como la boca de los frascos, de tubos y portaobjetos. El instrumental de histología debe sumergirse previamente en alcohol 96% sosteniéndolo hacia abajo para evitar que el alcohol impregne los dedos y se incendie al flamear.

Este tipo de rutina se utiliza cuando se trabaja cerca del mechero, evitando cualquier contaminación accidental.

b) Calor Húmedo.

Autoclave: El principio esterilizante del autoclave se basa en la aplicación de vapor sobresaturado a presión. El vapor se condensa en los objetos más fríos y los calienta instantáneamente cediéndoles su calor latente. La esterilización en autoclave por lo general se lleva a cabo durante 15 a 30 min a 121 °C, condiciones que corresponden a una presión aproximada de 1,1 Kg/cm², el tiempo depende del volumen a esterilizar. Mediante el uso del autoclave se provoca la coagulación y desnaturalización de las estructuras proteicas y enzimáticas. En autoclave se esterilizan soluciones salinas, agua, medios de cultivos, suelo.

Puesta en funcionamiento del autoclave

- 1- Coloque agua en su interior hasta la altura de la rejilla.
- 2- Sobre la rejilla coloque el material a esterilizar previamente acondicionados.
- 3- Cierre cuidadosamente ajustando las mariposas en cruz para un cierre parejo.
- 4- Abra la espita y encienda la fuente de calor.
- 5- Purgue el aparato hasta que salga un chorro continuo de vapor para desalojar el aire.
- 6- Observe en el manómetro el aumento de la presión. Cuando llegue a 1 atm regule la fuente de calor para que la temperatura permanezca estable por el tiempo especificado para la esterilización.
- 7- Finalizado el tiempo, cierre la fuente de calor y deje que la presión descienda hasta cero.
- 8- Luego abra lentamente la espita y abra el autoclave dejando enfriar su contenido (fig. 3.2).

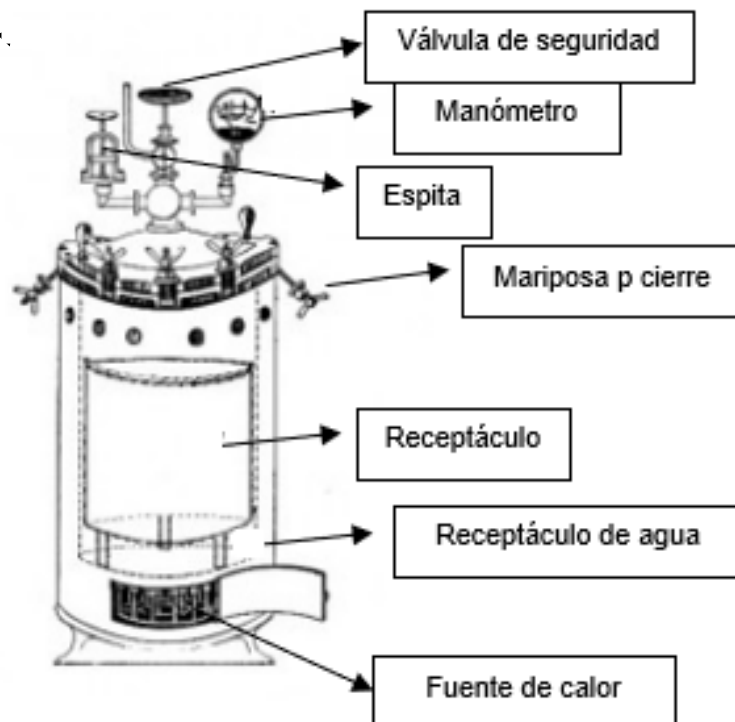


Figura 3.2. Esquema de autoclave, modificado de Sarasola 1975

Para la esterilización de ciertos medios de cultivo líquidos que contienen hidratos de carbono, huevo o suero, o materiales semisólidos que son destruidos con facilidad por el calor, se recurre a un método de **esterilización fraccionada**. Este procedimiento denominado **tindalización**, consiste en el calentamiento del material a 80°C o 100°C durante 30 min, en 3 días consecutivos. El fundamento de esta metodología es que las células vegetativas y algunas esporas resultan destruidas durante el primer calentamiento y las esporas más resistentes germinan luego y son destruidas durante el segundo o tercer ciclo de calentamiento.

La mayor parte de las bacterias en sus formas vegetativas pueden ser destruidas por exposiciones breves de 60 a 65°C. La aplicación más importante de este rango de temperatura se relaciona con la pasteurización de leche y preparación de vacunas.

La **pasteurización** de la leche consiste en el calentamiento a una temperatura de 72°C durante 1 o 2 min, seguido de un enfriamiento rápido. Esto no esteriliza la leche, pero sí destruye todas las bacterias productoras de enfermedades que son transmitidas por la leche.

2- Radiaciones: la radiación es el fenómeno de emisión y propagación de la energía en el espacio a través de un medio material. La diferencia entre ellas se funda en su longitud de onda, la cual se mide en angstroms (A). Una de las características de este tipo de esterilización es que producen muy poco calor en el material irradiado por lo tanto con su uso se pueden esterilizar sustancias termolábiles.

Las radiaciones de acción nociva sobre los microorganismos son las siguientes:

a) Radiación ultravioleta. (U.V.)

Son las radiaciones entre 150 y 3900 A. El efecto bactericida más pronunciado lo ejerce a unos 2650 A que corresponde con la máxima absorción del DNA. Existen muchos tipos de lámparas que emiten rayos U.V. de la región más activa (2600 a 2700 A) en gran concentración. Este tipo de radiación presenta algunos inconvenientes para ser usada como agente esterilizante. Su energía es baja y su capacidad de penetración es escasa, por lo tanto, se utilizan para reducir la población microbiana en áreas cerradas como las salas de hospitales, quirófanos y laboratorios, departamentos de envasados en la industria farmacéutica, plantas de alimentación y explotación lechera.

b) Radiaciones ionizantes.

Es tipo de radiación es de alta penetración e incluye **rayos X** y **gamma (γ)**. Producen iones y radicales libres que alteran las bases de los ácidos nucleicos, estructuras proteicas y lipídicas, y componentes esenciales para la viabilidad de los microorganismos, dando lugar a mutaciones letales en los microorganismos. A diferencia de la radiación U.V. son muy penetrantes, pero muy costosas. Las radiaciones ionizantes son adecuadas para la

esterilización de material quirúrgico, médico y de laboratorio descartable y en general en procesos de esterilización en gran escala.

3) Filtración.

Es el principal método para esterilizar líquidos que contienen componentes sensibles al calor, tales como vitaminas, proteínas séricas, antibióticos y soluciones salinas definidas. También se utiliza esterilizar para emulsiones oleosas, aceites, algunos tipos de pomadas, soluciones oftálmicas, soluciones intravenosas, drogas diagnósticas, radiofármacos, medios para cultivos celulares, y soluciones de antibióticos y vitamina. Consiste en hacer pasar líquidos por un material que posee poros de un tamaño determinado. El tamaño del poro dependerá del uso al que se va a someter la muestra. Los filtros que se utilizan pueden no retener virus o micoplasmas, estos últimos están en el límite de separación según el diámetro de poro que se utilice

Los filtros más usados son:

- Filtros de porcelana micro porosa.
- Filtros de asbesto.
- Filtros de vidrio molido.
- Filtros de acetato de celulosa.

En general, no se debe filtrar demasiado material a través de un filtro en un tiempo determinado, o continuar el proceso durante tiempo prolongado. Si el volumen a filtrar es grande o la tasa de filtración es lenta, es preferible usar varios filtros (fig. 3.3).

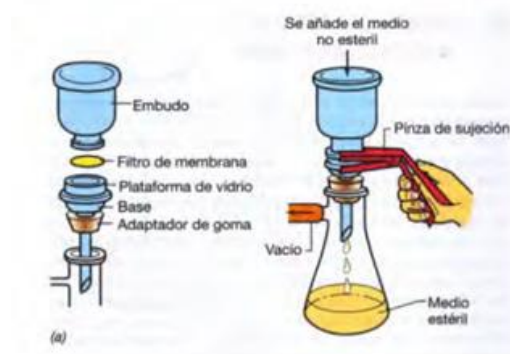


Figura 3.3. Esquema de funcionamiento de filtro de membrana

Filtración del aire: una de las aplicaciones más sofisticadas de los filtros de aire es la destinada a la provisión de áreas estériles tales como las áreas de **flujo laminar**. Una cámara de flujo laminar es un receptáculo en forma prismática con una única cara libre (frontal) que da acceso al interior donde se localiza la superficie de trabajo. La esterilidad de la zona de trabajo mediante la circulación en el interior de la cámara de una corriente de aire que es microfiltrada para eliminar toda partícula extraña (fig. 3.4).

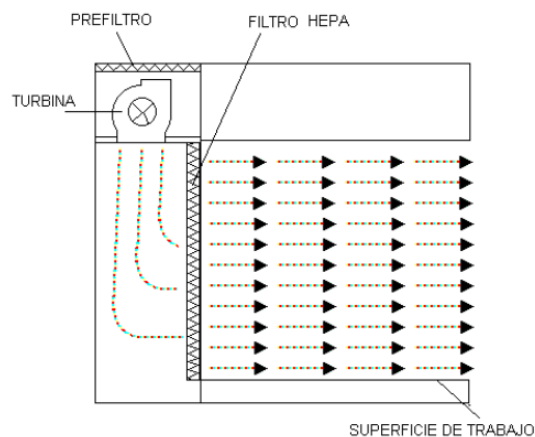


Figura 3.4. Esquema de Flujo laminar

Métodos Químicos: un agente químico es una sustancia que mata o inhibe el desarrollo de los microorganismos. Pueden ser naturales o sintéticos. En la mayoría de los casos el uso de estos agentes requiere largos períodos de contacto bajo condiciones especiales. Los desinfectantes y antisépticos son agentes antimicrobianos.

Los desinfectantes matan a los microorganismos (germicidas) y se usan sobre objetos inanimados, por ejemplo, mesas de trabajo. Tienen un amplio uso en esterilización de instrumental quirúrgico y los más comunes son: formaldehído, óxido de etileno y peróxido de hidrógeno.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

- 1) Preparación de material de vidrio limpio para esterilización.
- 2) Esterilización del material en horno de esterilización.
- 3) Preparación de agua en tubos y erlenmeyers.
- 4) Esterilización en autoclave.
- 5) Flameado de material de histología y bocas de tubos.

BIBLIOGRAFÍA

- Echandi E. 1971. Manual de Laboratorio para Fitopatología General. 59p.
- Garrassini, L. A. 1967. Microbiología Agraria. Universidad Central Venezuela.
 - Sarasola A. y M. R. de Sarasola. 1975. Fitopatología. Curso Moderno. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

MEDIOS DE CULTIVO

Objetivos:

Que el estudiante:

- Conozca la utilidad de los medios de cultivos.
- Aprenda a clasificar los medios de cultivo, según distintos criterios.
- Adquiera destrezas en la preparación, corrección de pH y esterilización de un medio de cultivo.

Introducción:

Un medio de cultivo es una mezcla balanceada de nutrientes a concentraciones adecuadas que en condiciones físicas óptimas permiten un buen crecimiento de los microorganismos en condiciones artificiales. Este debe contener todos los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos para lo que fue diseñado, por lo que su elaboración debe estar basada en los **principios de la nutrición**.

Condiciones que debe reunir un medio de cultivo

La constitución química de las células es ampliamente constante en el mundo viviente y es indicativo de los requerimientos principales para el crecimiento.

El agua constituye el 80 al 90 % del peso total de las células, y es el principal nutriente, en términos cuantitativos.

La sustancia seca de las células contiene, además H, O (metabolitos derivados del agua), C, N, P y S en orden decreciente de abundancia. Estos seis elementos constituyen el 95 % de peso celular. Otros elementos están incluidos en la fracción que queda. Estudios

nutricionales muestran que el K, Ca, Na, Fe, Mn, Co, Mo, y Zn, son requeridos por casi todos los microorganismos.

Todos los elementos metálicos pueden ser suministrados como nutrientes en forma de cationes de sales inorgánicas. El K, Ca, Na, Fe, son requeridos en cantidades relativamente grandes y deben ser incluidos como sales en el medio de cultivo. Los requerimientos de los demás cationes son tan pequeños que es difícil demostrar su esencialidad porque están presentes en cantidades adecuadas como contaminantes de los principales constituyentes inorgánicos de los medios. Se los denomina **elementos traza, micronutrientes u oligoelementos**.

Un elemento no metálico, el P, puede ser usado también como nutriente cuando es suministrado en forma inorgánica como sales de fosfato.

Para cubrir la necesidades nutricionales y energéticas de los microorganismos, el medio debe contener una **fente de carbono** que le suministra la posibilidad de utilizar la energía química almacenada en la molécula, una **fente de nitrógeno**, utilizada con fines plásticos para sintetizar las estructuras celulares necesarias; **sales minerales**, para mantener la concentración osmótica necesaria para que los microorganismos puedan desarrollar todas las funciones vitales; y por último **reguladores de crecimiento**.

Además de cubrir los requerimientos nutricionales, para un crecimiento óptimo es necesario que en el medio de cultivo exista una **concentración adecuada de iones hidrógeno**, para las distintas actividades metabólicas, una adecuada **humedad** y **temperatura** y debe estar **exento de microorganismos contaminantes**.

Clasificación de Los Medios de Cultivo

Por su composición:

a- Medios naturales o complejos: contienen productos naturales de composición química no definida. Comprenden los medios que contienen extractos de levadura, de carne o de malta, y o peptonas o tristonas de levadura o de carne. Los extractos contienen componentes celulares solubles y son fuente de vitaminas y coenzimas.

Son más favorables para el crecimiento y la esporulación que los sintéticos. Se usan para el cultivo de organismos cuyas exigencias nutritivas son desconocidas.

Ejemplos: extractos o jugo de partes de plantas hospedantes, tejidos de vegetales adicionados a agar agua o a arena o agua estéril, leche, extracto de carne, sangre entre otros.

b- Medios sintéticos o definidos: la solución nutritiva se prepara a partir de compuestos químicos conocidos con concentración definida. Tienen la ventaja de que se lo puede preparar con exactitud, por lo que se usan en trabajos de nutrición, en taxonomía y en investigaciones bioquímicas.

Son soluciones en agua destilada, de cuerpos químicos puros en proporciones determinadas. Sirven generalmente para determinar la nutrición, los factores de crecimiento y el metabolismo de los microorganismos.

El carbono es suministrado por glúcidos, ácidos orgánicos, asparagina y ácido glutámico. El nitrógeno por sales amoniacales, nitratos, aminoácidos como la asparagina y el ácido glutámico. También son necesarios los cationes como Na, Ca, Fe, Cu, así como los aniones Cl, SO₄.

Por el objetivo de uso, y de acuerdo a la diversidad de microorganismos que son capaces de desarrollar:

1- Medios generales: son los más comúnmente empleados en el laboratorio de patología, donde crecen la mayor parte de los microorganismos facultativos.

Ej.: agar papa glucosado.

2- Medios Especiales: tienen distinta finalidad. Se dividen en:

a- Medios enriquecidos: Se obtienen mediante el agregado de sustancias nutritivas, tales como azúcares o materias albuminosas, para obtener una cosecha microbiana abundante, crecimiento más rápido o para permitir el desarrollo de ciertos microorganismos con grandes exigencias nutricionales. Ejemplos: agua de peptona glucosado, medios azucarados, medio agar hígado.

b- Medios selectivos: Son los medios que permiten el desarrollo de un determinado organismo o grupos de microorganismos e impiden el desarrollo de los demás, por el agregado de inhibidores selectivos como antibióticos, colorantes, sales, pH desfavorable. Es decir que permite seleccionar y aislar microorganismos a partir de poblaciones mixtas. Ej.: agregar ácido láctico en el medio de cultivo favorece el desarrollo de hongos e inhibe el desarrollo de bacterias.

c- Medios indicadores o diferenciales: se usan para revelar características fisiológicas de los microorganismos que permitan su identificación. Se trabaja con especies ya aisladas. Estos medios tienen en su composición alguna sustancia que al desarrollar el microorganismo en estudio y producir su metabolismo se combina con éste dando origen a una coloración característica.

Ejemplos: medio de Endo, para *Scherichia coli* que da color rojo, ya que tiene fucsina decolorada con bisulfito. Al producirse el metabolismo de los azúcares se forman aldehídos que decoloran la fucsina dando color rojo.

d- Medios específicos: permite el cultivo de determinado microorganismo. Ej el medio de Schoeder sirve para cultivar *Agrobacterium tumefaciens*.

Por su estado de agregación:

a-Medios sólidos o agarizados: se emplean para aislamiento y reconocimiento de microorganismos y para hacer recuento de células viables. Se lo obtiene agregando al medio líquido un agente solidificante.

b-Medios líquidos: se usa para inocular suelo, o para estudiar características fisiológicas y bioquímicas de los bacterios.

2.5. Agentes solidificantes

Una vez preparada la solución nutritiva, si se quiere usar como medio sólido, debe agregarse un agente solidificante. Los más utilizados son agar-agar, gelatina, y sílico gel.

a- Agar-agar: Es un polisacárido extraído de algas marinas. Está compuesto por unidades de galactosa y ácido galacturónico, estando la galactosa esterificada con ácido sulfúrico. Funde a 100°C. Una vez fundido queda líquido hasta que la temperatura descienda hasta 44°C, haciendo posible su uso en la preparación de cultivos en cajas de Petri. Es atacado por muy pocas bacterias y por ello la licuación del agar es muy rara.

La capacidad de solidificación de los medios agarizados es menor por debajo de pH 5. Los medios sólidos contienen, generalmente, 15 a 20 %, y los medios semi-sólidos 1,8 %.

b- La gelatina: Es preparada descalcificando los huesos por ácidos fuertes, luego se trata con agua a ebullición por vapor de agua sobrecalentada bajo fuerte presión. La caseína es transformada así en gelatina.

Los medios gelatinados se obtienen agregando entre el 10% al 15% de gelatina a los medios líquidos. Una solución que tenga más del 4% de gelatina solidifica al enfriarse.

El poder de solidificación disminuye cuando el pH de la solución es inferior a 5 y cuando el calentamiento es demasiado fuerte. Sólo se usa en casos concretos ya que funde a

los 25 °C que en muchos casos es igual o menor que la temperatura de incubación y por otro lado hay microorganismos proteolíticos que la licuan.

c- Silico gel: Es dióxido de silicio, preparado inicialmente como una solución de silicato de sodio que gelifica por el agregado de electrolitos. Se usa cuando se requieren medios de cultivo sólidos sin componentes orgánicos. Se lo usa en la preparación de medios de cultivo con composición química estrictamente conocida.

Existen una gran cantidad de medios, cuyas formulas obedecen a las exigencias fisiológicas de los grupos de microorganismos conocidos.

Entre los medios que comúnmente se usan en el laboratorio de Fitopatología se encuentran:

- 1.- APG (agar papa glucosado)
- 2.- AN (agar nutritivo)
- 3.- HFA (harina de frijol-agar)
- 4.- V8A (jugo V8-agar)
- 5.- AVA (avena - agar)
- 6.- TSA (jugo de tomate- sal- agar)
- 7.- MM (medio de Martin)
- 8.- VFA (vainita de frijol-agar)
- 9.- AA (agua-agar)
- 10.- HMA (harina de maíz-agar)
- 11.- JFA (jugo de frijol agar)
- 12.- JTA (jugo de tomate-agar)
- 13.- MSA (malta-sal-agar)
- 14.- BA (Bonner- Addicot)
- 15.- BK (medio B de King)

Preparación de APG (Agar papa glucosado)

Este medio de cultivo se utiliza para el aislamiento, crecimiento y reproducción de varios hongos y de bacterias como *Xanthomonas* y *Agrobacterium*.

Ingredientes:

Papa.....200gr
Glucosa o Dextrosa.....20gr.
Agar..... 17gr
Agua destilada.....aforar a 1000 ml

Procedimiento:

Partir 200 gr. de papa sin cáscara y cubrirlo con agua destilada.

Se deja hervir durante 15 min. Concluido este tiempo se filtra la infusión o caldo de papa a través de un algodón.

Se disuelve el agar en 500 ml. de agua destilada, calentando ligeramente, se le agrega la dextrosa y se disuelve.

Se añade la solución de agar dextrosa al caldo de papa mezclando bien y se afora con agua destilada a 1000 ml. y se esteriliza.

Fraccionamiento del medio de cultivo

Una vez preparado el medio de cultivo debe ser fraccionado para su posterior esterilización. El fraccionamiento se realiza en tubos de ensayos. Si el medio de cultivo se destina para el trabajo en caja se colocan aproximadamente entre 8 a 10 ml, si por el contrario su destino es pico de flauta se colocan 5 ml.

Para esto se vuelca el medio de cultivo en un embudo en el que se conecta una manguera en cuyo extremo hay un pico de vidrio en forma de gotero. A la manguera se le adosa una pinza con la que se regulará el paso del medio (fig. 4.1).

Debe tener la precaución de trabajar con el medio de cultivo caliente de lo contrario se obstruirá el embudo por su solidificación y evitar que la boca de los tubos se moje con el medio de cultivo ya que esto favorece las contaminaciones y además los tapones se pegan a los tubos.

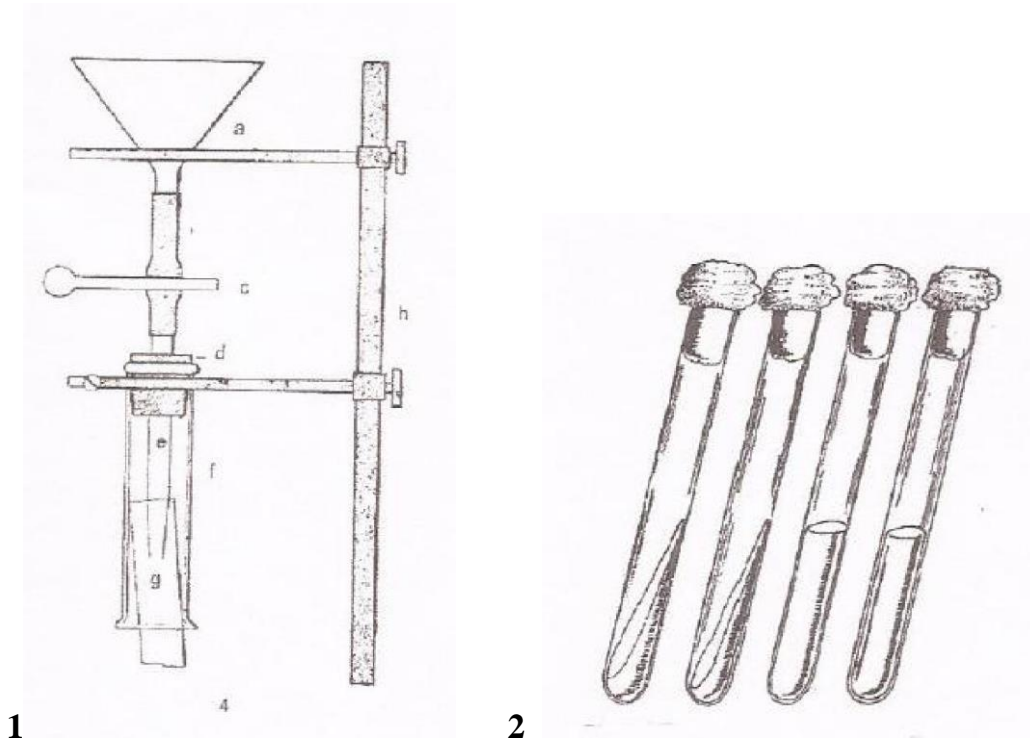


Figura 4.1. Esquema del instrumental para el fraccionamiento del medio de cultivo. En 1 se observa: a) embudo, b) manguera, c) pinza, d) tapón, e) pico fraccionador, g) tubo, h) soporte. En 2, se observan tubos con medio de cultivo pico de flauta y tubos para placa.

Luego de dosificar el medio, los tubos se colocan en una canastilla y se llevan al autoclave para su esterilización. Una vez esterilizados, los tubos destinados a picos de flauta debes ser inclinados para su solidificación. Para que el medio de cultivo no se deshidrate, una vez enfriado se lleva a la heladera debidamente etiquetado hasta el momento de su uso.

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

ACTIVIDAD PRÁCTICA

- 1) Prepare el medio de cultivo indicado siguiendo el procedimiento.
- 2) Mida su pH. Regúlelo si fuera necesario.
- 3) Fraccione el medio de cultivo para tubo pico de flauta y para caja de Petri.
- 4) Esterilice en autoclave.

BIBLIOGRAFÍA

- Echandi E. 1971. Manual de Laboratorio para Fitopatología General. 59p.
- Fernández Valiela, M.V. 1978. Introducción a la Fitopatología. 2 Vol. Colección Científica INTA. Buenos Aires.
- French E. y T. Hebert.-1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. IICA. Costa Rica. 289 p.

TRABAJO PRÁCTICO 5

EPIDEMIOLOGÍA

Objetivos:

Que el estudiante logre:

- Analizar la evolución de una enfermedad en función del tiempo y del espacio.
- Estimar el grado de afectación de un hospedante mediante el uso de parámetros.

Introducción

Estudiar y graficar la evolución de las enfermedades en el tiempo y en el espacio permite conocer su comportamiento y planificar su manejo; asimismo, midiendo la enfermedad se puede demostrar la magnitud de pérdidas por enfermedad. Esta evolución puede analizarse a través de gráficas construidas en base a parámetros como incidencia (I%) y severidad (S%). Al análisis de la representación gráfica de estos parámetros, puede sumarse la identificación de niveles de la enfermedad, a través de otro parámetro denominado área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE)

La incidencia es un indicador que estima el porcentaje o proporción de plantas enfermas u órganos afectados con relación al total. Este indicador se utiliza, con frecuencia, para evaluar enfermedades donde se afecta completamente al individuo (por ejemplo, para enfermedades de raíz y tallo donde la planta muere). Existe una relación casi directa entre los valores de incidencia y las pérdidas de rendimiento. En general, no se mide la incidencia para enfermedades foliares porque estas suelen presentarse en forma uniforme en todo un lote (con valores cercanos al 100%). El uso de este parámetro en el cultivo es particularmente útil para estudiar la velocidad y patrón de avance de las enfermedades.

Incidencia (I %): porcentaje de plantas enfermas u órganos afectados

$$I \% = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de plantas enfermas}}{\text{N}^{\circ} \text{ total de plantas}} \times 100$$

La severidad es un indicador que estima el área afectada por la enfermedad en los órganos. Es decir, es el porcentaje o proporción de la superficie del órgano enfermo, ya sea de hojas, tallos, raíces o frutos. El ejemplo típico de esta forma de estimar la enfermedad es el que se realiza con respecto a las manchas foliares. La severidad refleja con precisión la relación de la enfermedad con el daño que le provoca al cultivo. Su evaluación es más compleja que la determinación de la incidencia, porque puede ser subjetiva y por lo tanto requiere no solo de entrenamiento por parte del evaluador, sino convenientemente el uso de escalas diagramáticas de severidad. Estas escalas permiten cuantificar una enfermedad a través de la representación ilustrada de una serie de plantas o partes de ellas con síntomas en diferentes niveles.

Severidad (S %): área porcentual afectada de un órgano (flores, hojas, frutos, bulbos)

$$S \% = \frac{\text{Área de tejido enfermo}}{\text{Área Total (sano + enfermo)}} \times 100$$

Estos indicadores surgen de observaciones realizadas en muestreos, pudiendo éstos relevarse en intervalos de tiempo determinados, de manera tal que permitan confeccionar curvas de progreso de las enfermedades. Las siguientes curvas (Figura 1) ilustran ejemplos a cerca de la evolución en el tiempo de enfermedades monocíclicas y policíclicas, respectivamente.

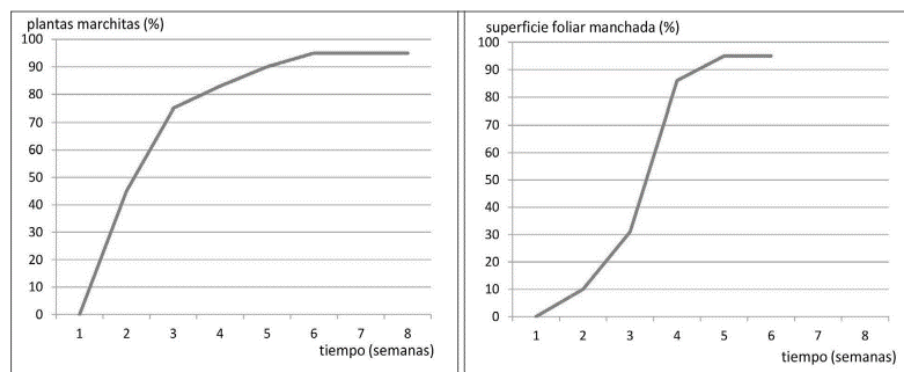


Figura 5.1. Ejemplo de curvas de progreso de una enfermedad a) Monocíclica b) Policíclica.

Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad: La determinación del área bajo la curva de progreso de la enfermedad es indicador que permite caracterizar la epidemia de la enfermedad, considerando el rendimiento de la planta como producto de la acumulación de fotosintatos a lo largo de un período de crecimiento y no de alguna etapa fenológica en particular. Este indicador se calcula integrando los rectángulos formados por el punto medio de la intensidad de la enfermedad (incidencia o severidad) alcanzada entre diferentes tiempos en que se monitorea.

Donde Y_i es la intensidad de la enfermedad (incidencia o severidad) y $(t_{i+1}-t_i)$ es el intervalo de tiempo entre dos evaluaciones consecutivas. En este caso las unidades serán porcentaje para la intensidad (%) y días para el intervalo de tiempo. Además, es bueno decir que este método de análisis epidémico considera la variación de la epidemia en el tiempo, para los análisis comparativos visuales que pudieran requerirse.

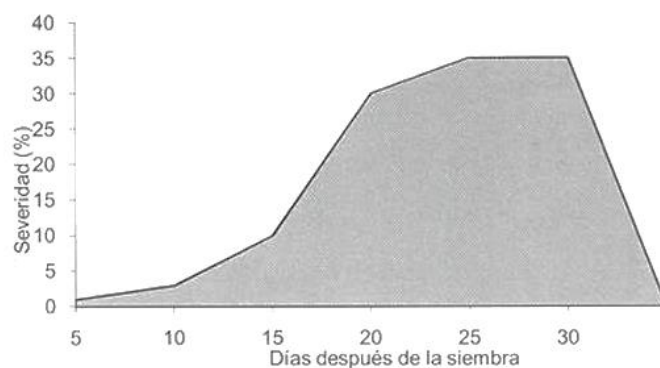


Figura 5.2. Ejemplo gráfico de Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad

ACTIVIDADES PRÁCTICAS

Ejercicio 1

La siguiente tabla resume los resultados de un ensayo cuyo objetivo era comparar diferentes tratamientos con fungicidas para el control de una enfermedad en vivero. Los valores de la tabla son de la proporción de plantas infectadas en diferentes momentos del período del plantín en vivero.

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

Fechas	Fungicidas			
	A	B	C	Testigo
20 de diciembre	0	0	0	0,02
10 de enero	0	0	0	0,04
1° de febrero	0,03	0,05	0	0,08
20 de febrero	0,07	0,12	0,03	0,20
10 de marzo	0,13	0,24	0,12	0,35
1° de marzo	0,19	0,28	0,23	0,38

- La proporción de plantas infectadas es una manera de cuantificar la enfermedad que se denomina.....
- Dibuja la curva correspondiente a la proporción de plantas infectadas a través del período del plantín en vivero para cada uno de los cuatro tratamientos.
- El mejor tratamiento fue..... porque

Ejercicio 2

- Grafica las curvas correspondientes a los siguientes pato sistemas.
- ¿Qué diferencias encuentras?
- ¿De qué tipo de enfermedad trata en cada caso? (Monocíclica o Policíclica)
- En cada caso indica las fases de la epidemia y relaciona cada una de ellas con el control.

Pato sistema 1. *Araucaria angustifolia* / *Fusarium* ssp / “Fusariosis en pino Paraná”

Días después de la siembra	% plantas infectadas
10	18
20	56
30	82
40	91
50	96
60	97
70	98

Pato sistema 2. *Eucalyptus* ssp. / *Agrobacterium tumefaciens* / “Agalla de corona en Eucalipto en vivero”

Días después de la siembra	% de plantas infectadas
10	1
20	4
30	15
40	31
50	65
60	88
70	94
80	95

Ejercicio 3

Pato sistema 3. *Eucalyptus* ssp. / *Puccinia psidii* / “Roya del Eucalipto”.

La siguiente tabla presenta el promedio de los resultados obtenidos en dos años consecutivos de monitoreo de la enfermedad en vivero.

- a. Calcular para cada año de ensayo el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) a partir de los valores de severidad registrados.

b. Construya un gráfico con las curvas correspondientes a ambos años. ¿Son comparables los resultados obtenidos mediante el cálculo de la ABCPE y el método gráfico?

c. Considerando los elementos del triángulo de la enfermedad, ¿a qué pueden atribuirse las diferencias observadas entre los años de ensayo?

Días	Severidad (%)	
	Año 1	Año 2
0	0	0
10	0	0
20	0	0
30	0	0
40	3	0
50	20	0
60	50	0
70	80	3
80	90	6
90	100	30
100	100	70

BIBLIOGRAFÍA

-Acosta, N. R. 2018. Enfermedades en vivero forestal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/68086>

- Agrios, G. Plant Pathology 5 ° Ed. 2005 Librería Internacional, La Plata, Buenos Aires, Argentina.

- González, L. C. Introducción a la Fitopatología 1 ° Ed 1976 Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas Costa Rica.

-Marraro Acuña, F. & Garran, S.M. 2004. Detección de *Kirramyces epicoccoides*, *Puccinia psidii* y *Coniothyrium zuluense* agentes causales de enfermedades en *Eucayptus* spp en la zona de Concordia, Entre Ríos, Argentina. RIA: 33 (3): 135-148.

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

-The American Phytopathological Society. 2020. Plant disease epidemiology: Temporal aspects. Disease progress. <https://www.apsnet.org/edcenter/disimpactmngmnt/topc/EpidemiologyTemporal/Pages/Disease%20Progress.aspx>.

TRABAJO PRÁCTICO N° 6

MORFOLOGIA DE HONGOS

Objetivos:

Que el estudiante:

- Aplique técnicas para preparaciones microscópicas
- Maneje correctamente la terminología fúngica y conozca la morfología de las estructuras vegetativas y reproductivas de los hongos y su función.
- Adquiera destreza en el uso de claves y diferencie las subdivisiones de interés fitopatológico.

Introducción:

Los hongos son organismos eucariotas, aclorófilos portadores de esporas, se reproducen sexual y asexualmente con estructuras somáticas generalmente filamentosas y ramificadas están rodeadas por paredes celulares que contienen quitina y otras moléculas orgánicas complejas. El talo de los hongos está formado típicamente por filamentos microscópicos denominados hifas, las cuales pueden ser cenocíticas o septadas. El conjunto de hifas que constituyen el talo del hongo se denomina micelio. La mayoría de los hongos se diferencian por sus características morfológicas, a nivel genérico, específico y varietal por lo que es importante para el patólogo vegetal, reconocer las estructuras vegetativas y reproductivas para la identificación y posterior diagnóstico.

ESTRUCTURAS VEGETATIVAS

Elementos vegetativos de resistencia

Rizomorfo: Cordones de hifas entrelazadas rodeadas de una corteza gruesa y dura, resistentes a condiciones adversas permaneciendo en reposo hasta que el medio vuelve a hacerse favorable y entonces reanuda el crecimiento. Lo presentan los hongos superiores.

Esclerocio: órgano de resistencia, duro, adaptado a condiciones desfavorables, puede permanecer en reposo durante largos períodos de tiempo y germinar al volver las condiciones favorables. Estos cuerpos están formados, en la capa externa, por tejido pseudoparenquimático y la interna por tejido prosenquimático.

Clamidospora: cuando las células de las hifas o de conidios, pierden agua, se redondean de una pared gruesa, quedan constituidas las clamidosporas. Pueden ser terminales o intercalares. Funcionan como esporas de resistencia.

Elementos de nutrición

Haustorio: excrescencias de las hifas somáticas, que se introducen en las células del hospedante a través de poros practicados en la pared celular. Pueden tomar variada formas con carácter sistemático. Su función es la de aumentar la superficie de absorción de los hongos parásitos.

Paráfisis: hifas estériles, alargadas, algunas veces ramificadas, no septadas, que se originan en la base de los cuerpos fructíferos (peritecio, apotecio, basidiocarpo y en teleutosoros de algunas especies de royas). Crecen entre los elementos fértiles que componen el himenio. Algunos consideran que intervienen en la nutrición de los ascos en formación; favorecen la diseminación de las esporas.

Elementos de fijación

Apresorio: órgano hifal aplanado que pone en contacto la espora con el sustrato y a partir del cual se forma una púa o hifa infectiva que penetra en la célula epidérmica del hospedante.

Rizoide: ramificación corta y delgada del talo similar a raíces que actúan como órgano de fijación y absorción de agua y nutrientes.

Elementos de sostén

Esterigma: estructura hifal pequeña que sostiene un esporangio, conidio o basidiospora.

Fiálide: esterigma en forma de botella, es un tipo de célula conidiógena que origina conidios blásticos.

Conidióforo: hifa fértil que porta conidios, puede ser simple o ramificada, nace de una hifa somática y lleva en el ápice o lateralmente una o más células. Los conidióforos pueden formarse de una manera aislada, o en grupos dando lugar a estructuras especializadas como los sinemas y esporodoquios o bien producirse en el interior de fructificaciones denominadas picnidios y acérvulas.

Esporangióforo: hifa portadora de un esporangio.

Zoosporangióforo: hifa que soporta un zoosporangio.

Elementos de diseminación

Fulcras: apéndices externos que contribuyen a la dispersión de los cleistotecios de las Erysiphales al adherirse a insectos o aves, o simplemente por el viento.

Paráfisis: estos elementos estériles absorben agua, se expanden sacudiendo los ascos y diseminando así las ascosporas.

ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS

Estructuras asexuales

Zoosporangio: fructificación que lleva esporangiosporas móviles denominadas zoosporas.

Esporangio: Estructura sacciforme cuyo contenido se convierte en su totalidad por segmentación en una o más esporas.

Sinema: grupo de conidióforos unidos en la base y parcialmente en su parte superior, quedando los conidióforos en la parte superior libres.

Esporodoquio: los conidióforos cortos están densamente empaquetados, cortos, surgen de un estroma en forma de almohadilla.

Picnidio: cuerpo esférico o en forma de botella, con el interior tapizado de conidióforos. Las paredes de los picnidios son pseudoparenquimáticas. Pueden ser superficiales o estar hundidos en el sustrato o tejido estromático.

Acérvula: es un estrato plano o en forma de platillo formado por conidióforos cortos que crecen uno al lado del otro y que surgen de una masa más o menos estromática de hifas. En la naturaleza, las acérvulas se producen sobre los tejidos vegetales de manera subepidérmica o subcuticular y finalmente se hacen erumpentes. Una acérvula carece de pared definida y no poseen ostíolo. Algunas veces van acompañadas de setas (pelos).

Esporas asexuales

Esporangiospora: espora producida asexualmente en el interior de esporangios, pueden ser móviles o no.

Zoospora: esporangiospora móvil.

Conidio: espora asexual no móvil. En el caso de algunos hongos inferiores (Peronosporales), se hace referencia a un esporangio entero que actúa como espora y germina por un tubo germinal.

Reproducción sexual

Gametangio: órgano sexual de los hongos. Estos órganos sexuales pueden formar células sexuales diferenciadas denominadas gametas o en su lugar pueden contener uno o más núcleos gaméticos.

Isogametangio: gametangios morfológicamente iguales.

Heterogametangio: gametangios morfológicamente diferentes. En este caso, al gametangio masculino se denomina **anteridio** y el gametangio femenino, **oogonio**.

Ascogonio: gametangio femenino de los ascomycetes. Los ascogonios suelen estar provistos de una tricogina que sirve para recibir al núcleo masculino. La tricogina es el conducto receptor del ascogonio, que a menudo es largo y en forma de pelo. En algunos grupos de hongos actúan como órgano femenino.

Espermacio: son células sexuales libres masculinas, diminutas, esféricas, uninucleadas, que se unen a los órganos receptores (sean estos tricoginos o hifas somáticas) y vacían su contenido en ellos.

Fructificaciones sexuales

Ascocarpos: cuerpos fructíferos portadores de tejido himenial (ascos y elementos estériles). Se clasifican en:

a. Cleistotecio: estructura completamente cerrada en cuyo interior se disponen los ascos de manera ordenada (Erisiphales) o de manera desordenada (Eurotiales).

b. Peritecio: ascocarpo más o menos cerrado, que una vez maduro presenta un poro (ostíolo) a través del cual salen las ascosporas. Tienen una pared propia verdadera. Las paredes internas del cuello peritecial están tapizadas por pelos cortos denominados perífisis. El himenio se dispone en la base del peritecio presentando o no paráfisis.

c. Apotecio: ascocarpo abierto formado por el himenio que es una capa de ascos y paráfisis pudiendo ser estas más largas que los ascos. Cuando se unen los ápices por encima de los ascos se forma el epitecio. El hipotecio es una capa delgada de hifas entretejidas situadas inmediatamente debajo del himenio. El apotecio propiamente dicho (es decir, la parte carnosa del ascocarpo que sostiene al hipotecio y al himenio) se denomina excípulo. Este consta de excípulo ectal que es la capa externa del apotecio formada por tejido pseudoparenquimático y el excípulo medular que es la parte interna formado por tejido prosenquimático.

Basidiocarpo: cuerpo fructífero portador de basidios, la estructura de estos es muy variada, alcanzando en los basidiomycetes su mayor tamaño y complejidad. No todos los basidiomycetes presentan basidiocarpo, por ejemplo, royas y carbones. El himenio en los basidiocarpos, es una capa formada por basidios y elementos estériles denominados basidiolos y cistidios. Los basidiolos se consideran basidios inmaduros. Los cistidios, actuarían como trampas de aire, ayudan a la evaporación del agua y otros componentes volátiles. Tienen importancia taxonómica y no están presentes en todas las especies.

Basidio: estructura que lleva sobre su superficie un número definido de basidiosporas (típicamente cuatro) que se forman por regla general después de la cariogamia y meiosis.

Esporas de origen sexual

Oospora: Espora que se origina luego de un proceso sexual (contacto gametangial).

Zigospora: Espora de resistencia que se forma previa fusión de dos gametangios (copulación gametangial).

Ascosporas: Esporas haploides que se forman en el asco luego de la meiosis.

Basidiospora: Espora formada sobre la parte externa de un basidio, luego de cariogamia y meiosis.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

1) Con el material provisto por la cátedra realice observaciones macroscópicas, con lupa y con microscopio óptico.

2) Monte preparaciones para observación microscópica de cada material que se le proporcione.

3) Determine las estructuras que permitan la identificación de un hongo y dibújelas.

4) Medir estructuras observadas.

5) Mediante el uso de claves identifique el género de cada uno de los hongos observados

6) Haga búsqueda bibliográfica e indique en qué problemas fitopatológicos participan los hongos observados

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. Méjico. Limusa. (5° reimpresión en español). 766pg.

- Alexopoulos, C. J. & C. W. Mims 1985. Introducción a la Micología. Ed. OMEGA. Barcelona. 621pg.

- FAO. 1986. Manual para Patólogos Vegetales. Ed. Pedro Aguilar F. 431pg.

- Linquist, J. C. 1967. Claves de los géneros de hongos fitopatógenos. Revista de la Facultad de Agronomía. Tomo XLIII

ILUSTRACIONES

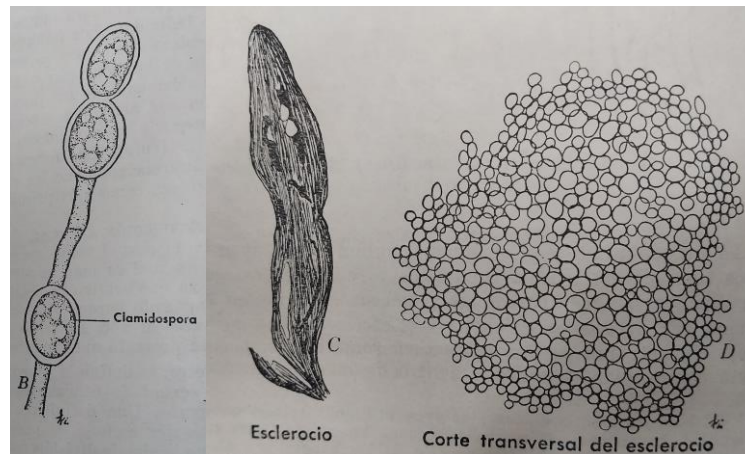


Figura 6.1. Estructuras vegetativas de resistencia. Imagen tomada de Alexopoulos

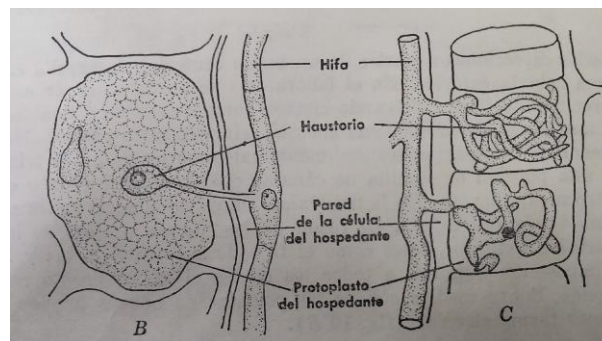


Figura 6.2. Estructura de nutrición

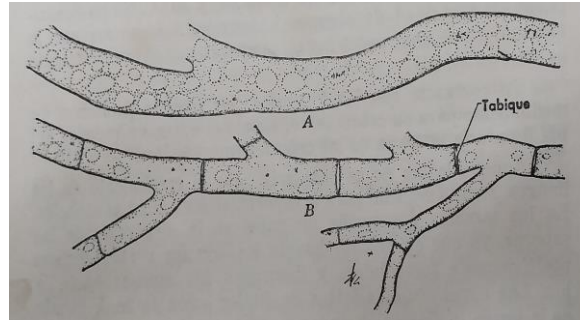


Figura 6.3. Hifas cenocíticas y tabicadas

ILUSTRACIONES

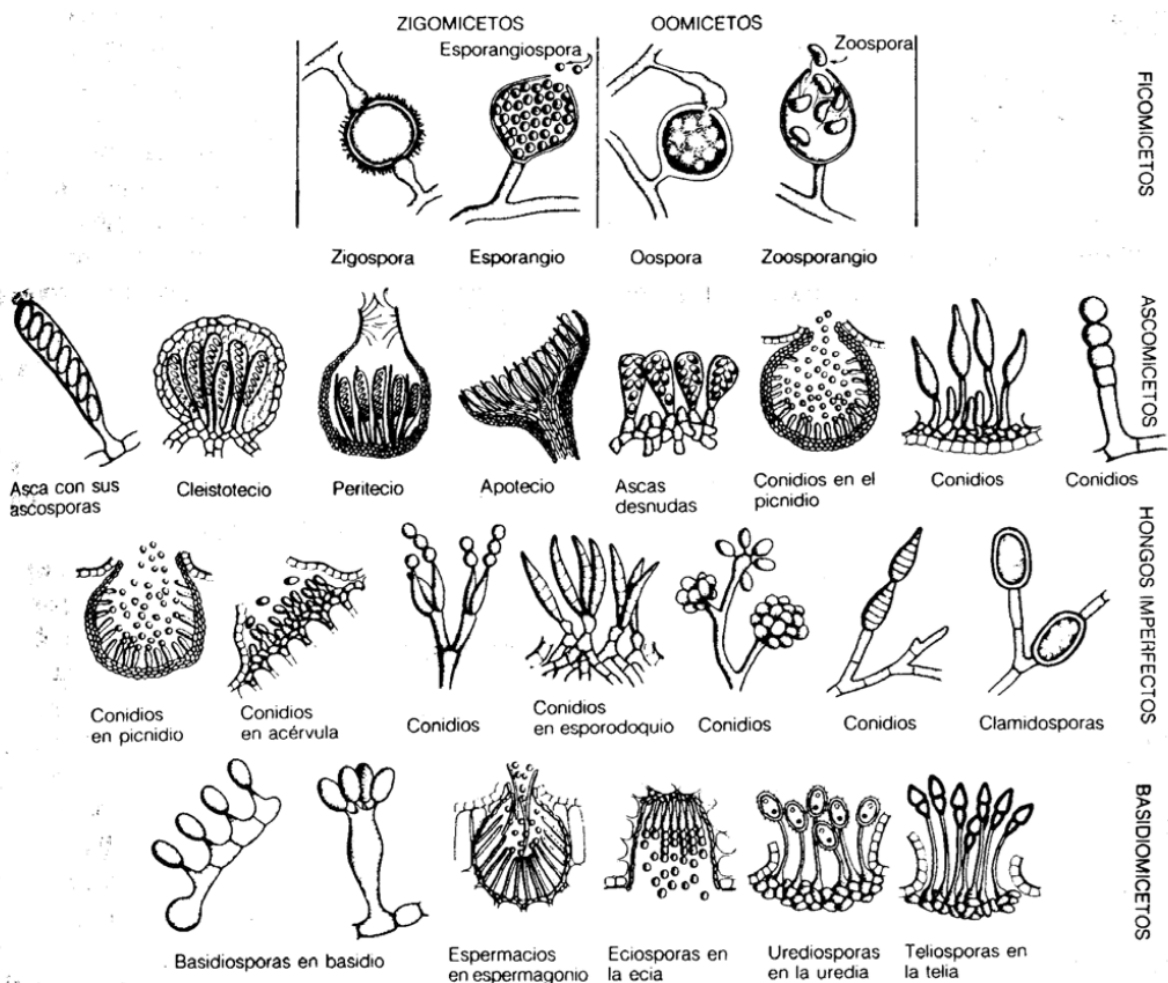


Figura 6.4. Esporas y cuerpos fructíferos representativos de los principales grupos de hongos. Tomado de Agrios 1991.

Géneros de Hongos Fitopatógenos

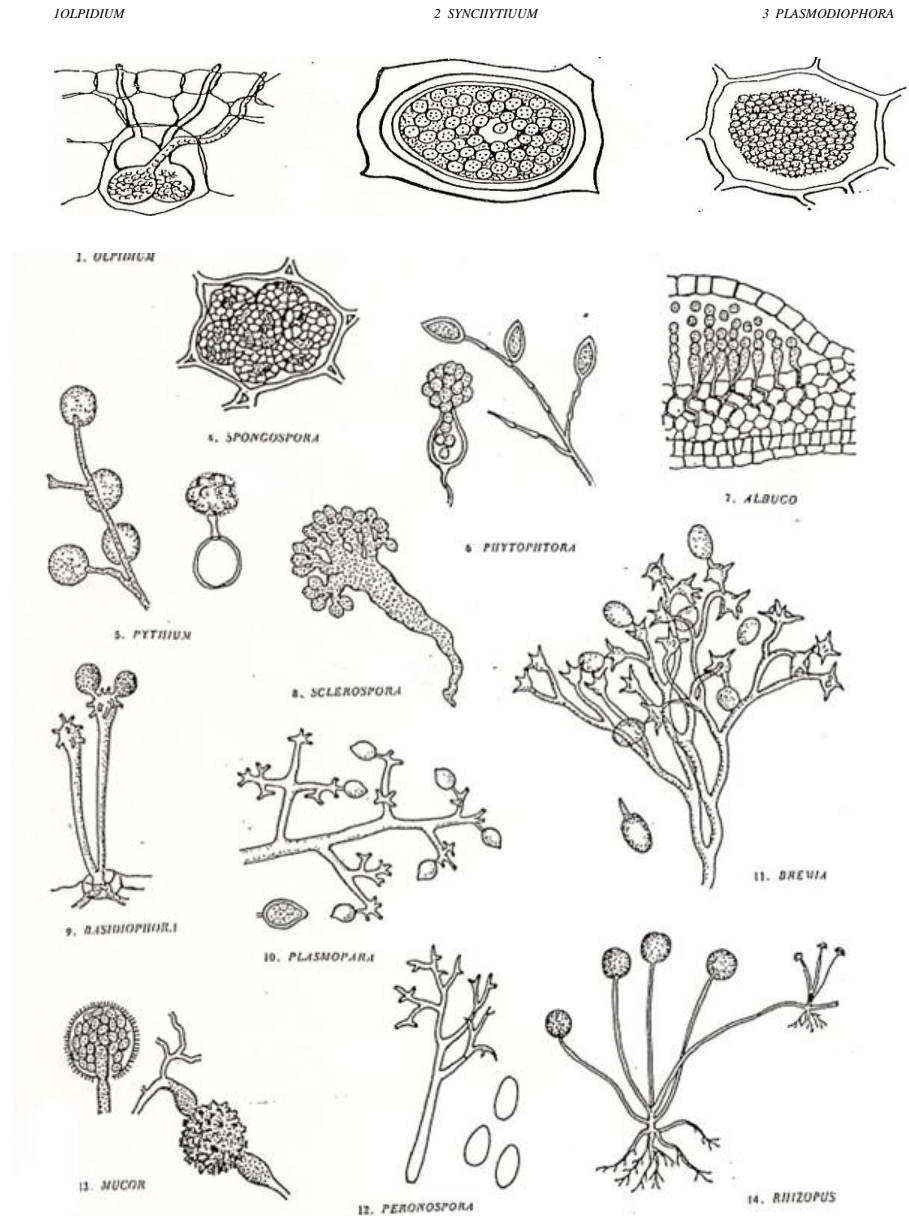


Figura 6.5. Géneros de hongos fitopatógenos. Imagen tomada de Lindquist 1967

Géneros de Hongos Fitopatógenos

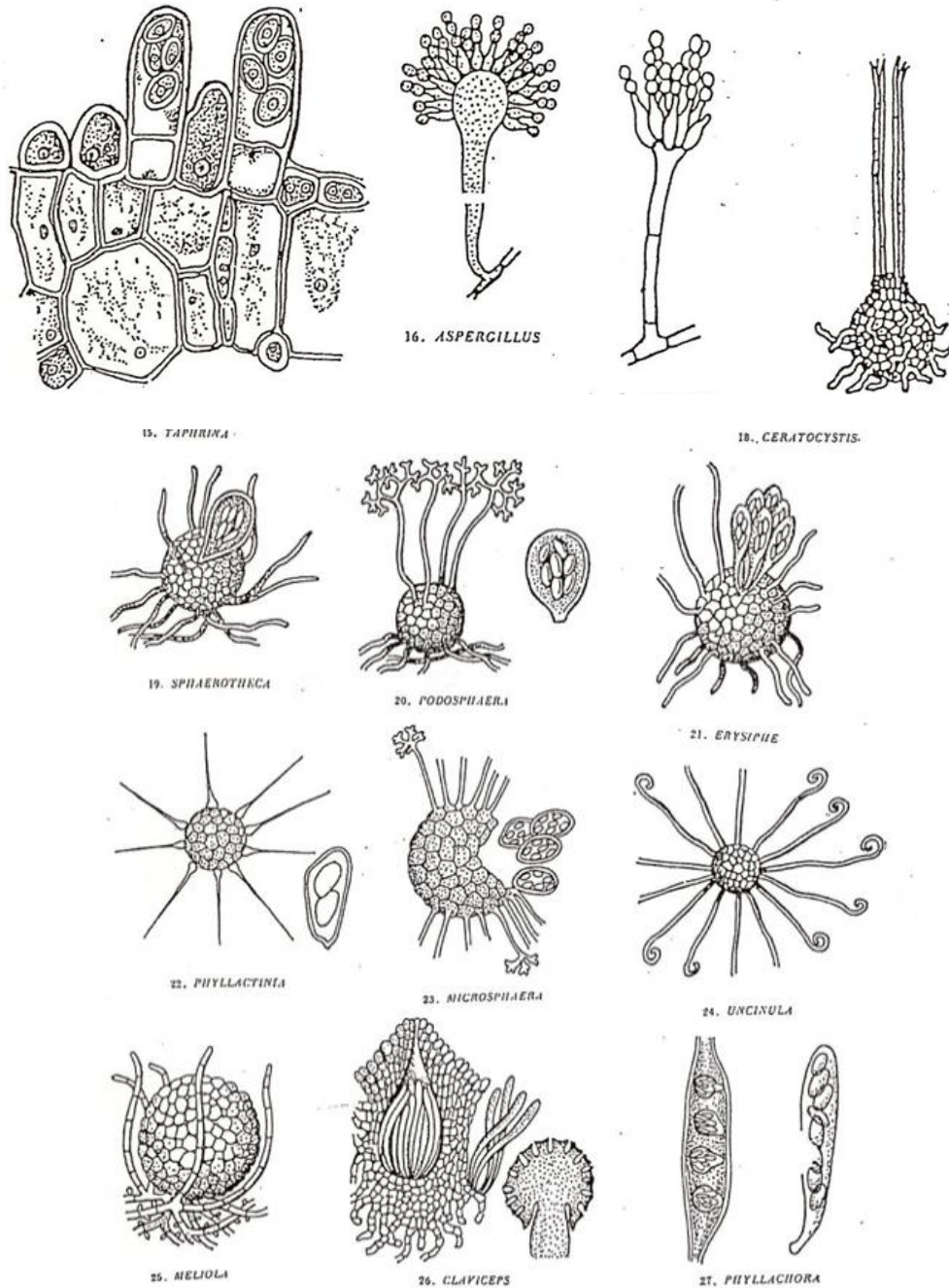


Figura 6.6. Géneros de hongos fitopatógenos. Imagen tomada de Lindquist 1967.

Géneros de Hongos Fitopatógenos

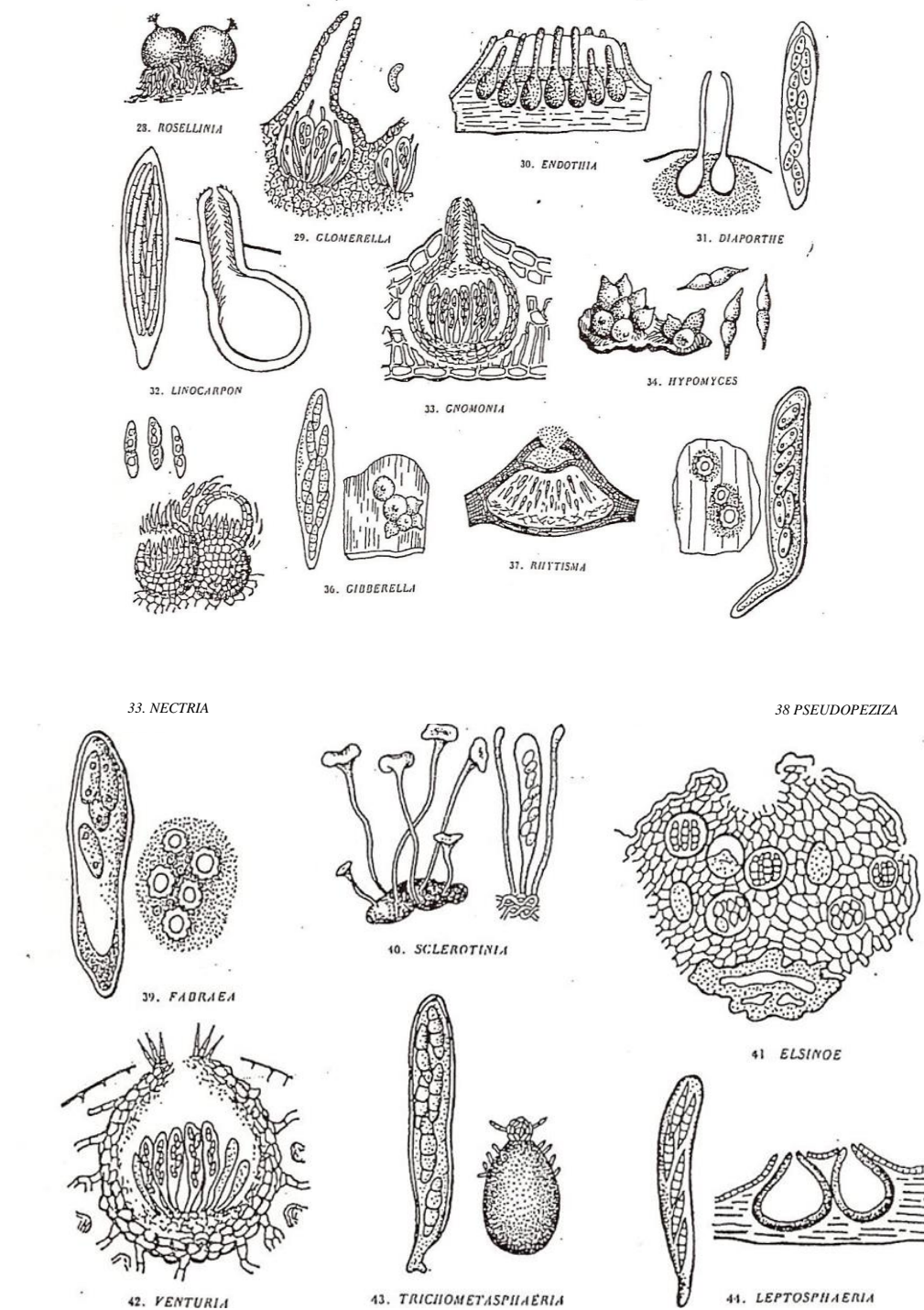


Figura 6.7. Géneros de hongos fitopatógenos Imagen tomada de Lindquist 1967

Géneros de Hongos Fitopatógenos

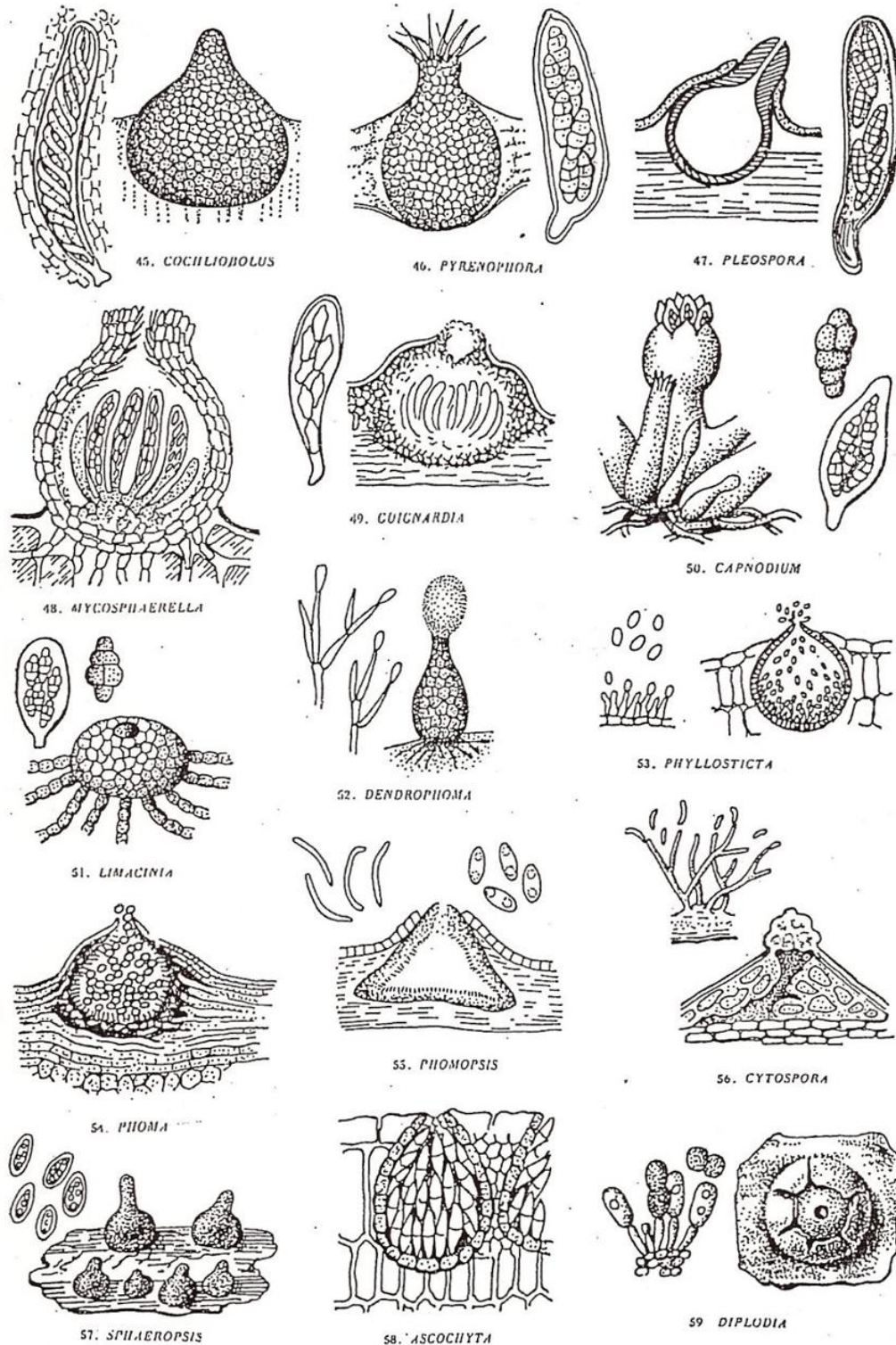


Figura 6.8. Géneros de hongos fitopatógenos Imagen tomada de Lindquist 1967

Géneros de Hongos Fitopatógenos

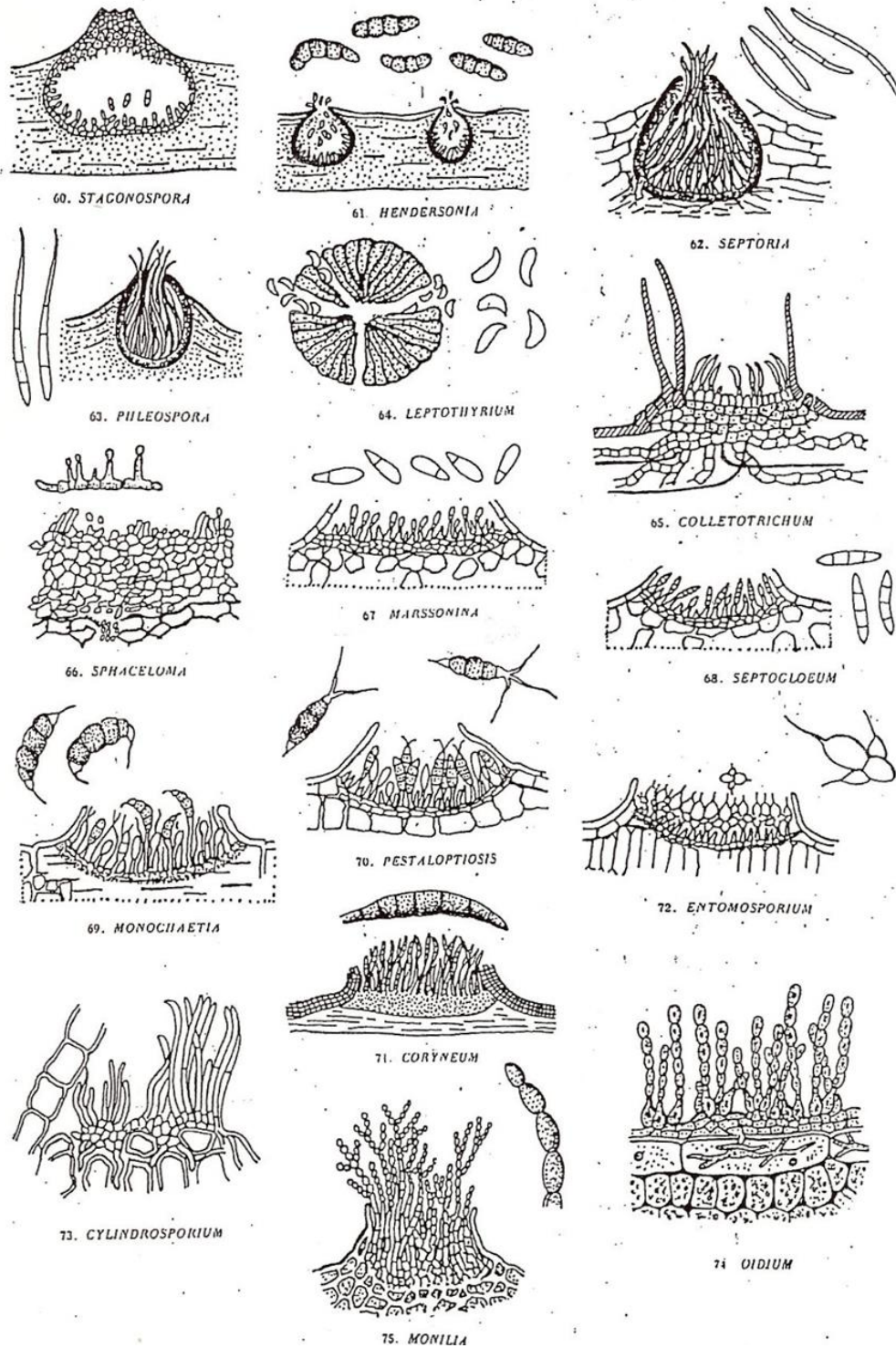


Figura 6.9. Géneros de hongos fitopatógenos Imagen tomada de Lindquist 1967

Géneros de Hongos Fitopatógenos

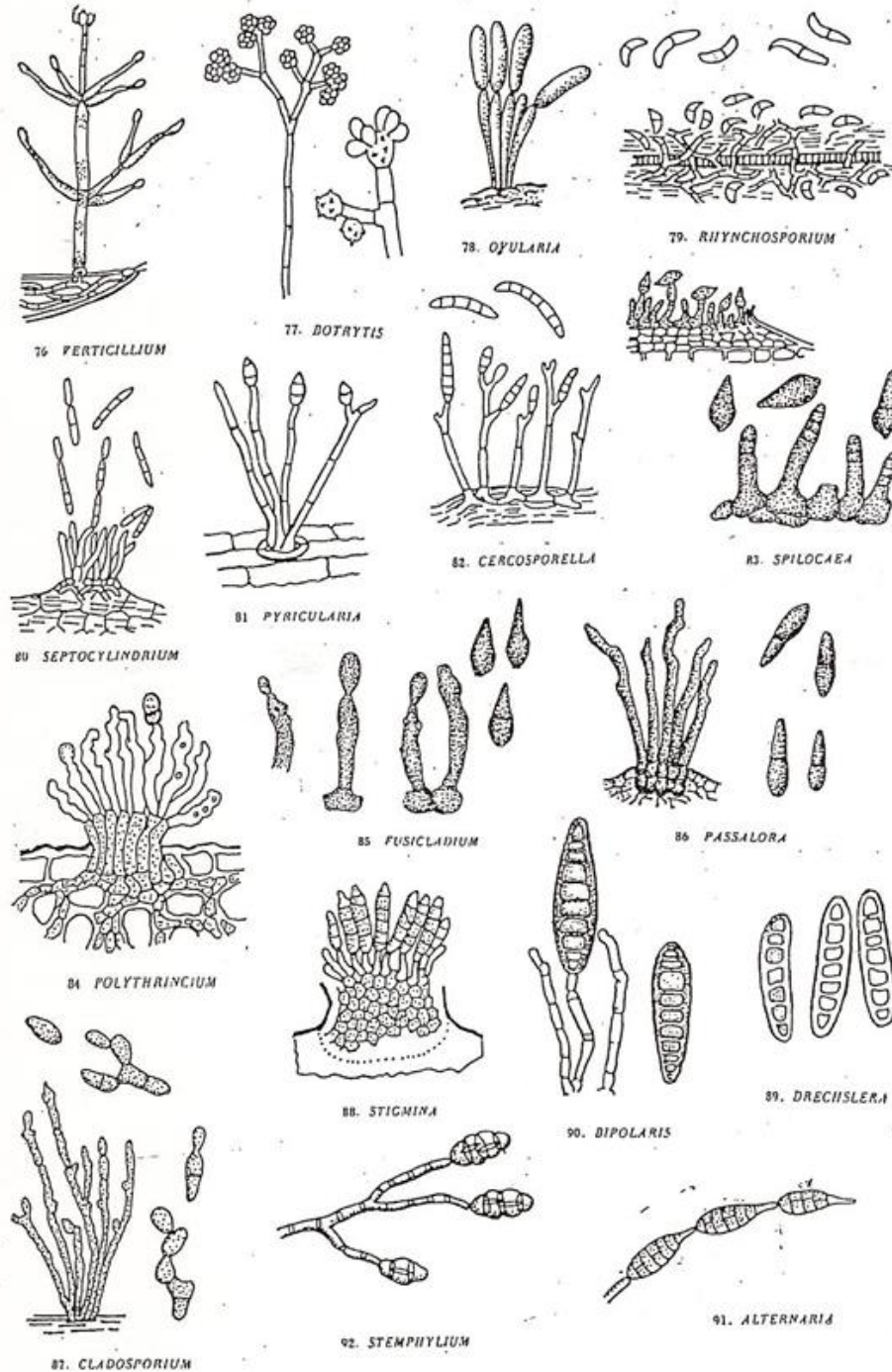


Figura 6.10. Géneros de hongos fitopatógenos Imagen tomada de Lindquist 1967

Géneros de Hongos Fitopatógenos

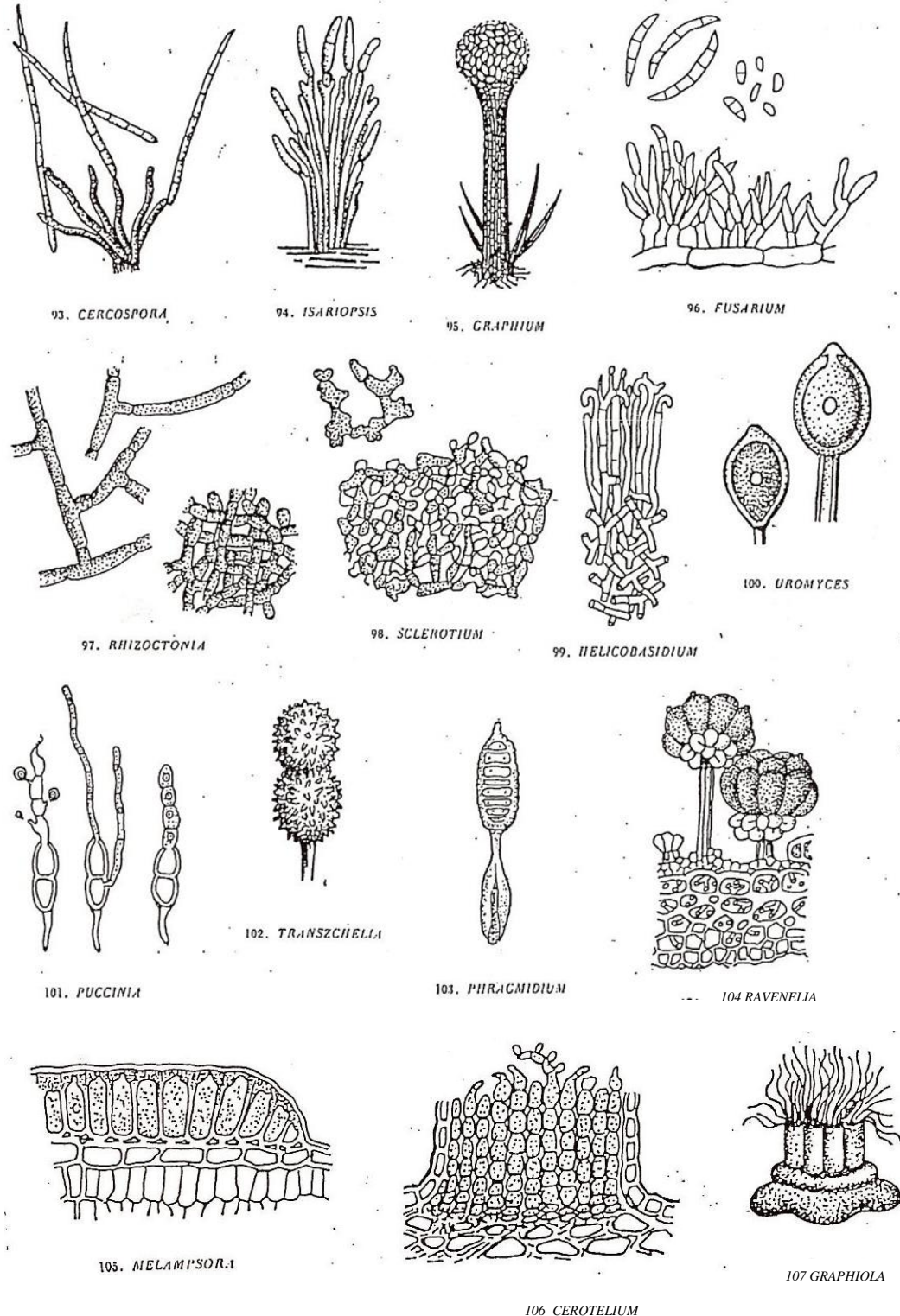


Figura 6.11. Géneros de hongos fitopatógenos Imagen tomada de Lindquist 1967

Géneros de Hongos Fitopatógenos

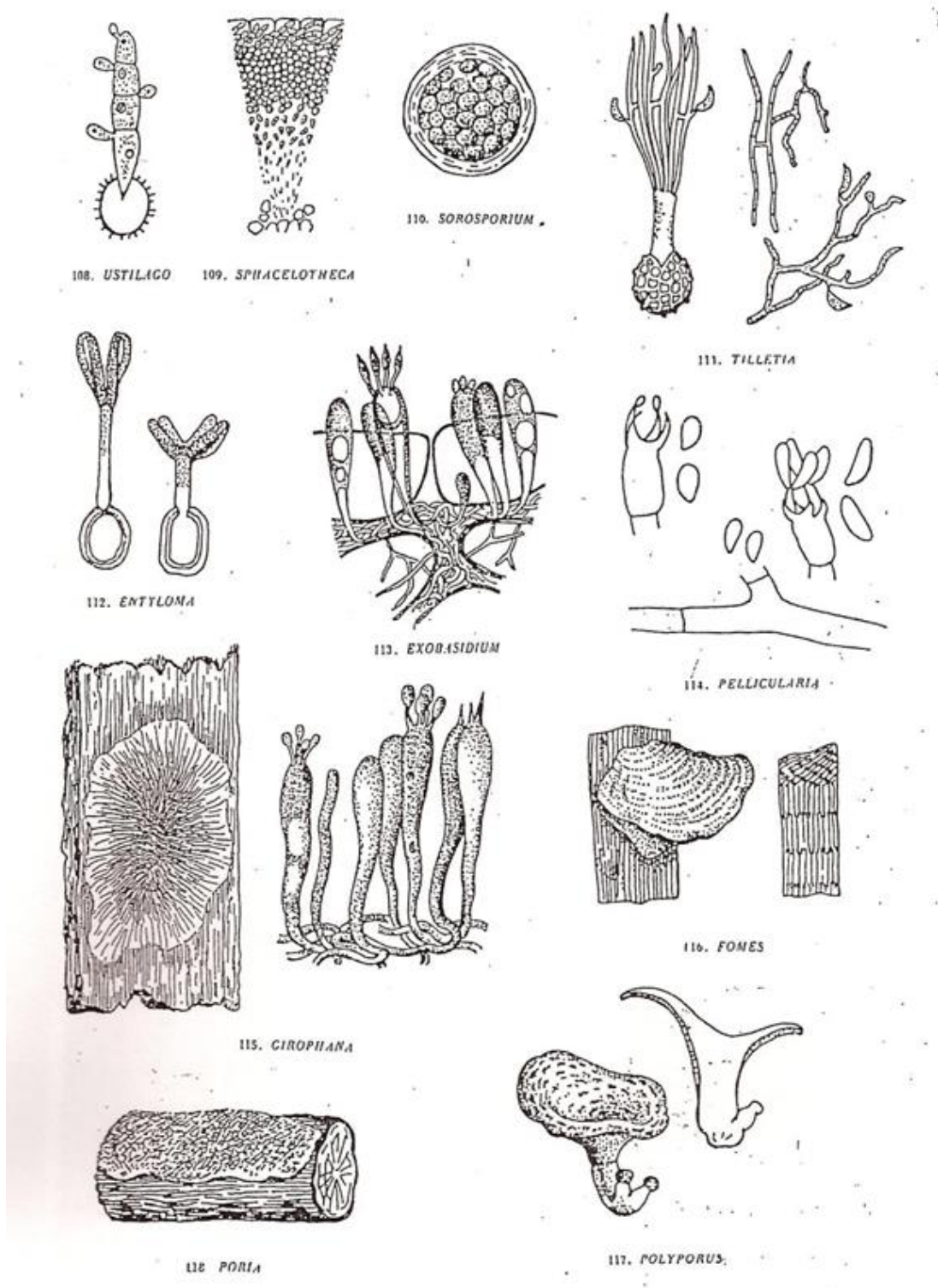


Figura 6.12. Géneros de hongos fitopatógenos Imagen tomada de Lindquist 1967

TRABAJO PRÁCTICO N° 7

BACTERIOS

Objetivos:

Que el estudiante logre:

- Aprender técnicas sencillas para la observación de células bacterianas.
- Practicar pruebas simples para identificar una bacteriosis
- Realizar siembras y aislamientos de bacterios.

Introducción:

Los bacterios son microorganismos unicelulares, procariotas, capaces de producir enzimas y toxinas, de tamaño pequeño (1-3 μ m) de estructura celular muy simple.

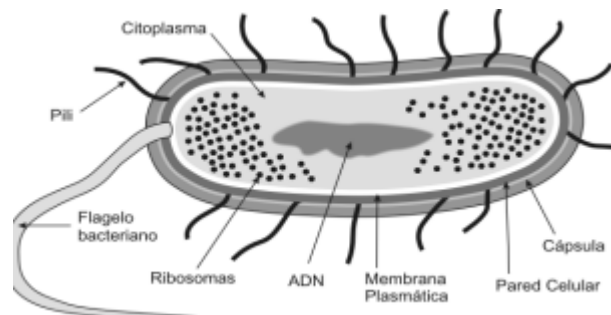


Figura 7.1. Esquema de una célula bacteriana. Imagen tomada de Pedranzani et. al. (2018).

Pueden poseer pigmentos solubles o insolubles según los géneros, por ejemplo, *Xanthomonas* forma en medio de cultivo colonias amarillas. Aumentan su población en el sustrato (suelo, plantas, etc.) o medio de cultivo en el que se encuentran por fisión binaria. Esto ocurre en forma común, cumpliendo una célula todo su ciclo de vida en aproximadamente 20 minutos. Los bacterios prefieren pH alcalino o próximo al neutro.

Hay bacterios benéficos como el conocido *Rhizobium sp.*, fijador de nitrógeno libre, y los hay patógenos del hombre, animales y plantas.

Para la taxonomía del grupo se debe utilizar las propiedades bioquímicas y la fisiología de la célula bacteriana. Los medios de cultivo ocupan un lugar importante en este aspecto. Por el tamaño reducido y el color translucido de las células bacterianas los colorantes y el microscopio óptico común y el electrónico son herramientas necesarias.

Características de los Bacterios Fitopatógenos

En todo el mundo, los bacterios fitopatógenos causan muchas enfermedades serias, pero en menor número que los hongos o los virus. De manera general los bacterios como patógenos vegetales pueden causar enfermedades graves y económicamente dañinas, ocasionando desde manchas, mosaicos, pústulas en hojas y frutos, o podredumbres malolientes de tubérculos hasta la muerte de las plantas. Algunas causan una distorsión de las hojas y tallos. Estos bacterios por lo general son de forma bacilar, presentan motilidad con flagelos, son aerobios, todos se pueden cultivar en medios artificiales, y no forman "endosporas" (estructuras de resistencia).

Tinción de Bacterios

La tinción es un método sencillo para incrementar el contraste entre la célula bacteriana y su entorno y por lo tanto contribuye a mejorar la imagen observada. Las técnicas de tinción con diversos colorantes facilitan la observación al aumentar notablemente el contraste.

En Fitopatología todas las tinciones se realizan a partir de suspensiones de microorganismos extendidas en un portaobjetos (frotis), secadas y fijadas. La fijación, procedimiento que permite preservar estructuras celulares, se puede llevar a cabo con diferentes tratamientos: fijación por calor o fijación química. La fijación por calor es la más utilizada para la observación de bacterias. Este procedimiento consiste en pasar el portaobjetos, con la suspensión bacteriana extendida y seca, a través de una llama de un mechero. La fijación por calor preserva la morfología externa de los microorganismos, pero

no las estructuras internas. La fijación química con agentes como etanol, formaldehído y ácido acético entre otros muchos, se utiliza para preservar las estructuras celulares.

Se pueden utilizar dos tipos de procedimientos, la tinción positiva es la más frecuente, en ella un colorante se une a ciertas estructuras microbianas. Todos los colorantes utilizados en microbiología tienen en común la presencia de grupos cromóforos, grupos con dobles enlaces conjugados que son los responsables del color mediante la unión a estructuras celulares por enlaces iónicos, covalentes o hidrófobos, los que establecen enlaces iónicos son los más frecuentes.

Por otra parte, en la tinción negativa se utilizan compuestos que no penetran en las células, sino que impregnan el medio circundante. Los microorganismos aparecen refringentes sobre un fondo negro.

Tinción Simple

La mayoría de los colorantes utilizados en las tinciones positivas son colorantes derivados de las anilinas.

Se denominan colorantes básicos si el cromóforo (porción coloreada) de la molécula está cargada positivamente, por ejemplo, cristal violeta (Fig. 5) y azul de metileno son colorantes básicos. Otros colorantes de esta categoría utilizados con frecuencia en bacteriología son safranina, fuchina básica y verde malaquita. Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayor parte de los procariotas tienen un pH interno próximo a la neutralidad (pH 7.0) y una superficie celular cargada negativamente, así los colorantes básicos son los más eficaces. Colorantes ácidos con rojo Congo, rosa de bengala, eosina y fuchina ácida tiene un cromóforo cargado negativamente y son utilizados para teñir positivamente ciertos componentes como las proteínas.

Tinción Diferencial

Las tinciones diferenciales se utilizan ampliamente en microbiología; consisten en la aplicación de dos colorantes que contrastan en su intensidad o color y un paso intermedio que provoca una respuesta diferente entre microorganismos distintos o entre determinadas células dentro de una población. La diferenciación puede ser provocada por un agente químico o físico, permitiendo observar dos tipos de respuestas diferentes a la tinción en una misma muestra. Una de las tinciones diferenciales más utilizadas en bacteriología es la tinción de Gram.

Tinción de Gram

Esta tinción fue propuesta por el médico danés Christian Gram (1884). Es la tinción diferencial más utilizada de forma rutinaria y prácticamente la primera prueba a la que se someten las muestras de cualquier origen antes de su estudio. Proporciona una información esencial, además de sobre la forma, tamaño y agrupación celular, como es el tipo y composición de la pared que presentan las bacterias. La tinción de Gram divide a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias con pared de tipo Gram positiva y bacterias con pared de tipo Gram negativa.

Tinciones Estructurales

Son tinciones para la observación al microscopio óptico de determinadas estructuras de los microorganismos, estas tinciones incluyen la visualización de cápsulas, endosporas, flagelos etc. Describiremos las más frecuentes en un laboratorio de microbiología

ACTIVIDAD PRÁCTICA

1) Preparar una suspensión de células en agua destilada estéril a partir de colonias de un cultivo, o utilizar tejido enfermo previamente desinfectado, eligiendo trocitos que se dejan macerar en agua para que los bacterios del interior difundan en el medio acuoso.

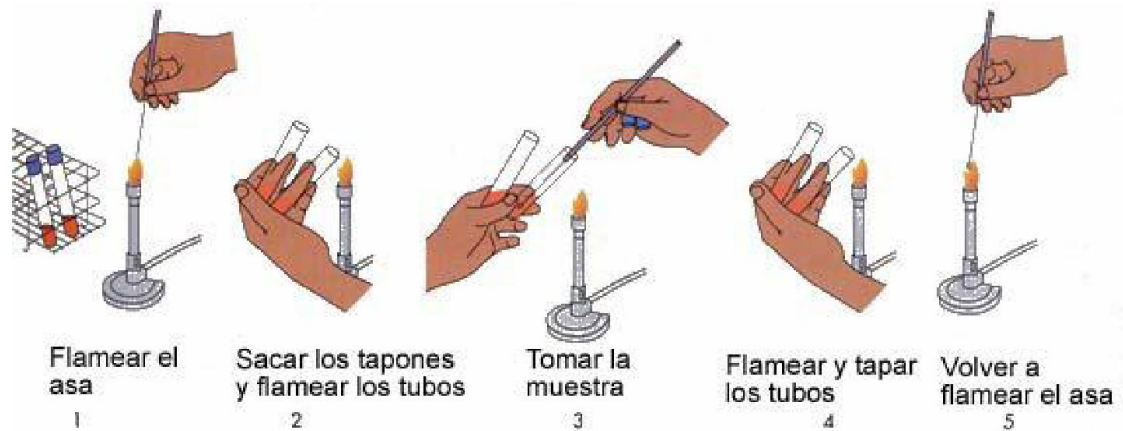


Figura 7.2. Esquema que muestra la técnica para preparar una suspensión bacteriana

2) Para observar motilidad de las células bacterianas proceda del siguiente modo:

- Flamear el ansa y tomar una gota de la suspensión y depositarla sobre un cubreobjeto limpio.
- Con cuidado invierta el cubreobjetos sobre un portaobjetos haciendo coincidir la gota con la excavación.
- Proceda a observar la gota con el microscopio utilizando los objetivos 10x y 40x.
- Detecte si hay movimiento y describa el tipo del mismo.



Figura 7.3. Esquema de la técnica de la gota colgada

3) Para observar forma de la célula, u otras estructuras como flagelos (cantidad y ubicación), etc., deben utilizarse colorantes que se aplican sobre un “frotis”. Para el frotis

utilizar una gota de la suspensión bacteriana que se deposita sobre un portaobjetos perfectamente desengrasado.

Luego proceda a su extensión y fijación por calor. Debe quedar una película homogénea que puede ser sometida a la acción de algún colorante.

Coloraciones

Ejercicio N°1

Sobre un portaobjetos desengrasado realizar un frotis colocando una gota de suspensión bacteriana con una gota de Nigrosina. Extender y dejar secar.

Antes de llevar al microscopio, colocar una gota de aceite para inmersión y observar con el objetivo 100x.

Ejercicio N°2

Coloración de Gram

Pasos

- 1 Preparar un frotis fijado por calor.
- 2 Cubrir la zona extendida con cristal violeta 1 minuto.
- 3- Eliminar el colorante por arrastre con agua, durante 2 a 3 segundos.
- 4- Cubrir con lugol durante 1 minuto, lavar con agua por arrastre, secar al aire
- 5- Lavar por goteo lento con alcohol 95° ½ minuto. Dejar evaporar
- 6- Cubrir con safranina ½ minuto.
- 7- Eliminar el colorante con agua por arrastre.
- 8- Dejar secar al aire
- 9- Para observar al microscopio, colocar una gota de aceite para inmersión y enfocar utilizando sólo el objetivo 100x.
- 10- Anote los resultados obtenidos, y limpie el microscopio antes que el aceite de inmersión se seque y deteriore la lente.

Interpretación de resultados

1) Bacterios Gram (+) -----□color azul o II) Bacterios Gram (-) -----□color rosado

Siembras en superficie de bacterios utilizando una suspensión

Material necesario:

Cajas de Petri esterilizadas

Medio de cultivo

Suspensión bacteriana (de cultivos o de tejido enfermo)

Mechero

Alcohol 70°

Ansa o espátula

Cámara de incubación (+/- 28°C)

Procedimiento

1. Preparar una suspensión bacteriana
2. Fundir a baño maría el medio de cultivo
3. Verter con asepsia en las cajas de Petri
4. Flamear el ansa y cargarlo con suspensión bacteriana
5. Depositar la gota en la caja preparada y “estriar” en zig-zag
6. Llevar a incubar y observar a las 24-48 hs
7. Observar tipo y características de colonias (color, forma, brillo, bordes).

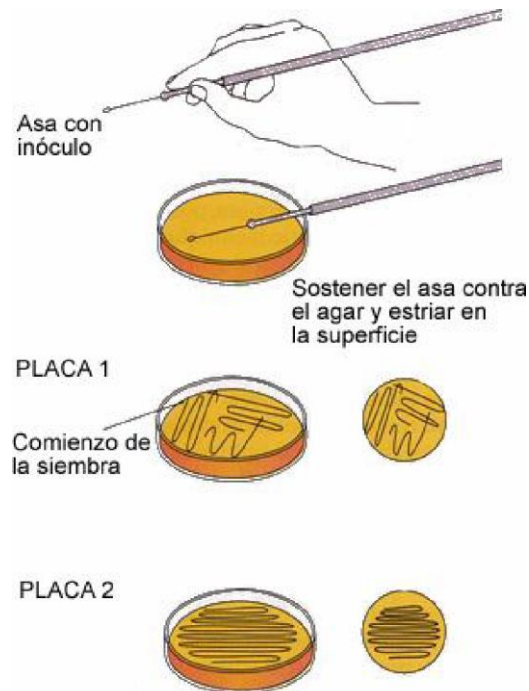


Figura 7.3. Siembra en superficie

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. Méjico. Limusa. (5° reimpresión en español). 766pg.
- FAO. 1986. Manual para Patólogos Vegetales. Ed. Pedro Aguilar F. 431pg.
- Frioni, L. 2006. Microbiología básica, ambiental y agrícola. Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental del Uruguay, 466pg. Disponible en: https://www.ciaorganico.net/documypublic/382_infoagronomo.net_-_Microbiologia_basica_ambiental_y_agricola_lilian_friomi_2006.pdf

TRABAJO PRÁCTICO N° 8

FUNGICIDAS. DOSIS Y CONCENTRACIÓN

Objetivo:

-Que el estudiante logre adquirir destreza en la resolución de problemas relacionados con el uso y la aplicación de productos químicos.

Introducción:

Los fungicidas abarcan una gama muy amplia de compuestos químicos que se aplican al suelo, al follaje o a las semillas que provocan la muerte de los hongos o retrasan el desarrollo o inhiben alguna fase de su ciclo. Para la aplicación de un fungicida, además de todas las recomendaciones de buenas prácticas y de seguridad, se debe tener el claro los conceptos de dosis y de concentración

Formulación de fungicidas

Como fungicidas rara vez se aplican en forma pura, lo más frecuente es emplearlos formulados. Una formulación es la combinación de varios ingredientes para hacer que el fungicida sea útil eficaz; es la forma mediante la cual se comercializa el fungicida. Es decir que un fungicida, para su uso, debe acondicionarse con sustancias coadyuvantes que faciliten su dispersión en un vehículo, por ejemplo, agua.

En las formulaciones intervienen tres grupos de componentes o sustancias: i) producto activo es el principio o materia activa, o sea el responsable de los efectos tóxicos sobre enfermedad; ii) Disolventes o diluyentes, actúa como vehículo del producto activo, para lograr una distribución homogénea sobre la superficie que se aplica; iii) Coadyuvantes, ayudan a mejorar el efecto del producto activo encontrándose entre ellos

agentes tensioactivos, agentes de fluidez, adherentes, adsorbentes, tamponadores de pH, activadores, agentes de suspensión y estabilizantes.

Existen diferentes tipos de formulaciones:

a. Polvos secos: se presentan como un polvo fino y seco. Se aplican sin ser mezclados con líquidos.

b. Polvos mojables: constan del principio activo más coadyuvante capaz de absorber agua y mantenerse en suspensión. Estos forman una suspensión, por lo que necesita agitación para que el sólido no precipite.

c. Polvos solubles: el principio activo es sólido, generalmente sales, solubles en agua.

d. Granulados: son sólidos de partículas más grandes, donde el principio activo está fijado a la superficie de un inerte.

e. Emulsiones: El principio activo, materia oleosa, está disuelto en un solvente y se le agrega un emulsionante que le permite mezclarse con el agua. Éstas son estables en forma parcial, por lo que necesita agitación durante la aplicación.

f. Floables: como en el caso de las emulsiones, tiene una fase acuosa y una oleosa. La diferencia es que la oleosa está más dispersa y en consecuencia más estable.

g. Soluciones: el principio activo está disuelto en un solvente. No hay emulsionante ya que son soluciones miscibles con el agua (soluciones acuosas) o derivados del petróleo (soluciones oleosas).

Rotulado

La etiqueta, rótulo o marbete de los plaguicidas provee información muy importante, por lo que su lectura atenta y detenida es imprescindible. La distribución de la

información está reglamentada, siguiendo normas internacionales, diferenciándose tres cuerpos. En el cuerpo derecho se brinda la información agronómica del producto, es decir las instrucciones y recomendaciones de uso (cultivos a tratar, dosis y momento oportuno de aplicación) y las restricciones para evitar la presencia de residuos objetables. En el centro menciona marca comercial, composición química, fecha de vencimiento, empresa productora o importadora y número de inscripción en SENASA. En el cuerpo izquierdo se mencionan todas las precauciones para el manipuleo y almacenamiento, los primeros auxilios en caso de accidente, los antidotos, las advertencias para el médico interviniente, la clase toxicológica, si contiene solventes orgánicos en su formulación, los teléfonos de los centros toxicológicos y los riesgos ambientales, así como pictogramas que grafiquen las precauciones particulares del producto. En la parte inferior de la etiqueta, debe tener una banda de color (rojo, amarillo, azul o verde) que identifica la categoría toxicológica del producto.

Toxicidad

Es la capacidad que tiene una sustancia o sus productos metabólicos, en determinadas dosis, de provocar por acción química o químico física un daño a la salud. Es decir que la toxicidad describe lo venenoso que es una sustancia. Para expresar la cantidad de plaguicida que causa una mortalidad determinada, se usa el término Dosis Letal (DL), la que se expresa en miligramos de veneno por kilogramos de peso corporal.

1. Dosis

La dosis es la cantidad de fungicida que se aplica por unidad de superficie (por lo general en hectáreas). Se puede expresar en ingrediente activo o en formulación. Cuando se expresa en ingrediente activo se lo hace en unidad de peso, mientras que cuando se refiere al formulado puede hacerse tanto en unidad de peso (kilogramo) como de volumen (litro).

2. Concentración

La concentración es la de cantidad ingrediente activo o formulado expresado en relación a 100 unidades de formulado o de agua en una aplicación, respectivamente. Es decir que tendremos:

$$\text{Concentración de Formulado (\%)} = \frac{\text{Cantidad de Ingrediente Activo}}{100 \text{ ml o gr de Formulado}}$$

$$\text{Concentración de Aplicación (\%)} = \frac{\text{Cantidad de Formulado}}{100 \text{ l Agua}}$$

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Resolución de problemas

1. Para el control de enfermedades fúngicas en plantines de algarrobo blanco se recomienda:

Azoxistrobina 70 g i.a./ha SC 35% costo \$4760/5 litros.

Azoxistrobina + Cyproconazole 25 g i.a./ha SC 10% costo \$4880/5 litros.

Metil tiofanato + Tebuconazole 375 g i.a./ha SC 37,5% costo \$3860/20 litros.

Diga cuanto fungicida necesita adquirir en cada caso y cuál de los tres tratamientos conviene económicamente.

2. Para controlar un ataque del moho azul por *Botrytis cinérea* en eucalipto, se realizará la pulverización los plantines que ocupan una superficie de 580 metros cuadrados en el invernáculo. Para ello se aplica Iprodione a una dosis de 2 g/m² al 50% SC. Calcular la cantidad de producto comercial que se necesita para controlar la enfermedad.

3. En un cultivo en almácigo de pino se va a realizar un control de *Pythium*, con un tratamiento de Propamocarb. Este fungicida viene formulado como concentrado

soluble al 72,2% y se emplea a una dosis de 40 ml i.a./kg de semilla. Qué cantidad de producto se necesitan para tratar 3 kg de semilla. 4. Para controlar un ataque de manchas foliares en algarrobo blanco, se realizará la pulverización de canteros que ocupan una superficie de 4000 metros cuadrados en el umbráculo. Para ello se aplica Metil tiofanato + Tebuconazole a una dosis de 3,75 g i.a./m² al 37,5% SC. Calcular la cantidad de producto comercial que se necesita para controlar la enfermedad.

5. Una producción de plantines de algarrobo tiene un grupo de hongos que la afectan, para su control existen diversos métodos entre los que se emplean la desinfección de semillas. Se recomienda para ello el empleo de Carbendazim SC 50% a una dosis de 20 g i.a./kg de semillas. Qué cantidad de producto se necesitan para tratar 1,5 kg de semilla.

6. Para proteger un jardín de plantas clonales de eucalipto se elige un fungicida. Se quiere saber cuál sería el más económico, si el fungicida debe emplearse a 0,06g de i.a./ha. y el precio es de \$25/kg en la forma DP 80% y \$45/l en la forma SC 48%.

7. Para controlar un ataque de *Phoma* en una plantación joven de algarrobo, se llevará a cabo la pulverización de 58 ha con un fungicida a una dosis de 0,5 kg de i.a./ha. Calcular el volumen total de la formulación a aplicar, sabiendo que el fungicida viene formulado al 50%.

8. En una plantación joven de algarrobo de 15 ha se debe controlar *Alternaria* con Azoxistrobina SC 35% a una dosis de 70 g i.a. /ha. Este fungicida se aplica con aceite parafínico mineral a razón de 500cm³/ha. Calcular el volumen de fungicida y aceite necesario para las 15 ha.

9. Para controlar un ataque de royas en 2,5 ha de eucalipto, se aplicó Oxiclورو de cobre a una dosis de 1.000 g i.a./ha, PM 40%. El tratamiento se realizó 1 vez por semana durante un mes y medio. El volumen total de cada aplicación es de 500 l.

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

- a) ¿Qué cantidad de formulación se requirió para el tratamiento completo?
- b) ¿Cuál fue la concentración de aplicación?

10. Se necesita realizar un tratamiento de tizón en una superficie de 14 ha de plantines de eucalipto, causado por Rhizoctonia. El tratamiento debe efectuarse con Epoxiconazole PM 50% a una dosis de 5.000 g i.a./ha, durante 10 meses. El volumen total en cada aplicación es de 200 l. Establecer:

- a) Cantidad de formulación se requirió para el tratamiento completo.
- b) Concentración de la aplicación.

BIBLIOGRAFÍA

- CASAFE 2022. Guía de Productos Fitosanitarios. Aplicación Movil.
- FAO. 1986. Manual para Patólogos Vegetales. Ed. Pedro Aguilar F. 431pg.
- Sarubbi, C. 2010. Tecnología de aplicación de productos fitosanitarios en equipos pulverizadores terrestres. Ed. Facultad de Agronomía UBA, 290 pg.

TRABAJO PRÁCTICO N° 9

SIEMBRA Y AISLAMIENTO

Objetivos:

Que el estudiante logre:

- Iniciar el estudio de una enfermedad.
- Practicar diferentes técnicas de siembra y aislamiento de microorganismos.

Introducción:

Las técnicas de cultivo de microorganismos permiten transferir un agente fitopatógeno de los tejidos de un vegetal enfermo a un medio de cultivo artificial, o directamente a otro tejido vegetal sano, en caso de parásitos absolutos. De esta manera se lo podrá estudiar exhaustivamente y en cultivo puro, puesto que en la naturaleza es fácil encontrar mezclados o asociados con otros microorganismos que pueden o no comportarse como agentes causantes de una enfermedad. Para alcanzar el éxito de una investigación que se realiza con el objeto de determinar la relación existente entre un microorganismo y una planta enferma, deben cumplirse los clásicos Postulados de Koch, que permiten conocer la verdadera etiología de una enfermedad.

Sembrar: sembrar un microorganismo, significa colocarlo en un medio de cultivo elegido de acuerdo a sus exigencias vitales, que permita así, su desarrollo y manipulación, si se lo coloca a una temperatura adecuada, y durante un tiempo conveniente.

Trasplante o Repique: el material que se siembra contiene sólo una especie y su objeto es renovar el medio de cultivo, ya sea para perpetuar la especie o para reconocer algunas de sus propiedades biológicas o culturales.

Aislamiento: el material que se siembra contiene mezclas de especies, ya sea hongos o bacterias, y su objeto es separarlas, obteniendo cultivos al estado puro.

Las técnicas de siembra se efectúan bajo normas de asepsia rigurosa para impedir que desarrollen a la par del organismo en estudio, microorganismos del medio ambiente. Por ello se trabaja en ambientes estériles (habitaciones pequeñas, cámara de siembra, flujo laminar). La esterilización del ambiente se lleva a cabo mediante el uso de radiaciones ultra violeta por medio de lámparas especiales (esterilamp) que se encienden por un tiempo determinado antes de comenzar la siembra y se apagan en el momento de iniciar el trabajo.

Todas las siembras se efectúan en medios de cultivo previamente esterilizados, así como debe ser estéril todo el instrumental empleado en las manipulaciones. En la naturaleza, los microorganismos se encuentran formando poblaciones mixtas de una gran variedad de tipos diferentes entre sí. Cuando se hacen cultivos de estos materiales (tierra, leche, aire, materia fecal, alimentos, etc.) pueden desarrollar muchas especies de gérmenes. Este cultivo recibe el nombre de "**cultivo mixto**".

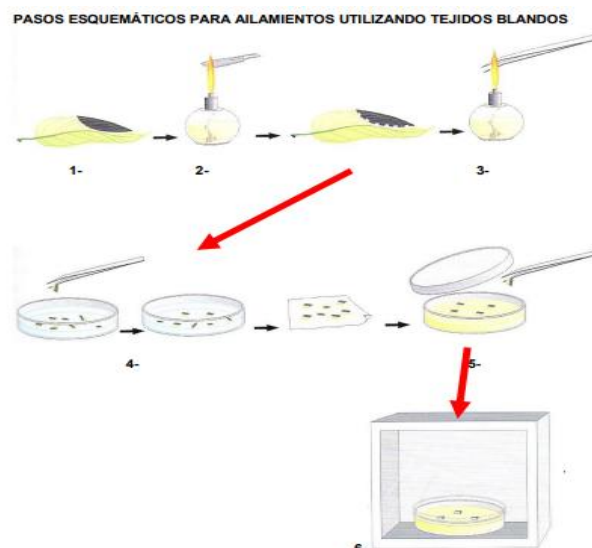


Figura 9.1. Esquema para realizar un aislamiento a partir de tejido blando. 1- Elección de muestra 2 y 3- Flamear bisturí y pinza 4- Desinfección superficial de trocitos de tejido de zona límite sano-enfermo 5- Depositar los trocitos en el medio de cultivo 6- Cámara para incubación

PASOS PARA AISLAMIENTOS UTILIZANDO DE TEJIDO LEÑOSO

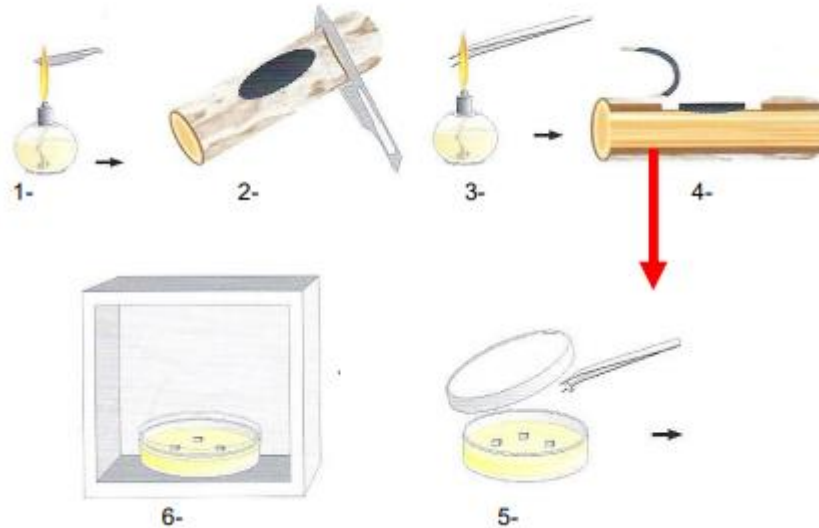


Figura 9.2. Esquema para realizar un aislamiento a partir de tejido leñoso. 1) Flamear elemento cortante (bisturí) 2)- Producir cortes netos y levantar corteza 3)-Flamear pinza 4)- Tomar astillas o trocitos de tejidos internos 5- Con pinza flameada depositar los trocitos en medio de cultivo 6- Incubar en cámara o estufa de cultivo.

Cuando el cultivo solamente contiene una sola clase de microorganismos se obtiene un **cultivo puro**. Este tipo de cultivo se requiere para el estudio intensivo de un microorganismo (morfología, fisiología, identificación).

Existen distintos métodos para aislar un agente patógeno, las cuales varían según sea la naturaleza de este último y la de los tejidos afectados.

Aislamiento de Bacterias

Siembra de la suspensión proveniente del tejido afectado

Los métodos más usuales para aislar bacterias son la preparación de estriados y las series de dilución, por medio de las cuales se consiguen colonias separadas con gran probabilidad de que su origen provenga de una sola célula. Para lograr estos métodos, es

necesario comenzar por hacer una suspensión de las bacterias, para lo cual se coloca trozos del tejido enfermo en tubo de ensayo con agua estéril para que las bacterias se difundan en el agua.

Siembra en cajas de Petri: para la preparación de las placas de agar se funde el medio agarizado calentándolo en baño maría y se deja enfriar a 45-47°C. A continuación se vierten 12- 15 ml. del medio enfriado pero aún líquido en una caja de Petri estéril (el enfriamiento disminuye la cantidad de agua que se condensa cuando el agar líquido se solidifica en placas de Petri).

Para evitar la contaminación son necesarias varias precauciones. Primero, cuando se saca el agar fundido del baño de agua, se seca el exterior del tubo o frasco, pues sino, el agua caerá en la placa e introducirá contaminantes. A continuación, cuando se quita el tapón para verter el agua, debe flamearse la boca del tubo o frasco para matar los microorganismos. Al verter el agar, se debe levantar solamente por un lado la tapa de la caja y únicamente lo suficiente para permitir el paso de la boca del recipiente con agar. Asimismo, se debe tener cuidado de no rozar la placa o su tapa cuando se vierta el agar.

Después de haber vertido el medio en la placa, se tapa ésta inmediatamente y se deja que se distribuya uniformemente en la parte inferior de la misma. Se deja solidificar sin moverlo hasta que esté completamente sólido y frío. Antes de sembrar la placa conviene desecar la superficie del medio eliminando el agua de condensación que se hubiera formado. Para ello se dejan secar durante 20 a 30 minutos en estufa, destapadas o invertidas.

En estas condiciones ya se pueden sembrar los cultivos microbianos en la superficie del medio por estriado o por diseminación con espátula de Drigalsky.

En cajas de Petri por estrías: el material a sembrar se toma con ansa siguiendo las precauciones de asepsia antes citadas, y se deposita sobre la placa de agar, en el borde más alejado del operador, extendiendo el cultivo de una parte a otra, de borde a borde, haciendo una serie de movimientos en zig-zag en dirección hacia el operador. Cuando se alcanza el

centro de la placa, se gira ésta unos 180º y se continúa la extensión o el estriado. Esta intervención evita el obstáculo del borde de la placa que hace casi imposible continuar con el estriado. La tapa de la caja de Petri puede mantenerse en la mano izquierda cubriendo parcialmente el medio de cultivo; o bien puede ser dejada sobre la mesa de trabajo, manteniendo la placa a sembrar lo más cerca posible del mechero. Otra técnica de estriado consiste en extender el material haciendo 3-4 estrías en ángulo recto con las primeras, y repetir el proceso.

Con el estriado se obtiene la dilución del cultivo. El objetivo inmediato del estriado es obtener colonias de bacterias, separadas, a partir de cultivos concentrados de células. Durante la inoculación, al comienzo de la siembra, las células forman colonias que se desarrollan juntas, pero a medida que el estriado continúa, cada vez son menos las células que permanecen en el ansa. A medida que estas son depositadas, van a crecer en la superficie del medio originando colonias separadas. Una buena placa resulta de los movimientos suaves y progresivos del ansa, repetidos muchas veces, con estrías muy juntas entre sí, sin romper el medio de cultivo.

Debido a la elevada concentración de agar, se forma algo de agua de condensación durante la preparación de las placas y aún durante la incubación. El agua puede resbalar de la tapa a la superficie del medio y extenderse provocando una masa de crecimiento confluyente impidiendo la formación de colonias aisladas. Para evitar esto, las cajas son, rutinariamente, incubadas invertidas.

En cajas de Petri por diseminación: sobre el medio de cultivo se deposita una gota del material a sembrar. Con una espátula de Drigalsky estéril, se extiende el material rasando toda la superficie. Se tapa la caja, la espátula se introduce en alcohol y se flamea rápidamente por la llama.

Métodos Cualitativos:

Agotamiento por estriado en placa: se procede agotando el inóculo con ansa.

Métodos Cuantitativos:

Diluciones sucesivas: debido a que una bacteria da origen a una colonia, se puede determinar el número de microorganismos presentes en una muestra si las diluciones se realizan cuidadosamente y se siembran en placas. Después de la incubación se cuenta el número de colonias que han desarrollado. Para determinar el número original de bacterias se multiplica el número de colonias por el grado de dilución de la placa en la que se está haciendo el recuento.

Recuento y cálculo del número de colonias: se debe elegir la caja que contenga entre 30 y 300 colonias. Se descartan las cajas con desarrollo muy pobre o muy abundante.

Las colonias pueden contarse de modo muy eficaz poniendo las placas invertidas hacia el observador y marcar sobre el vidrio con un lápiz graso cada colonia que se va contando para evitar contar varias veces la misma colonia.

El número de gérmenes de la muestra original se obtiene multiplicando el número de colonias contadas por la inversa de la dilución de esa caja. Si por ejemplo se cuentan 150 colonias en la caja de dilución 1/1000 se tiene:

$$150 \times 1000 = 150.000$$

En cada caja se sembraron 0,1 ml, para conocer cuántos gérmenes hay en un ml se hace el cálculo siguiente:

0,1 ml.....150.000 gérmenes

1ml.....x

$$x = \frac{15 \times 10^4 \text{ gérmenes}}{0,1 \text{ ml}} = 15 \times 10^5 \text{ gérmenes/ml}$$

0,1 ml

Otros métodos de siembra

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

- Siembra directa de tejidos afectados.
- Siembra directa del exudado.

Aislamiento de Hongos

Siembra directa de tejidos afectados

Lavado de tejidos afectados: Se hace con agua corriente.

Desinfección superficial: para el caso en que el organismo no produce abundantes fructificaciones externas, o cuando los tejidos enfermos se hallen contaminados en la superficie por otros agentes saprofitos que pueden dificultar la operación de obtenerlo en cultivo puro. Se hace con hipoclorito de sodio al 1% 1 o 2 minutos, y posteriormente se enjuaga con agua estéril.

La duración de estos tratamientos depende de la naturaleza del tejido vegetal y de la ubicación del patógeno en aquellos. Hay que tener en cuenta que existen hongos (y la mayoría de las bacterias) que son muy sensibles a los tratamientos externos y pueden ser destruidos en la desinfección.

Cuando el material está lo suficientemente limpio y desinfectado se corta en trozos para la siembra. El hongo está más activo cerca del margen de avance de las lesiones, por lo que se deben cortar porciones de tejido enfermo en esa zona.

Otros métodos de aislamiento:

Suspensión de esporas: se emplea en aquellos casos en que el organismo presumiblemente causante de la enfermedad produce abundantes fructificaciones, normalmente no se puede realizar desinfección superficial.

Cultivos monospóricos: consiste en sembrar una sola spora del hongo.

Incubación

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

Se realiza en estufa de cultivo a temperaturas de 28°C.

Una vez obtenido el cultivo puro, se realizan los repiques en tubos pico de flauta para conservar el mismo.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

Con el material vegetal provisto por la cátedra realice la siembra en medio de cultivo adecuado de trocitos de tejido previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1%.

- 1) Realice la incubación en estufa de cultivo a 28°C.
- 2) Observe los resultados a los 3 y 5 días de la siembra.
- 3) Elabore un informe.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. Méjico. Limusa. (5° reimpresión en español). 766pg
- FAO. 1986. Manual para Patólogos Vegetales. Ed. Pedro Aguilar F. 431pg.
- French E, y Ebert T. (1980). Métodos de Investigación Fitopatológica. IICA. Costa Rica. 289pg.

TRABAJO PRÁCTICO N°10

PRÁCTICA DE CAMPO. RECONOCIMIENTO DE PLANTAS ENFERMAS Y DIVERSAS PATOLOGÍAS. COLECCIÓN DE MATERIAL ENFERMO

Objetivos:

Que el estudiante logre:

- Observar y reconocer de los distintos síntomas que manifiesta la planta enferma.
- Recolectar y acondicionar el material vegetal enfermo para su posterior análisis en el laboratorio.
- Relacionar los problemas sanitarios con un manejo integrado en el vivero.
- Conocer los problemas sanitarios locales y el manejo de los mismos.
- Vincular los conceptos teóricos con situaciones reales.

Introducción

El estado sanitario de una plantación es el resultado final de la combinación de componentes de una **trilogía**:

- a) **La planta** en sí misma, en su condición de hospedante potencial de organismos perjudiciales. Su origen y calidad, (genética, forma y tipo de raíz y estado nutricional).

- b) **El componente abiótico** configurado por el medio físico, el clima y el manejo.

- c) **El componente biológico indeseable** integrado por aquellos organismos capaces de dañarla, tales como ciertos hongos, insectos, ácaros, nematodos, bacterias, virus, viroides, y fitoplasmas.

Cuando se visita un vivero o una plantación se deben realizar las siguientes observaciones:

1. Forma del árbol

Las especies forestales tienen una forma y un crecimiento básicamente determinados por la información genética. Esa información se maneja por medio de la selección y los métodos de multiplicación, que buscan uniformizar forma y altura junto a otras características deseables. Sin embargo, ese árbol puede verse diferente según esté aislado o integrando una plantación.

2. Altura del árbol

Puede variar con factores tales como las características del sitio, el laboreo, los manejos silviculturales y precipitación.

3. Ramas muertas

La presencia de ramas muertas puede o no ser resultado de la acción de plagas o enfermedades. Así el sombreado incide en la supervivencia de hojas y ramas, por lo que los árboles de borde mantendrán su follaje y sus ramas vivas más tiempo que los del interior de la plantación.

4. Corteza

4.1 cambio y rajaduras

Los árboles en condiciones saludables tienen diversos tipos de corteza que pueden variar con la especie y con la edad. El cambio de corteza puede ser normal en un árbol adulto o estar motivado por un estrés fisiológico. También puede ser provocado por la reacción del árbol a la presencia de una infección.

4.2 Extrusiones de aserrín o galerías

La presencia de aserrín sobre o debajo de la corteza, o de galerías debajo, constituye una evidencia de la presencia de insectos.

5. El tronco

Debe mirarse en toda su extensión, e incluso y con gran detenimiento, la zona del cuello de la raíz, en la base del árbol.

5.1 Ápice

Es frecuente encontrar ejemplares donde se produce la muerte apical, que puede restringirse a esa parte o extenderse al resto del árbol.

5.2 Cancros

Son heridas localizadas o zonas muertas en la corteza que muchas veces profundizan hasta el leño en el tronco o en la rama de las especies leñosas. A veces se producen tejidos de reacción, que limitan el crecimiento del cancro, produciendo un levantamiento en los bordes. La ubicación y profundidad de los cancros colabora en la identificación del agente causal

5.3 Rajaduras

Pueden tomar todo el árbol o sólo porciones de él. Importa fijarse en su ubicación y forma, son siempre índice de una anomalía en el estado fisiológico de la planta, que puede ser provocado por factores bióticos o abióticos. En los montes de *Eucalyptus spp.* es frecuente encontrar rajaduras producidas por vientos. La profundidad de las mismas es importante pues posibilitará la colonización desde el exterior por organismos indeseables.

5.4 Orificios

La presencia de orificios generalmente es atribuible a los puntos de emergencia de un insecto. Se mira la abundancia y la disposición en el árbol, si son limpios, si tienen aspecto viejo, si tienen exudaciones recientes (frescas) o antiguas (solidificadas/cristalizadas), y la presencia o no de productos de desecho (aserrín o fibras

5.5 Exudaciones de resina

La ocurrencia de exudados (gomosis) es índice de estrés por factores abióticos, o reacción frente a un agente biótico tales como insectos u hongos.

6. Las hojas o las acículas

6.1 Color

Cada especie vegetal tiene un padrón de forma y tonalidad de hojas o de acículas, que en algunos casos puede además variar notoriamente de acuerdo a la edad de la planta.

6.2 Integridad

Es frecuente encontrar lesiones en hojas y acículas, cuyo patrón y características permiten inferir en muchos casos el agente causal ya sea biótico o abiótico. La forma, localización y frecuencia de manchas o zonas necróticas es un importante síntoma para localizar agentes bióticos o abióticos.

6.3 Caída de las hojas

Cuando bajo un árbol, ya sea caducifolio o de follaje permanente aparecen hojas viejas caídas, podemos suponer que esta caída es resultado de una situación normal, después de haber cumplido su tiempo medio de vida. Si en cambio en el suelo encontramos hojas jóvenes y hojas maduras no senescentes y que deberían estar trabajando, cumpliendo su rol en la fisiología del árbol, entonces estamos frente a una situación anormal, restando saber cuál es la causa de la anormalidad.

7. Las raíces

La buena conformación del sistema radical es fundamental para la nutrición y sustentación del árbol y de su resistencia a factores bióticos o abióticos desfavorables. De ahí que sea indispensable su cuidadosa observación, verificando la abundancia de raíces y raicillas, y el tamaño y distribución de las mismas. También a nivel del cuello aparecen síntomas cuando hay ataque de patógenos de suelo, que se traducen por líneas ascendentes de enfermedad y olor anormal.

. EL DIAGNÓSTICO

El diagnóstico es el resultado final o conclusión a la que se llega luego de observar los síntomas in situ, su evolución y de realizar estudios del material colectado. Puede ser complicado y no es posible hacerlo basándose exclusivamente en la presencia o ausencia de un organismo o factor.

Esta aseveración puede entenderse si se tiene presente que;

* Un organismo fúngico, insectil o de otro tipo, puede estar presente y no estar causando daño.

* Un organismo puede estar presente en el árbol y no ser la causa original del síntoma observado.

* Un mismo síntoma puede estar desarrollado por una o varias causas que no tienen por qué estar asociadas.

* Un agente causal puede desarrollar más de un síntoma.

* A veces para que ocurran ciertos síntomas es necesario que actúen varios agentes simultáneamente.

* No siempre encontraremos la causa de la enfermedad donde se localiza el síntoma.

Estas razones hacen que sea indispensable iniciar un proceso de estudio y análisis de cada situación, a cargo del especialista actuante.

El diagnóstico se realiza considerando distintos factores:

Características ecológicas locales: suelos, clima y factores biológicos

- Los antecedentes de la plantación (especie, edad, suelo, origen de la semilla, método de preparación del sitio, método y sistema de plantación y manejo de la misma) generalmente proporcionados por el técnico responsable o el propietario.
- Los resultados de la recorrida del predio, incidencia de la sintomatología.

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

- Organismos encontrados, sus distintas estrategias de vida, (saprófito, patógeno, endófito, etc., en el caso de los patógenos) y la biología y ciclo de vida cuando se trata de insectos.
- Su frecuencia en términos de población observada durante la recorrida en terreno y de acuerdo las muestras encontradas.

En algunos casos se requiere mayor información tal como la proveniente de análisis foliares o de suelo.

Las Recomendaciones

Las recomendaciones se elaboran en función de los ítems antes mencionados, teniendo además presente, entre otros:

- Objetivos de la plantación
- Existencia y disponibilidad de medios de control
- Costos de insumos
- Capacidad operativa del empresario.

Toma de muestras

Una buena muestra vegetal es el primer requisito para un correcto diagnóstico fitosanitario.

¿Qué es una buena muestra?

Es una porción de material vegetal o un número de plantas representativo de una enfermedad o alteración del cultivo, a partir de la cual se puede evidenciar la presencia de un problema.

Es una cantidad mínima de suelo o sustrato representativa de las características sanitarias del terreno.

¿De qué está compuesta una muestra?

Consiste en plantas completas o sus partes (raíces, esquejes, flores, frutos, hojas, semillas, bulbo, tubérculos), porciones de sustrato (suelo, turba, cascarilla, etc.), con manifestaciones del problema en distintos estados de evolución.

¿Cómo se obtiene una buena muestra?

Para obtener una buena muestra es necesario recorrer todo el cultivo y cuando se observe una alteración en las plantas que requiera ser diagnosticada, es necesario seguir las siguientes indicaciones:

¡Inspeccione la plantación procurando cubrir visualmente todos los sectores; para ello puede caminar formando un círculo o la letra X ó Z. Tenga en cuenta que muchos problemas se ubican en la parte baja de la planta o en órganos específicos como botones florales y frutos; por esto es necesario detenerse en el recorrido para examinar detalladamente algunas plantas.

Ubique los sectores o las plantas con el problema y establezca si su distribución es generalizada, si se presenta en focos o agregados, si se relaciona con algún factor del terreno (p. ej. zonas encharcables), con alguna labor agrícola en el cultivo (p. ej. la fertilización) o si se presenta al azar en plantas aisladas.

Tome cantidad suficiente de material para enviar al laboratorio:

A. En cultivos anuales o de ciclo corto, de ser posible tome plantas completas con los diferentes estados del problema (inicial, intermedio y avanzado).

B. En cultivos perennes o de mayor porte, tome secciones u órganos afectados que contengan porciones sanas y enfermas; evite enviar al laboratorio plantas muertas o material excesivamente descompuesto.

¿Cómo se debe empacar y almacenar la muestra?

Coloque el material vegetal en bolsas de plástico o de papel limpias o preferiblemente nuevas, cierre herméticamente e identifique cada bolsa; puede utilizar toallas de papel para envolver la muestra. Si la muestra no se analizará inmediatamente mantener en heladera, hasta su observación.

ACTIVIDADES

- 1) Viaje al INSIMA.
- 2) Observación in situ de enfermedades presentes.
- 3) Observación de las posibles causas del problema.
- 4) Observación de las prácticas de manejo.
- 5) Observación de otros posibles hospedantes de patógenos.
- 6) Observación de posibles vectores
- 7) Recolección de material para observación en laboratorio.

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

FICHA DE CAMPO PARA EL DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO DE ENFERMEDADES

LOCALIZACIÓN	
Localidad	
Dirección	
Puntos GPS	Fecha:

SOBRE EL HOSPEDANTE							
Nombre científico / vulgar del hospedante							
Ubicación del cultivo <small>(marcar con X)</small>	Cultivo en macizo	Cultivo de borde	Vivero			Cultivo intercalar	Otro (especificar) <small>(ej. Maceta, plantas individuales)</small>
			Invernáculo	Almácigos			
Datos culturales <small>(marcar con X)</small>	Densidad	Edad	Tratamientos culturales recibidos				
			Transplante (si/no)	Carpido (si/no)	Fertilización (si/no)		
	Hay distinción de daño según manejo? Cual?						
Productos químicos aplicados <small>(Cuál?, ingrediente activo, formulación)</small>	Fertilizantes						
	Funguicidas						
	Insecticidas						
	Herbicidas						

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

Comentarios:

HOSPEDANTE: SINTOMAS Y DAÑOS

Distri- bución del daño (marcar con X)	En todo el área (distrib. uniforme)	Ejemplares aislados	Ejemplares agrupados (1 manchón)	Ejemplares agrupados (varios manchones)	Ejemplares dispersos (distrib. aleatoria)	Los ejemplares de 1 o + hileras	En plantas del borde	En otras especies ¿Cuál?		
Evolu- ción del síntoma (marcar con X)	Desconoce	Gradual	Repentino	¿Cuán rápido?			Fecha aprox.			
Incidencia (% de plantas atacadas)	0-30%	30-60%	60-80%	80-100%	Severidad (% atacada de la planta)	0-30%	30-60%	60-80%	80-100%	
Parte enferma (marcar con X)	Cuello	Tallo	Ramas	Hojas viejas	Hojas nuevas	Brotes	Flores	Frutos	Raíces	Planta entera

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

Tipo de síntoma, daño, signo		Marcar		Marcar
	Ahucamientos			Gomosis
Amarillamiento/Clorosis			Hojas con parénquima roído	
Aserrín debajo de la corteza			Hojas mordidas, comidas	
Ausencia de brotes/flores/frutos			Hojas arrugadas	
Ausencia de raicillas primarias			Manchado de la madera	
Atizonamiento			Manchas en hojas	
Bifurcaciones			Marchitamiento	
Cancros			Muerte descendente (arriba hacia abajo)	
Crecimiento lento/reducido			Ramas muertas	
Deformación			Quemado	
Descortezado			Perforaciones (tamaño, forma)	
Defoliación			Pudrición	
Desprendimiento de corteza (raíz, fuste)			Presencia de resina	
Escoba de brujas			Presencia de galerías (forma?)	
Fumagina			Ejemplar totalmente muerto	
Heridas			Tumor / Agalla	
Fructificaciones fúngicas			Otro síntoma:	
Micelio			Otro signo:	
Comentarios:				

"2024, Año del trigésimo aniversario del reconocimiento constitucional del principio de Autonomía Universitaria"

SOBRE EL PREDIO / ZONA PROBLEMA											
Suelo (marcar con X)	Drenaje			Tipo de suelo					pH	Suelo salino? (si/no)	Otro (especificar)
	Bueno	Moderado	Pobre	Arcilloso	Limoso	Arenoso	Orgánico	Mezcla artificial			
Topografía (marcar con X)	Zona baja, húmeda o anegable		Zona alta, seca	Ladera, declive	Llano	Otro (especificar)					
Otras (marcar con X)	Área soleada	Área sombreada	Zona ventosa	Hubo sequía?	Hubo heladas?	Hubo granizo?	Fuego ?	Riego artificial?	Zona secano ?	Otro (especificar)	
Cultivos anteriores					Cultivos linderos						
Comentarios:											

BIBLIOGRAFÍA

- García Álvarez, M. 1971. Patología vegetal práctica. Ed.Limusa Wiley S. A. 156 pg.
- Filho, A.B; Kimatii, H y Amorim L. (editores) 1995. Manual de Fitopatología. 3°ed. Vol. I. Principios e Conceitos. 919pg.
- Streets, R. B. 1992. Diagnóstico de Enfermedades de las Plantas. Manual de campo y laboratorio con énfasis en los métodos más prácticos para identificación rápida. Hemisferio Sur 232pg.

TRABAJO PRÁCTICO N.º 11

PATOLOGÍA DE SEMILLAS

Objetivos:

Que el estudiante logre:

- Identificar los microorganismos asociados a la patología de semillas.
- Distinguir los distintos tipos de asociaciones de patógenos en la semilla.
- Conocer sobre los distintos tipos de ensayos sanitarios.

Introducción:

La patología de semillas es una rama de la Fitopatología que estudia las enfermedades que afectan a las semillas, trata la determinación de patógenos asociados a ellas, el papel epidemiológico que desempeña la semilla como fuente de inóculo en el campo y como medio de supervivencia de los patógenos, y la búsqueda de estrategias de control de los patógenos asociados con ellas.

Los grupos de patógenos que son transmitidos por semilla son aproximadamente 1500, entre hongos, bacterias, virus y nemátodos.

Asociaciones entre los patógenos y las semillas

Los patógenos pueden estar asociados tanto internamente como en la superficie de las semillas, o mezclado con ellas. Las semillas pueden no mostrar síntomas de la enfermedad.

Se distinguen tres tipos de asociaciones de patógenos en semillas:

a) Mezcla: el patógeno acompaña independientemente a la semilla, sin afectarla y sin estar adherido a ella. Ej. Esclerocios de *Sclerotium* sp., y *Sclerotinia* sp., trozos de tejido, semillas de plantas parásitas, huevos y quistes de nemátodos.

b) Externa o contaminación: el patógeno es pasivamente llevado en la superficie de la semilla. Ej. Las esporas de *Tilletia caries* y *Tilletia foetida* en trigo y cebada, las células bacterianas de *Xanthomonas axonopodis* pv *phaseoli* en poroto. En todos los casos se dice que la semilla está infestada.

c) Interna o infección (semilla infectada): hay que considerar dos tipos de infección: - Cuando el patógeno es transportado internamente en los tejidos de la semilla como estructuras vegetativas. El patógeno se encuentra generalmente como micelio, en el pericarpio y el endosperma. (Ej. *Alternaria*, *Drchslera*, *Septoria* en trigo).

- Cuando el patógeno se encuentra como micelio durmiente en el embrión, como es el caso de *Ustilago tritici* en trigo, *Fusarium moniliforme* en sorgo, células bacterianas de *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* en poroto, y *Lactuca mosaic* virus en lechuga.

Mecanismos de Transmisión

En el caso de hongos, durante el proceso de germinación de la semilla, el micelio que se encuentra en el pericarpio o endosperma, re inicia su crecimiento. Los patógenos responden a estímulos, señales del ambiente, en este caso el estímulo es el agua. Como la semilla durante el almacenamiento contiene 12 a 13% de humedad, ofrece un ambiente adverso para el crecimiento vegetativo de los patógenos infectantes. Con este tenor de humedad tanto semilla como patógeno se encuentran durmientes. Una vez en el suelo la semilla, entra en contacto con el agua hidratándose. En este momento el micelio también reanuda su actividad vital y pasa acrecer del interior de la semilla a la superficie. Al crecer sobre la semilla, los hongos que parasitan raíces pasan a infectar las raíces seminales, y los que parasitan órganos aéreos crecen hacia los cotiledones o coleóptilo. Por su crecimiento sobre éstos termina por llegar a la superficie del suelo. Luego por los agentes de

diseminación como el viento y las gotas de lluvia, pueden ser llevados a nuevos sitios de infección como las hojas de la propia planta o de plantas vecinas.

La diseminación del patógeno por las semillas es el medio más efectivo porque:

- Se pueden transmitir patógenos de un continente a otro.
- Se mantiene más tiempo viable el patógeno.
- El patógeno conserva la patogenicidad más tiempo que en el suelo o en restos vegetales.
- Mayor posibilidad de infección semilla plántula.
- Infección temprana que posibilita una importante epifitía.
- Diseminación uniforme de difícil control.

Test de Análisis sanitario

Los objetivos de realizar los distintos test son:

- Aspecto cuarentenario: estricto control para evitar la introducción de nuevos patógenos o razas de las ya existentes.
- Extender certificados de sanidad de semillas.
- aconsejar el tratamiento de las semillas.
- Determinar la calidad de la semilla en almacenamiento, destinada al consumo humano o animal.

Se realizan dos tipos de ensayos:

Sin incubación: se realiza el examen directo con lupa, (se observa micelio, esclerocios), o mediante el lavado de las semillas, con microscopio se detectan esporas, micelios, nematodos etc. Con estos ensayos se detectan contaminaciones superficiales.

Con incubación: Se emplean diferentes soportes, los métodos más usados son:

a) la técnica del papel de filtro (Blatter test): Se colocan las semillas en cajas de Petri sobre papel de filtro humedecido y se incuban una semana a 20°C con alternancia de 12 h de luz y 12 de oscuridad. Se realizan observaciones en lupa. Este método es de rápida identificación, pero tiene la limitante de que numerosos patógenos no se manifiestan y hay aparición de saprófitos.

b) Agar-Agua. O Agar Papa Glucosado (APG). Se colocan las semillas en cajas de Petri, con el medio, y se incuban en las mismas condiciones que en la técnica de papel.

ACTIVIDAD PRÁCTICA

- 1) Observe con lupa las semillas provistas por la cátedra.
- 2) Siembre en caja de Petri con medio de cultivo semillas desinfectadas y sin desinfectar. Incube a 25°C durante 5 días.
- 3) Siembre en Caja de Petri con papel de faofiltro 200 semillas. Incube a 25°C durante 5 días.
- 4) Observe la presencia de desarrollo fúngico y/o bacteriano. En caso de la presencia de hongos, realice la identificación. Expresé los resultados en porcentaje
- 5) Determine el grado de importancia de los microorganismos presentes en las semillas
- 6) Realice informe.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. (1991). Fitopatología. Méjico. Limusa. (5° reimpresión en español) 766pg.
- FAO. 1986. Manual para Patólogos Vegetales. Ed. Pedro Aguilar F. 431pg.
- Peretti, A. 1994. Manual para Análisis de Semillas INTA. Ed. Hemisferio sur. 281 pg.

TRABAJO PRÁCTICO N° 12

HONGOS DESTRUCTORES DE MADERAS. TEST DE OXIDASAS. DETERMINACIÓN DE PÉRDIDA DE PESO EN PROBETAS INOCULADAS.

Objetivos:

Que el estudiante logre:

- Determinar la resistencia a la pudrición de maderas de dos especies forestales nativas.
- Conocer las técnicas del test de oxidasas y de pérdida de peso de probetas inoculadas. Utilidades y limitaciones

Introducción:

Las pérdidas enormes de madera de los árboles vivos en el bosque y en la madera cosechada o en los productos que se obtienen a partir de ella, se deben principalmente a basidiomicetes que pudren la madera, más específicamente a hongos pertenecientes a la clase Hymenomicetes (subdivisión Basidiomycotina). Entre ellos, podemos citar a *Fomes*, *Polyporus*, *Poria*, *Ganoderma*, *Phellinus*, *Trametes*, *Armillaria* y *Lentinus*.

Estos hongos penetran en los árboles en forma de micelio o basidiosporas a través de heridas, ramas muertas, tocones de ramas, tocones de árbol o raíces dañadas, así, las heridas ocasionadas por el fuego, la poda y el entresacado de los árboles, son los puntos de entrada más comunes. La invasión, se produce mediante la disolución de las sustancias de la pared celular, por la secreción de enzimas degradadoras de las lignocelulasas que las componen, a lo largo de las superficies laterales, así como en los ápices de crecimiento de los mismos. Este período se denomina incipiente, y se caracteriza, en la mayoría de los casos, por un cambio en el color en la madera atacada.

El período posterior al incipiente, se denomina “típico”, en él se origina el pleno decaimiento por destrucción de la madera. Por tal razón, además de los cambios de color, se pueden apreciar cambios en la resistencia, continuidad (que es quebrada la mayoría de los casos) y textura de la madera.

La clasificación más generalizada de las pudriciones causadas por los hongos xilófagos, se basa en el cambio de color de la madera afectada, así, se distinguen dos tipos, la pudrición blanca y la pudrición castaña, cuyas características se presentan en el cuadro 1

Cuadro 1: Características de las Pudriciones

Pudrición Blanca	Pudrición Castaña
<ul style="list-style-type: none"> - La mayoría de los hongos xilófagos causan este tipo de pudrición en árboles de hoja caduca. - Los hongos producen fenol-oxidasas, extracelulares, que tienden a destruir más lignina que celulosa, por lo que queda un resto de celulosa pura de color más o menos blancuzco - Los ensayos de oxidasas sobre medios como el ácido tánico o gálico dan positivos - La madera podrida pierde gradualmente las propiedades de solidez y retiene su estructura fibrosa en estados avanzados; se vuelve esponjosa, filamentosa o laminada - Entre los hongos que la producen podemos nombrar: <i>Ganoderma applanatum</i>, la seta del artista; <i>Fomes igniarius</i>; <i>F. fulvus</i> y <i>F. fomentarius</i>, <i>Phellinus Chacoensis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> - Son pocas las especies de hongos que causan este tipo de pudrición. - Remueven selectivamente celulosa y hemicelulosa de la madera. - En estados avanzados, la madera es reducida a un residuo de trozos amorfos, blandos, castaños, compuestos de lignina ligeramente modificada. - No producen fenol-oxidasas, por lo que los ensayos de oxidasas sobre medios como el ácido tánico o gálico dan negativos. - Este tipo de pudrición disminuye la capacidad de pando. - Podemos citar en este grupo a <i>Polyporus sulphureus</i> y a <i>Laetiporus sulphureus</i>.

Materiales y Métodos

a) Test de las oxidasas

Materiales

- Cultivos puros de hongos xilófagos de 4 a 6 semanas de *Letiporus sulphureus* y *Phellinus chacoensis*.

- Cajas de Petri.
- Medio de cultivo para reacción de oxidasas.
- Bisturí.
- Estufa de cultivo

Metodología

Medio de cultivo para la reacción de las oxidasas producidas por basidiomicetes :

Extracto de malta disecado Difco.....15gr.
Bacto-agar Difco..... 20gr.
Agua destilada.....1000gr.
Ácido tánico (o gálico)5gr.

Preparación del medio de cultivo

A 850ml. de agua destilada se añaden el extracto de malta y el bacto-agar, colocando el agua restante en otro frasco. Ambos se esterilizan, cuando el agua esterilizada aún está caliente, se disuelve el ácido tánico y se agrega al agar extracto de malta, mezclando activamente y fraccionando en cajas de Petri a una razón de 30 ml. por caja.

Para este ensayo, se requiere un cultivo puro de 4-6 semanas, de cuya capa micelial se cortan cubitos de 4 a 5 mm., que luego se depositan sobre el medio de con ácido tánico. Se incuban a 29°C en la oscuridad.

Actividades

- 1) Preparar el medio de cultivo
- 2) Cortar cubitos de la capa miceliar de los cultivos puros suministrado por la cátedra, depositarlos en cajas con medio con ácido tánico.
- 3) Incubar a 29°C en oscuridad.
- 4) Observar periódicamente.
- 5) Clasifique según la tabla de intensidad de reacción
- 6) Presentar informe.

b) Determinación de la pérdida de peso en Probetas Inoculadas

Materiales

- Probetas de madera de dos especies forestales de 3*1*0.5 cm.
- Balanza de precisión.
- Estufas de esterilización y de cultivo.
- Medio de cultivo según Norma IRAM N° 9518.
- Tubos de ensayo
- Autoclave
- Cultivos puros de hongos xilófagos
- Flujo laminar
- Calculadora

Metodología

Se sigue la metodología sugerida por las Normas IRAM N° 9518 (Instituto Argentino de

Racionalización de Materiales ,1962), “Toxicidad, permanencia y eficacia de preservadores de maderas”.

Etapas:

1. **Preparación de las probetas:** Para los ensayos se utilizan 30 probetas de 3 x 1 x 0,5 cm. 15 probetas por especie.

2. **Estabilización de las probetas:** Las probetas se colocan a ambiente de laboratorio durante 72 horas. hasta que las mismas alcancen un peso estable, las mediciones se repiten tres veces, como mínimo, siendo esta primera variable medida denominada: Peso Estabilizado 1 (Pest1).

3. **Humectación y esterilización de las probetas de maderas naturales:** Previo a la colocación de las probetas en los tubos de ensayo con cultivos de hongos, estas se colocan en un soporte en el interior de un desecador con agua destilada en el fondo, simulando un ambiente semejante al de una cámara húmeda.

Transcurridas 48 horas las probetas se colocan en estufa a una temperatura de 110°C, durante 1/2 hora, con el fin de esterilizarlas. Una vez cumplida esta etapa, y sin extraer las probetas de la estufa se baja la temperatura a 30 °C manteniéndola en esa condición por 12 horas, de modo que las probetas alcancen una humedad constante de aproximadamente 30%.

4. **Preparación del medio de cultivo:** Como medio de cultivo de las cepas, se emplea el indicado en la Norma IRAM N° 9518 (Instituto Argentino de Racionalización de Materiales, 1962), apartado G/16, donde el medio está compuesto por 25 g de agar-agar y 15 g de extracto de malta, por cada 1000 g de agua destilada. Esta solución se distribuye en tubos de ensayo marca Pirex de 200 mm de largo y 20 mm de diámetro, obturados con tapón de algodón. Los tubos de ensayo se llevan a autoclave para ser esterilizados a 1,5 atmósferas de presión por el término de 30 minutos; siendo posteriormente colocados en grillas de forma levemente inclinada para que al solidificarse el medio se obtenga un pico de flauta suficientemente extenso.

Los trozos de micelio de las cepas de los hongos se colocan dentro de los tubos de ensayo con el medio preparado para el desarrollo de los mismos teniendo en cuenta todos los cuidados de asepsia por medio de la utilización de una cámara de flujo laminar. Una vez finalizada esta etapa los mismos se colocan en una estufa de cultivo a una temperatura entre 26 °C y 28 °C y una humedad relativa de 30%, durante 14 días, tiempo suficiente para el desarrollo vigoroso del micelio que cubrirá totalmente la superficie formada por el pico de flauta.

5. Colocación de las probetas en tubos con micelio de hongos: Las probetas de madera, esterilizadas y humectadas, se colocan asépticamente, sobre el micelio desarrollado en los tubos. Cada tubo se identifica con una letra representando la especie, el número de la probeta y la especie de hongo. Una vez colocadas las probetas en los tubos, los mismos se disponen horizontalmente en estufa de cultivo a 27 ± 1 °C y una humedad relativa de 30 % por el transcurso de tres meses.

6. Retiro de las probetas y estabilización: Con el fin de verificar el desarrollo uniforme del micelio y la posibilidad de contaminación, las probetas se deben examinar semanalmente. Al cabo de tres meses se retiran las probetas de cada tubo de ensayo siendo limpiadas con un paño para eliminar todo vestigio de micelio de hongos evitándose así que siga actuando una vez retiradas de la estufa de cultivo. Las probetas deben permanecer en ambiente de laboratorio en esas condiciones por un período de 72 horas, tiempo en el que se completa la limpieza.

Posteriormente las probetas se llevan a cámara húmeda durante un tiempo, que en ninguno de los casos es inferior a 48 horas, para lograr de esta manera alcanzar la misma humedad de estabilización del inicio del ensayo, un rango entre 30% y 40%. Se controla el peso hasta que éste permanezca constante. Este dato de peso de cada probeta, después de ser sometidas a la acción de los hongos, es tomado como “peso estabilizado 2” (Pet 2).

7. Pérdida de peso de las probetas:

Siendo la humedad de estabilización para cada tipo de madera la misma antes y después del ataque de los hongos, la pérdida de peso en tejido leñoso (PT L) se calcula con la siguiente expresión:

$$\text{(PTL) Pérdida de Peso \%} = \frac{\text{Pest 1} - \text{Pet 2}}{\text{P est 1}} * 100$$

Actividades

- 1) Pesar las probetas sometidas a pudrición suministradas por la cátedra y calcular la pérdida de peso en relación al peso inicial.
- 2) Clasifique en función de la tabla de resistencia (ver anexo).
- 3) Presentar informe.

ANEXO

Escala de clasificación de intensidad de la reacción

- ✓ Negativa: agar no se torna castaño debajo del inóculo. (-)
- ✓ Muy débil: zona de difusión castaño claro a oscuro debajo del inóculo y en el centro de la colonia. Solo se ve del lado inferior de la caja. (+).
- ✓ Débil: zona de difusión castaño claro a oscuro debajo de la colonia, pero no se extiende hasta el margen. Visible en la cara inferior de la caja (+)
- ✓ Moderadamente fuerte: zona de difusión castaño claro a oscuro, que se extiende hasta corta distancia del borde de la cepa micelial. Visible del lado superior (+++)
- ✓ Fuerte: con zona de difusión castaño oscuro opaca, que se prolonga considerablemente más allá del borde de la capa micelial. (++++)

✓ Muy fuerte zona de difusión muy intensa, castaño oscuro que se prolonga considerablemente más allá del borde de la capa micelial.

Clasificación por resistencia de las maderas según pérdida de peso.

Pérdida de peso	Categoría de Resistencia
Inferior al 5 %	Muy Resistente
5 % al 10 %	Resistente
10 % al 20 %	Moderadamente resistente
20 % al 30 %	No resistente
Superior al 30 %	Sin resistencia

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1991. Fitopatología. Méjico. Limusa. (5° reimpresión en español). 766pg.
- Bobadilla E. A, Pereyra O, Silva F y Stehr A. M. 2005. Durabilidad de la madera de dos especies aptas para la construcción. FLORESTA, Curitiba, PR, v. 35, n. 3, 419-428pg.
- Deschamps, J. Y Wright J. (). Patología Forestal del Cono Sur de América. Editora SRL. Bs. As. 256pg
- Jauch, C. 1979. Patología Vegetal. (2°ed.) El Ateneo. 280pg.
- Luley, C. J. 2005. Identificación del tipo de pudrición de la madera y hongos xilófagos de árboles urbanos. Publicado en Arborist News de abril de 2006
- Popoff O. 2005. Hongos Xilófagos. Instituto de Botánica del Nordeste, Corrientes, Argentina.
- Sarasola, A. y de Sarasola M. R. 1975. Fitopatología. Curso Moderno. Tomo IV Fisiogénicas. Prácticas en Fitopatología. Ed. Hemisferio Sur. Bs. As.