

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA



ESTUDIO FITOPATOLÓGICO REALIZADO EN LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO  
FITOSANITARIO DE LA UNIDAD DE NORMAS Y REGULACIONES, MINISTERIO DE  
AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN, GUATEMALA.

BÁRBARA EUGENIA PORTA AMAYA

GUATEMALA, Marzo de 2009.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA  
ÁREA INTEGRADA

ESTUDIO FITOPATOLÓGICO REALIZADO EN LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO  
FITOSANITARIO DE LA UNIDAD DE NORMAS Y REGULACIONES, MINISTERIO DE  
AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN, GUATEMALA.

PRESENTADO A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMÍA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR

BÁRBARA EUGENIA PORTA AMAYA

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO  
INGENIERA AGRÓNOMA

EN  
SISTEMAS DE PRODUCCIÓN AGRÍCOLA

EN EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADA

GUATEMALA, Marzo de 2009.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMÍA

RECTOR

Lic. CARLOS ESTUARDO GÁLVEZ BARRIOS

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA

DECANO	MSc. Francisco Javier Vásquez Vásquez
VOCAL PRIMERO	Ing. Agr. Waldemar Nufio Reyes
VOCAL SEGUNDO	Ing. Agr. Walter Antonio Reyes Sanabria
VOCAL TERCERO	MSc. Danilo Ernesto Dardón Ávila
VOCAL CUARTO	Br. Rigoberto Morales Ventura
VOCAL QUINTO	Br. Miguel Armando Salazar Donis
SECRETARIO	MSc. Edwin Enrique Cano Morales

GUATEMALA, Febrero de 2009

Guatemala, febrero 2009

Honorable Junta directiva  
Honorable Tribunal Examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala

Honorables miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de Graduación titulado Estudio Fitopatológico realizado en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario de la Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, Guatemala, como requisito previo a optar al título de Ingeniera Agrónoma en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado académico de Licenciada.

Esperando que el mismo llene los requisitos necesarios para su aprobación, me es grato suscribirme,

Atentamente,

“ID Y ENSEÑAD A TODOS”

Bárbara Eugenia Porta Amaya

## ACTO DEDICADO A:

- Mi Dios                    Por darme la vida e iluminar el camino que hasta ahora he recorrido.
- Mis Padres                Alfredo Tomás Porta Villamar por confiar en mi, por darme la maravillosa herencia de la educación y enseñarme el valor de de responsabilidad y el trabajo. María Angelina Amaya de Porta, por su ejemplo de paciencia y sacrificio. A los dos gracias por que me dieron la oportunidad única de sentirme orgullosa de ser su hija.
- Mis hermanas            Luz Marcela y Sofía Alejandra Porta Amaya por su apoyo incondicional, por levantarme y darme ánimos cuando me creía vencida.
- Mis abuelas              María Ernestina Villamar y Marta Odilia Aragón por ser el ejemplo vivo de la perseverancia, trabajo, esfuerzo y honradez.
- Mis tíos                    Edna Elizabeth, Blanca Estela y José Roberto Amaya Aragón, María Eugenia y Luis Gonzalo Porta Villamar, Tío este logro también es tuyo.
- Mis primos                A todos y cada uno de ustedes por su solidaridad y afecto, en especial a Renato Arturo Adrover (QPD) gracias porque además de mi primo fuiste mi hermano.
- Mis amigos                Nora Rangel, Baudilio Jordán, Londy Mejía, María José Rodríguez, Omar Polanco, Omar, Renato y Jorge Ramírez Rivera, Rony Mijangos, Soren Ramírez, Otto Mesías, José Godoy, Mayra Aguilar, Renato Celada, Gabriela Gordillo, Ava Castillo, Gilberto Murga, Alejandro Zuchini, José Ángel Montenegro, Luis Monterroso, Antonio Molina, María de Los Ángeles de Molina. Por el incomparable regalo de su amistad, gracias por formar parte de mi vida.

TRABAJO DE GRADUACIÓN QUE DEDICO A:

Mi Patria Guatemala

Mi Pueblo Teculután, Zacapa

Mis docentes

Universidad de San Carlos de Guatemala.

Facultad de Agronomía.

## AGRADECIMIENTOS A:

Mi Dios, Por ser la luz que ilumina mi existencia.

Ing. Agr. Gustavo Álvarez, por su amistad, apoyo y asesoría para la realización de esta investigación.

A mis asesores: Ing. Agr. Amílcar Sánchez y PhD. David Monterroso por su tiempo y ayuda para el desarrollo de este trabajo.

Ing. Agr. Aníbal Pérez Segura, por su invaluable apoyo durante el ejercicio profesional supervisado.

Ing. Agr. Luis Alberto Escobar, por todo el conocimiento compartido, por su amistad incondicional y gran ayuda para la toma de muestras en el municipio de Chimaltenango. Gracias infinitas sin usted este día no hubiera llegado aún.

Mis padres, por darme la vida y ser un ejemplo a seguir.

Mis hermanas, por todo su apoyo y ayuda en cada paso que he dado.

A Oscar Grazioso Sierra por ser un gran apoyo tanto para mi como para mi familia.

Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación y Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, por ser el ente financiante de mi Ejercicio Profesional Supervisado.

Personal de Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, ingenieros agrónomos Edil Rodríguez, Otto Lavagnino, Pablo Cordón y Aníbal Pérez, analistas, Nelson García y Arturo García Salas, técnico laboratorista Osman Valdés, encargada de procesamientos de datos, Diana Gutiérrez, Secretaria Sayda Guillén por su amistad y ayuda brindada.

A la familia Rangel Reyes por todos estos años de amistad y cariño sincero, gracias por dejarme formar parte de ustedes.

A Londy Mejía, Rony Mijangos y Soren Ramírez, por todo su apoyo incondicional no solo durante el ejercicio profesional sino también en mi vida personal.

Al Ing. Agr. Omar Ramírez, por demostrarme que una de las alegrías de la amistad es saber en quien confiar.

A las familia Ramírez Rivera y Ramírez Portillo, por abrirme las puertas de su casa y de su corazón.

Mis amigos, por brindarme su apoyo, por sus palabras de aliento y por cada uno de esos momentos de alegría.

## Tabla de contenido

Índice de cuadros.....	iv
Índice de figuras.....	v
Resumen.....	vii
CAPÍTULO I.....	1
DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO DE LA UNIDAD DE NORMAS Y REGULACIONES, MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN.....	1
1.1 Presentación.....	2
1.2 Marco Referencial .....	3
1.2.1 Ubicación .....	3
1.2.2 Administración.....	3
1.2.3 Alcances.....	3
1.2.4 Servicios Prestados.....	4
1.2.5 Costos .....	4
1.2.6 Recursos Humanos.....	4
1.2.7 Metodología de Ejecución.....	5
1.2.8 Volumen de muestras procesadas .....	6
1.2.9 Distribución de los Fondos Recaudados .....	7
1.3 Objetivos .....	8
1.3.1 Objetivo general.....	8
1.3.2 Objetivos específicos .....	8
1.4 Metodología .....	9
1.5 Resultados.....	10
1.5.1 Infraestructura .....	10
1.5.2 Equipo .....	10
1.5.3 Análisis FODA (fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas) .....	14
1.6 Conclusiones y Recomendaciones.....	15
1.6.1 Conclusiones.....	15
1.6.2 Recomendaciones.....	16
1.7 Bibliografía .....	17

CAPÍTULO II.....	19
DIAGNÓSTICO DE <i>Phytophthora</i> sp y <i>Pythium</i> sp ASOCIADOS A PUDRICIONES RADICULARES Y DE TALLO EN HORTALIZAS DE EXPORTACIÓN EN EL DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO .....	19
2.1 Presentación.....	20
2.2 Marco Conceptual .....	21
2.2.1 Principales características de <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> .....	21
2.2.2 Descripción de los géneros <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> .....	25
2.2.3 Cultivos bajo estudio .....	29
2.2.4 Agentes patógenos determinados .....	36
2.2.5 Técnicas de aislamiento y purificación de especies de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> . .....	38
2.2.6 Medios de cultivo para aislar y purificar especies de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> ....	40
2.3 OBJETIVOS .....	41
2.3.1 General.....	41
2.3.2 Específicos .....	41
2.4 Metodología .....	42
2.4.1 Plan de muestreo.....	42
2.4.2 Fase de laboratorio .....	45
2.4.3 Análisis de la Información .....	58
2.5 Resultados y Discusión .....	59
2.5.1 Descripción de las especies de <i>Phytophthora</i> encontradas en los municipios de El Tejar y Comalapa, departamento de Chimaltenango.....	62
2.5.2 Descripción de los aislamientos <i>Pythium ultimum</i> encontrados en el departamento de Chimaltenango.....	67
2.6 Conclusiones y Recomendaciones .....	75
2.6.1 Conclusiones.....	75
2.6.2 Recomendaciones.....	77
2.7 Bibliografía.....	78
APENDICE .....	80

CAPÍTULO III.....	105
INFORME DE SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO DE LA UNIDAD DE NORMAS Y REGULACIONES, MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN.....	105
3.1    Presentación .....	106
3.2    Manual de Procedimientos para el Aislamiento e Identificación de Bacterias Fitopatógenas.....	107
3.2.1  Objetivos .....	107
3.2.2  Metodología.....	107
3.2.3  Resultados.....	108
3.2.4  Evaluación .....	120
3.3    Gestión de Calidad para la certificación según la Normativa ISO-9001-2000 del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación .....	121
3.3.1  Objetivos .....	121
3.3.2  Metodología.....	122
3.3.3  Resultados.....	123
3.4    Diagnóstico de hongos fitopatógenos en muestras de suelo y planta ingresadas al CDP-FAUSAC y laboratorio fitosanitario del Ministerio de Agricultura durante febrero a noviembre de 2007.....	148
3.4.1  Objetivos .....	148
3.4.2  Metodología.....	148
3.4.3  Resultados.....	149
3.4.4  Evaluación .....	149
APENDICE .....	150

## Índice de Cuadros

Cuadro		Página
Cuadro 1.1	Descripción de equipo para el área de recepción de muestras. ....	10
Cuadro 1.2	Descripción de equipo para el área de diagnóstico de hongos y nematodos. ....	10
Cuadro 1.3	Descripción de equipo para el área de análisis de leche. ....	11
Cuadro 1.4	Descripción de equipo para el área de procesamiento de muestras. ....	11
Cuadro 1.5	Reactivos existentes en bodega durante el año 2007. ....	12
Cuadro 1. 6	Análisis FODA, Laboratorio Fitosanitario, Ministerio de Agricultura. ....	14
Cuadro 2.7	Áreas de muestreo y cultivos con presencia de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> .....	59
Cuadro 2.8	Áreas de muestreo y cultivos con presencia de <i>Phytophthora</i> sp. ....	62
Cuadro 2.9	Áreas de muestreo y cultivos con presencia de <i>Pythium</i> sp. ....	67
Cuadro 2. 10	Áreas de muestreo y cultivos con presencia de <i>P. ultimum</i> .....	68
Cuadro 2.11A	Presentación de coordenadas del muestreo realizado en Chimaltenango.....	81
Cuadro 3.12	Listado de documentos y registros del Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario. ....	123
Cuadro 3.13	Formulario de Control de Muestras rechazadas.....	152
Cuadro 3.14A	Libro de recepcion de muestras.....	152
Cuadro 3.15A	Libro de custodia.....	153
Cuadro 3.16A	Libro de ingreso de resultados a la base de datos.....	153

## Índice de Figuras

Figura		Página
Figura 2.1	Esporangios de <i>Pythium</i> sp.....	22
Figura 2.2	Esporangios limoniformes de <i>P.infestans</i> .....	22
Figura 2.3 A.	Zoosporas de <i>Phytophthora</i> sp y B. Zoosporas de <i>Pythium</i> sp.....	23
Figura 2.4	Arreglos del oogonio y anteridio en <i>Phytophthora</i> sp y en <i>Pythium</i> sp....	24
Figura 2.5	Árbol filogenético de 17 especies de <i>Phytophthora</i> sp.....	26
Figura 2.6	Puntos de depresión en parcelas productoras de hortalizas.....	43
Figura 2.7	Decoloración anormal en tejido radical .....	44
Figura 2.8	Desarrollo radical deficiente y podredumbre del tallo observado en una planta de chile pimiento.....	44
Figura 2.9	Muestra vegetal de lechuga para aislamiento de <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> .....	45
Figura 2.10	Método de cultivo trampa para aislamiento de <i>Phytophthora</i> y <i>Pythium</i> .	48
Figura 2.11	Siembra en medio semiselectivo con suelo infectado.....	49
Figura 2.12	Solución de suelo estéril para inducción de micelio en muestras vegetales .....	51
Figura 2. 13	Semillas con micelio producto de la infección zoosporas de <i>Phytophthora</i> .....	52
Figura 2.14	Descripción pictográfica de las características de crecimiento para identificar especies de <i>Phytophthora</i> desarrolladas en medio PDA según Edwin y Riveiro .....	53
Figura 2.15	Conservación de cepas de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> .....	54
Figura 2.16	Bandejas con sustrato especial para pilones a utilizar en el bioensayo..	56
Figura 2.17	Plántulas para ser inoculadas con las cepas de <i>Pythium</i> .....	56
Figura 2.18	Siembra de 10 plántulas en cada maceta. ....	57
Figura 2.19	Pruebas de patogenicidad de cepas de <i>Pythium</i> , Centro Experimental Docente de Agronomía.....	57
Figura 2.20	Localización de los puntos de muestreo, departamento de Chimaltenango. ....	61
Figura 2.21	Marchitez y desarrollo deficiente en chile pimiento provocado por <i>P. capsici</i> .....	63
Figura 2.22	Lesiones en el cuello del tallo y deficiente desarrollo radicular provocado por <i>P. capsici</i> en el cultivo de chile pimiento.....	63
Figura 2.23	Esporangios limoniformes de <i>P. capsici</i> .....	64
Figura 2.24	Depresión en el cultivo de tomate.....	65
Figura 2.25	Esporangios de <i>P. cinnamomi</i> forma elipsoidal u ovoide. Esporangios no papilados o semipapilados y no caducos <i>P. cinnamomi</i> .....	65
Figura 2.26	Bioensayo de <i>P. cinnamomi</i> en plantas de tomate. ....	66

Figura 2.27	Sintomatología del daño causado por <i>Pythium</i> en el cultivo de arveja china. ....	69
Figura 2.28	Establecimiento de pruebas de patogenicidad. ....	70
Figura 2.29	Plantas de Arveja china y Ejote Francés inoculadas con cepas de <i>Pythium</i> . ....	70
Figura 2.30	Plantas de lechuga inoculadas con cepas de <i>Pythium</i> . ....	71
Figura 2.31	Plantas de Brócoli inoculadas con cepas de <i>Pythium</i> . ....	71
Figura 2.32	Efecto del daño ocasionado por <i>Pythium ultimum</i> en plantas inoculadas , colectado en muestras de suelo de arveja china, departamento de Chimaltenango. ....	72
Figura 2.33	Efecto del daño ocasionado por <i>Pythium ultimum</i> en plantas de arveja china desarrollo deficiente, deterioro del sistema radical y coloración anormal debido a la pudrición de las raíces. ....	72
Figura 2.34	Planta de arveja china inoculada con una cepa de <i>Pythium ultimum</i> en la que se muestra un menor desarrollo ....	73
Figura 2.35	Efecto del daño ocasionado por <i>Pythium ultimum</i> en raíces de arveja china, malformación, desarrollo deficiente y ausencia de raíces secundarias. ....	74
Figura 2.36A	Diagrama de bloques para el procedimiento y toma de muestras de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> . ....	88
Figura 2.37A	Diagrama de bloques para el proceso del aislamiento y conservación de cepas de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> . ....	100
Figura 2.38A	Diagrama de bloques para el proceso de pruebas de patogenicidad para especies de <i>Pythium</i> y <i>Phytophthora</i> . ....	104
Figura 3.39	Batería de desinfección para análisis de muestras de bacterias. ....	112
Figura 3.40	Estriado para siembra de bacterias. ....	113
Figura 3.41	Diagrama de flujo para el proceso microbiológico. ....	116
Figura 3.42	Diagrama de las actividades realizadas en el laboratorio. ....	146

## Resumen

El programa de Ejercicio Profesional Supervisado de Agronomía, fue realizado en el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.

Con el propósito de cumplir con los convenios realizados entre el Ministerio de Agricultura y la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala, el programa se desarrolló conjuntamente con el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía, desarrollando el diagnóstico, la investigación y la prestación de servicios en ambos lugares.

El Diagnóstico fue realizado sobre el funcionamiento del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario, Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación, en función de evaluar las condiciones generales que un laboratorio de diagnóstico debe reunir según normas internacionalmente aceptadas, todo ello llevado a cabo en el período febrero-noviembre de 2007.

La fase de Investigación se realizó en el departamento Chimaltenango, Guatemala, con el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala , en donde se realizó un diagnóstico de *Pythium* y *Phytophthora* asociados a pudriciones radiculares y de tallo en hortalizas de exportación , específicamente en Chile pimiento, brócoli, repollo, arveja china y ejote francés, cultivos de importancia en esa región.

Los servicios prestados durante los 10 meses que abarca el Ejercicio Profesional Supervisado fueron: la actualización del manual de procedimientos para el diagnóstico y aislamiento de bacterias fitopatógenas del Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía; Apoyo técnico en la Gestión de Calidad para la certificación según la Normativa ISO-9001-2000 del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación; y el diagnóstico fitopatológico de muestras ingresadas en ambas instituciones.

## **CAPÍTULO I**

**DIAGNÓSTICO DEL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO DE LA  
UNIDAD DE NORMAS Y REGULACIONES, MINISTERIO DE AGRICULTURA,  
GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN.**

## 1.1 Presentación

El Laboratorio Fitosanitario es una dependencia de la Unidad de Normas y Regulaciones del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Fue fundado a finales del año 2004, en la actualidad cuenta con tecnología y especialistas en las ramas de Micología, Nematología, Entomología, Acarología, Análisis de semillas de malezas y Análisis bromatológico de leche. Este último implementado en el año 2007, cuenta con uno de los tres Milkoscan del país para la realización de dichos análisis.

Dentro de los servicios que ofrece el laboratorio se encuentra la emisión de certificados fitosanitarios para productos vegetales de exportación y productos vegetales importados, toma, preservación y traslado de muestras vegetales para análisis de laboratorio, manejo integrado de plagas, manejo integrado de cultivos, entre otros. Estos servicios están disponibles especialmente para empresas productoras de semillas, empresas agrícolas y forestales, cooperativas agrícolas, asociaciones productoras y gremiales, organismos internacionales, sistemas de vigilancia y protección fitosanitaria.

## **1.2 Marco Referencial**

### **1.2.1 Ubicación**

El Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación se encuentra ubicado en dentro de las instalaciones del Laboratorio Nacional de Salud, Kilometro 22 carretera al Pacífico.

### **1.2.2 Administración**

El Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario es una sub-área que pertenece a la Unidad de Normas y Regulaciones. Por lo que la administración esta bajo la dirección del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación.

### **1.2.3 Alcances**

- El laboratorio cuenta con el equipo e infraestructura necesaria para el diagnostico y análisis fitopatológicos, entomológicos, acarológicos, y de malezas. Así como también cuenta con un milkoscan para realizar análisis bromatológicos muestras de leche y sus derivados.
- El Laboratorio Fitosanitario es le laboratorio nacional de referencia por lo que cuenta con una base de datos actualizada de enfermedades y plagas cuarentenadas para nuestro país.
- El laboratorio también colabora con asesoría técnica y capacitaciones en toma de muestras para las entidades que las requieran.

#### **1.2.4 Servicios Prestados**

- Análisis Micológicos
- Análisis Nematològicos
- Análisis Entomològicos
- Análisis Acarològicos
- Análisis de porcentaje de germinación de semillas
- Determinación de malezas
- Análisis bromatològico de leche y subproductos.

#### **1.2.5 Costos**

El Laboratorio Fitosanitario del Ministerio de agricultura, ganadería y alimentación posee una tarifa estándar de US\$ 9.75 por análisis efectuado, y se puede pagar en moneda nacional según el cambio del día propuesto por el Banco de Guatemala.

#### **1.2.6 Recursos Humanos**

El recurso humano en el Laboratorio Fitosanitario esta constituido por ingenieros agrónomos y técnicos especialistas en el área de protección vegetal, así como una secretaria y un laboratorista. Actualmente se encuentra bajo la dirección del Ingeniero Agrónomo Edil Rodríguez.

El personal del laboratorio se encuentra distribuido según el área en la que se desempeña de la siguiente forma:

- a. Micología
  - Analista Nelson García
- b. Nematología
  - Ing. Agr. Edil Rodríguez
  - Ing. Agr. Aníbal Pérez

- c. Acarología
  - Ing. Agr. Msc. Otto Lavagnino
  
- d. Entomología
  - Ing. Agr. Msc. Pablo Cordón
  - Análista Arturo Garcia Salas
- e. Determinación de Malezas
  - Ing. Agr. Aníbal Pérez
  
- f. Germinación de Semillas
  - Analista Nelson García
  
- g. Análisis Bromatológicos de Leche y Derivados
  - Técnico Osmán Valdéz
  
- h. Personal administrativo
  - Digitalizadora: Diana Gutiérrez
  - Secretaría: Sayda Guillén

### **1.2.7 Metodología de Ejecución**

- a. La recepción de muestras se realiza en la oficina de recepción en donde el solicitante debe llenar el protocolo de recepción de muestras para consignar la información básica del usuario tal como: nombre de la empresa, dirección, teléfono, correo electrónico. Así como información básica del cultivo.
  
- b. El responsable de recepción revisa la muestra según la guía de Toma, preservación y envío de muestras al laboratorio.
  
- c. El responsable de la recepción de muestras de acuerdo a las condiciones de la muestra toma la decisión de ingresarla o rechazarla.

- d. Si la muestra no cumple con las condiciones necesarias para realizar el diagnóstico se rechaza, codifica y se le informa al usuario.
- e. Si la muestra cumple con las condiciones se procede a ingresarla y codificarla.
- f. Se envía la información de la muestra ingresada a la responsable de la base de datos.
- g. El encargado de recepción prepara la muestra según Guía Técnica de preparación de muestras del laboratorio.
- h. Una vez preparada la muestra para su análisis el encargado de recepción procede a distribuirla al o a los analistas responsables del diagnóstico.
- i. El o los analistas responsables proceden a realizar el diagnóstico de la muestra.
- j. El resultado del análisis realizado se entrega a la responsable de la base de datos quien lo ingresa al registro virtual del laboratorio.
- k. La responsable de la base de datos posteriormente envía el resultado de la muestra a la responsable de la emisión de resultados.
- l. La secretaria administrativa realiza la emisión de los resultados de los diagnósticos y entrega al Jefe del Laboratorio para su revisión y autorización.
- m. Entrega de resultados al usuario.

### **1.2.8 Volumen de muestras procesadas**

El volumen de muestras procesadas en el laboratorio Fitosanitario ha ido en aumento en los últimos años. Durante el año 2006 se analizó un total de 2632 muestras vegetales.

Dado a la implementación del departamento de análisis bromatológico de leche y derivados se espera un incremento significativo de ingresos para el año 2007.

Cabe mencionar que en muchas ocasiones se solicitan dos o más análisis diferentes por muestra ingresada.

### **1.2.9 Distribución de los Fondos Recaudados**

Los fondos recaudados son administrados por la Unidad de Normas Y regulaciones, utilizando una cuenta que se maneja bajo el nombre de Laboratorio fitosanitario, en el Banco para el Desarrollo Rural.

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo general**

- Establecer la situación del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación y Centro de Diagnóstico Parasitológico, Facultad de Agronomía, durante febrero del año 2007.

### **1.3.2 Objetivos específicos**

- Definir las áreas de trabajo con las que cuenta el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación -MAGA-
- Dar a conocer el recurso humano y físico con el que cuenta el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario.
- Determinar las fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas del Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario.

## 1.4 Metodología

Para determinar la situación general del CDP-FAUSAC durante el Ejercicio Profesional Supervisado (EPS) de febrero a noviembre 2007, se definieron dos aspectos:

-Obtención de información acerca del funcionamiento, puntos críticos y aspectos positivos del Laboratorio Fitosanitario del Ministerio de Agricultura, a través de entrevistas personales con los técnicos de laboratorio.

-Actualización del inventario del equipo y reactivos del CDP-FAUSAC, durante el año 2007.

Durante las entrevistas se requirió tanto de la opinión, aportes y datos que pudieran ser útiles para el diagnóstico, en cuanto al servicio que se presta, y con esa base establecer las fortalezas y debilidades.

Para la actualización del inventario del material y equipo de laboratorio se verificaron los archivos existentes y se actualizó la información.

## 1.5 Resultados

### 1.5.1 Infraestructura

El laboratorio cuenta con un área de recepción y preparación de muestras y 3 laboratorios equipados en donde se llevan a cabo las actividades de análisis y diagnósticos fitopatológicos y bromatológicos de leche y derivados. Así como también posee una bodega de almacenamiento para materiales y reactivos.

### 1.5.2 Equipo

El área de recepción de muestras (ver cuadro 1.1) cuenta con el siguiente equipo:

Cuadro 1.1 Descripción de equipo para el área de recepción de muestras.

Cantidad	Equipo
1	Computadora de escritorio con servicio de internet
1	Refrigeradora
	Papelería y equipo básico de oficina

El área destinada a la ejecución de diagnóstico fitopatológico y nemátodos filiformes (ver cuadro 1.2) cuenta con el siguiente equipo:

Cuadro 1.2 Descripción de equipo para el área de diagnóstico de hongos y nemátodos.

Cantidad	Equipo
3	Microscopios de investigación
3	Estereoscopios de investigación
3	Incubadoras
1	Centrifuga
1	Campana de Flujo laminar
3	Lámparas
1	Computadora de escritorio con servicio de internet
	Software y programas de apoyo para diagnósticos
	Cristalería, instrumental y equipo de laboratorio

El laboratorio de análisis bromatológico de muestras de leche y sus derivados (ver cuadro 1.3) cuenta con:

Cuadro 1.3 Descripción de equipo para el área de análisis de leche.

<b>Cantidad</b>	<b>Equipo</b>
1	Milkoescan
1	Computadora de escritorio con servicio de internet
1	Impresora
	Cristalería e instrumental necesarios para los análisis.

El área común destinada para la preparación de muestras, extracción de nematodos, análisis acarológicos, entomológicos, determinación de malezas y diagnósticos de nemátodos de quiste se encuentra cuenta con el siguiente equipo (ver cuadro 1.4).

Cuadro 1.4 Descripción de equipo para el área de procesamiento de muestras.

<b>Cantidad</b>	<b>Equipo</b>
4	Microscopios
4	Estereoscopios
1	Refrigeradora
1	Horno de Microondas
1	Cámara Nebulizadora
1	Incubadora
1	Balanza Semianalítica
2	Estufas eléctricas
2	Hornos Pasteur
	Cristalería instrumental y equipo de laboratorio

## Listado de reactivos en bodega para el año 2007

Cuadro 1.5 Reactivos existentes en bodega durante el año 2007.

Producto	Cantidad	Presentación
Ceilobiose	5	25 gr
Bromothymol azul	11	25 gr
Zinc	2	1 kg
Rojo Fenol	2	25 gr
Yodo	4	500 gr
Acido sulfanilico	4	100 gr
L-arginina	1	25 gr
Verde de Malaquita	3	25gr
Nitrato de potasio	2	500gr
Sodio Fosfato bibásico anidro	1	500 gr
Sodio Fosfato bibásico	1	500 gr
Peptona de Caseína	5	1 kg
Carbonato de calcio	2	1 kg
Carbonato de calcio	2	250 gr
Sulfato de magnesio heptahidratado		
Fosfato monohidratado	1	500gr
Safranina	5	25 gr
Safranina en solución	2	1 lt
Lactosa monohidrato	2	1 kg
Formaldehido es solución 37%	2	2.5 lts
Glicerina	2	galón
Biphenyl-4-ácido carboxílico	3	25 gr
Isopropilico	13	galón
A. E. Clavo	1	galón
Acido Clorhidrico	1	galón
solución Hoyers	1	100ml
Acido Clorhidrico 37%	1	1 lt
Solución de lugol	1	250 ml
Gelatina	1	500gr
Acido nicotínico	2	100 gr
Potassium dichromate	1	500 gr
Cloral hidrato	1	1 kg
Goma arábica	1	1 kg
Diclorobenceno	1	1 kg
Sodio hidrogenocarbonato	1	1 kg
Clorhidrato de calcio	1	500gr
Agar Nutritivo	2	500 gr
D(-) manita	2	500 gr
Caldo lactosa	1	500gr
Agar EMB	1	500 gr
Triplex		
Potassium iodide	1	250 gr
streptomycin sulfato	1	
trisodium citratedihydrate	1	500 gr
trisodium citratedihydrate	2	1 kg
Silver pitrate	1	25 gr

Producto	Cantidad	Presentación
Extracto de carne	4	500 gr
Agar B de King	4	500 gr
Acido acético 100%	6	2.5 lts
NIT 2 p/test de nitrato	10	30 ml
Cobre CII sulfato pentahidratado	2	1 kg
Calcio Nitrato Tetrahidratado	1	500 gr
Citofic Solución Fijadora	7	Spray
Amonio Hidroxido	2	2.5 lts
Cristal Violeta	2	1 kg
Acido Lactico 90%	4	2.5 lts
Solución de violeta (gentiana fenicada)	2	1 lt
Cobalt (II) Chloride hexahydrate	1	250 gr
Fucsina acida	1	25 gr
Agarosa	1	25 gr
Lactofenol Azul en solución	3	
Balsamo de Canada	1	100 ml
Merckog	1	500 ml
Agar-Agar	3	1 kg
Hidróxido de Potasio	2	1 kg
Sodio dihidrogenofosfato monohidrato	2	1 Kg
Cloruro de Potasio	3	1 kg
Clorato de Amonio	2	1 kg
Amonio dihidrogenofosfato	4	500 gr
Nitrato de Sidio	4	500 gr
Yoduro de Potasio	2	1 kg
Potasion dihidrogenofosfato	2	1 kg
Cloruro de Litio	7	250 gr
Disodio tartrato dihidrato	2	1 kg
Cloruro de Sodio	2	1 kg
Carbonato de sodio	2	1 kg
Nitrato de potasio	2	1 Kg
Fenol	4	1 kg
Ammonium lactate 70%	5	100 ml
Auxillase liquida	1	2.5 lts
Extracto de levadura granulado	4	500 gr
Sulfato de Magnesio heptahidrato	2	1 lt

### 1.5.3 Análisis FODA (fortalezas, oportunidades, debilidades y amenazas)

Cuadro 1. 6 Análisis FODA, Laboratorio Fitosanitario, Ministerio de Agricultura.

<b>FORTALEZAS</b>	<b>OPORTUNIDADES</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cuenta con profesionales calificados.</li> <li>• Reconocimiento a nivel nacional e internacional.</li> <li>• Centro de referencia nacional.</li> <li>• Respaldo institucional.</li> <li>• Personal sujeto a capacitaciones periódicas.</li> <li>• Cobertura a nivel nacional (anexos en Péten y Quetzaltenango)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tiene oportunidad de crecimiento</li> <li>• Puede cubrir proyectos de organizaciones estatales o entidades privadas.</li> <li>• Puede dar asesorías técnicas profesionales a las instituciones que las requieran.</li> </ul>
<b>Debilidades</b>	<b>AMENAZAS</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• No posee equipo para el análisis de bacterias fitopatógenas</li> <li>• No posee equipo para el análisis de virus.</li> <li>• Falta de tecnología de punta.</li> <li>• Su dirección esta sujeta a los cambios de gobierno, debido a ello es muy difícil que se le pueda dar seguimiento a proyectos mayores a 4 años.</li> <li>• Dado que los recursos son administrados por una entidad externa, el financiamiento se obtiene solo una vez al año.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Situación Política del país.</li> <li>• Corrupción</li> <li>• Otras instituciones privadas prestan los mismos servicios.</li> <li>• Otras instituciones cuentan con equipos mas especializado para el análisis y diagnostico.</li> </ul>

## 1.6 Conclusiones y Recomendaciones

### 1.6.1 Conclusiones

- El Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura Ganadería y alimentación cuenta con 3 laboratorios destinados para el diagnóstico fitopatológico. Cada área cuenta con especialistas calificados para el óptimo desarrollo de cada una de las actividades.
  
- Los servicios que ofrece el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario son:
  - Análisis Micológicos
  - Análisis Nematológicos
  - Análisis Entomológicos
  - Análisis Acarológicos
  - Análisis de porcentaje de germinación de semillas
  - Determinación de malezas
  - Análisis bromatológico de leche y subproductos.
  
- Actualmente el laboratorio se encuentra en el proceso de certificación con las normas ISO 9001-2000 que es una norma internacional que se aplica a los sistemas de gestión de calidad (SGC) y que se centra en todos los elementos de administración de calidad con los que una empresa debe contar para tener un sistema efectivo que le permita administrar y mejorar la calidad de sus productos o servicios poniendo en practica la mejora continua.
  
- Se están realizando los manuales de procedimientos, los cuales documentan cada una de las metodologías a seguir para cada uno de los procesos de diagnostico, que son un requisito fundamental para obtener la certificación ISO 9001-2000.

### 1.6.2 Recomendaciones

- Apoyar durante el año en curso a la elaboración de los manuales de procedimientos y documentación necesaria para llevar a cabo el proceso de certificación bajo la norma ISO 9001-2000.
- Debido a la importancia económica que tiene la agricultura en Guatemala es necesaria la documentación y divulgación de las enfermedades y plagas cuarentenadas en los cultivos tradicionales y no tradicionales tanto de exportación como de consumo local ya que actualmente existe poca información documentada lo cual dificulta el control y manejo.
- Iniciar acciones que permitan la implementación de un área destinada al análisis de bacterias fitopatológicas ya que actualmente el laboratorio no cuenta con esta especialidad.

## 1.7 Bibliografía

1. Barrera, A. 1996. Sistemas de Documentación para Laboratorios Farmacéuticos. Guatemala, Editorial Universitaria. 182 p.
2. FAO, IT. 2006. Normas internacionales para medidas fitosanitarias: directrices para vigilancia. Roma, Italia, FAO, Secretaría de la Convención Internacional de Protección Fitosanitaria. 11 p.
3. Streets, R. 1978. The diagnosis of plant diseases. US, The University of Arizona Press. 245 p.



## **CAPÍTULO II**

### **INVESTIGACIÓN**

**DIAGNÓSTICO DE *Phytophthora sp* y *Pythium sp* ASOCIADOS A PUDRICIONES  
RADICULARES Y DE TALLO EN HORTALIZAS DE EXPORTACIÓN EN EL  
DEPARTAMENTO DE CHIMALTENANGO**

***Phytophthora sp.* and *Pythium sp.* DIAGNOSIS RELATED TO RADICAL ROTTS  
AND STEM IN EXPORTING VEGETABLES EN CHIMALTENANGO DEPARTMENT**

## 2.1 Presentación

El departamento de Chimaltenango es conocido como uno de los principales productores de hortalizas a nivel nacional. Entre las principales hortalizas que se exportan se tienen diferentes especies de brásicas, cucurbitáceas, legumbres y solanáceas. Dicha área también es propicia para el desarrollo de mora, frambuesa y fresa.

Entre las empresas más importantes que se dedican a exportación de hortalizas en el departamento de Chimaltenango están: Cooperativa Cuatro Pinos que exporta un promedio de 24 millones de libras de vegetales frescos a los mercados de los Estados Unidos de América, Canadá y Europa (Inglaterra, Holanda, Suiza, Bélgica y Alemania), y Cooperativa Labradores Mayas surte con mas de 90,000 libras de vegetales semanalmente a mercados en El Salvador y Honduras.

Se tiene reportado que para Centroamérica el nivel de pérdidas en cultivos de hortalizas causadas por *Phytophthora* y *Pythium* alcanzan los 3,845 Kg/ha, representando un nivel de daño económico de 230 millones de dólares al año (6).

Para el efecto de esta investigación se realizaron muestreos semanales en los diferentes municipios del departamento de Chimaltenango productores de hortalizas de exportación, se georeferenciaron los sitios de muestreo, se colectó y aisló mediante el método de cultivo trampa diversas especies de *Phytophthora* y *Pythium* presentes en los cultivos.

De los muestreos realizados se obtuvo que las especie presente fue *Pythium ultimum* asociado principalmente el cultivo de arveja china, la sintomatología presentada fue un deficiente desarrollo radical, amarillamiento y poco crecimiento.

Se determinó la presencia de *Phytophthora capsici* en muestras de suelo provenientes de los municipios del Tejar y Comalapa asociado al cultivo de chile pimiento (*Capsicum annuum L.*) y *Phytophthora cinnamomi* en una muestra de suelo cultivado con tomate (*Lycopersicum esculentum*). Mediante pruebas de patogenicidad se determinó que *P. cinnamomi* no es patógeno de dicho cultivo.

## 2.2 Marco Conceptual

### 2.2.1 Principales características de *Phytophthora* y *Pythium*

#### 2.2.1.A Taxonomía

Dominio:	Eucariota	
Reino:	Stramenopila (Heterokonta)	
Phylum:	Oomycota	
Clase:	Oomycetes	
Orden:	Pythiales	Saprolegniales
Genero:	<i>Pythium</i>	<i>Phytophthora</i>

La clasificación taxonómica de los géneros *Phytophthora* y *Pythium* ha sido ampliamente discutida. En un principio fueron clasificados como una división del Reino Fungi, pero esto ha caído en desuso y en la actualidad se incluyen dentro del Reino Chromista que incluye algas pardas y diatomeas. Aunque la existencia en este mismo reino también es discutido, debido a esto la comunidad internacional también los suele incluir en el Reino Protista, la confusión en la clasificación se debe a una convergencia evolutiva con los hongos (16).

Existen también variaciones en cuanto a los criterios taxonómicos del Reino Chromista ya que en la literatura dicho reino y su conjunto es además conocido como Stramenopila, Heterokonta o Chromobionta entre otros, cada uno de estos términos en ocasiones utilizados para referirse a grupos más restringidos. (4)

La característica común al filo es el crecimiento miceliar sin septación y el ciclo de vida que presentan es diplonte, es decir, presentan un ciclo que alternan fases miceliales diploides con fases de reproducción sexual haploides. La fase de reproducción asexual se caracteriza por la presencia de zoosporas biflageladas, con un flagelo mastigonemado dirigido hacia delante y otro desnudo que generalmente se dirige hacia atrás. La fase de reproducción sexual es por oogamia, por gametangiogamia (copulación-contacto gametangial). (16)

## 2.2.1.B Reproducción

### A. Reproducción asexual

Ocurre de la misma manera en todos los oomycetes, mediante la formación de estructuras llamadas esporangios, estos se encuentran sobre una hifa especializada que recibe el nombre de esporangióforo. Los esporangios difieren en cada uno de los distintas especies de oomycetes en cuanto a forma, modo de germinación, localización en el tejido del hospedero y estructura de los esporangióforos. La forma de los esporangios de *Pythium* van desde filamentosos en algunas especies a redondos en otras (Fig.1) Los esporangios de las especies de *Phytophthora* siempre son limoniformes (Fig.2). (7)

En las figuras 2.1 y 2.2 se muestran esporangios esféricos de *Pythium* sp. y esporangios limoniformes de *Phytophthora infestans*, respectivamente.



Figura 2.1 Esporangios de *Pythium* sp

Fuente: F.A. Gray

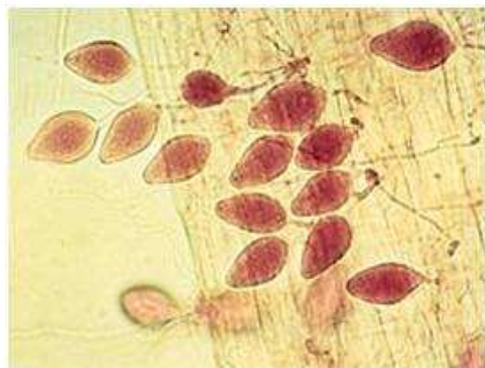


Figura 2.2 Esporangios limoniformes de *P.infestans*

Fuente: F.A. Gray

Se conocen dos diferentes mecanismos de germinación de los esporangios. El tipo de mecanismo es específico para cada especie, algunas especies pueden germinar de ambas formas dependiendo de la temperatura o condiciones de humedad. En muchas especies de patógenos foliares el esporangio germina directamente en la superficie de una planta susceptible mediante la formación de un tubo germinativo. (9)

En la mayoría de los casos los esporangios germinan indirectamente mediante la producción de zoosporas, que no son más que esporas asexuales móviles, estas zoosporas poseen dos flagelos, un flagelo mastigonemado dirigido hacia delante y otro desnudo que, generalmente, se dirige hacia atrás. En las especies de *Phytophthora* la diferenciación de las zoosporas ocurre en los esporangios. En contraste con muchas especies de *Pythium*, el esporangio produce un pequeño tubo que se conecta a una estructura secundaria similar a una vesícula. Las estructuras son parcialmente diferenciadas en el esporangio para luego ser transferidas a través del tubo dentro de la vesícula para el culminar su desarrollo y expulsión (Fig. 2.3). (7)

En la figura 2.3 se puede observar zoosporas al momento de salir de los esporangios de *Phytophthora sp* a la izquierda y de *Pythium sp* a la derecha.

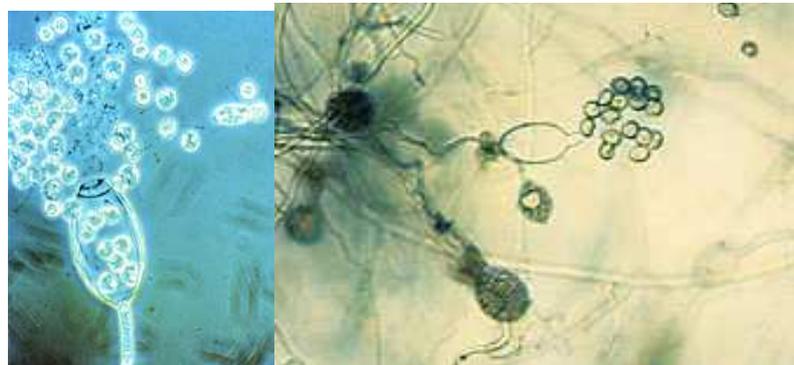


Figura 2.3 A. Zoosporas de *Phytophthora sp* y B. Zoosporas de *Pythium sp*.

Fuente: F.W. Schwenk, Kansas State University, P.B. Hamm

Las zoosporas son dispersadas a través del agua, una vez en la solución del suelo estos siempre son atraídos por los azúcares y aminoácidos que exudan las raíces de las plantas. Las zoosporas pueden dispersarse pasivamente en aguas corrientes y recorrer largas distancias, o bien pueden enquistar. El enquistamiento hace que la

zoospora la cual no posee ninguna pared que la proteja de las inclemencias del tiempo, sobreviva en condiciones adversas, para luego germinar produciendo un tubo germinativo. (14)

## B. Reproducción Asexual

Ocurre entre dos gametangios diferentes: el Oogonio contiene en su interior varios huevos, y el anteridio que fertiliza el oogonio. Si el anteridio esta localizado a un lado del oogonio el arreglo se denomina parágino. Si el anteridio se encuentra bajo el oogonio, simulando un collar, se dice que el arreglo es anfígeno (Fig.4). (14)

La Figura 2.4 muestra los dos diferentes arreglos del oogonio y anteridio que pueden presentarse tanto en *Phytophthora sp* como en *Pythium sp*.



Arreglo parágino del oogonio y anteridio en *Pythium*.  
Fuente: P.B. Hamm

Arreglo anfígeno del oogonio y el anteridio en *Phytophthora cambivora*.  
Fuente: P.B. Hamm

Figura 2.4 Arreglos del oogonio y anteridio en *Phytophthora sp* y en *Pythium sp*

En las especies homotálicas la fertilización puede darse en una línea simple. En las especies heterotálicas son requeridas dos diferentes líneas de apareamiento (mating types A1 y A2) para que la fertilización pueda llevarse a cabo. En especies tanto homotálicas como heterotálicas el resultado de dicha fertilización es un cigoto denominado oospora. (7)

## 2.2.2 Descripción de los géneros *Phytophthora* y *Pythium*

### 2.2.2.A *Phytophthora*

Hasta 1990 se habían reportado 67 especies de *Phytophthora* pero se han ido adicionando mas a la lista, actualmente de cree que existes cerca de 80 (11), incluyendo algunas especies históricamente devastadoras ( *P. cinnamomi* *P. infestans* Y *P. ramorum*). (1)

*Phytophthora* es un patógeno que habita en el suelo y afecta principalmente las raíces y la base del tallo de la planta, aunque también puede atacar las partes aéreas. Los síntomas iniciales son necrosamiento y pudrición de raíces secundarias y terciarias que son las que se encargan de la absorción de agua, luego se presenta la marchitez de plantas y posteriormente pudrición de frutos, la muerte de la planta es ocasionada por el avance del hongo a través del pedúnculo del fruto, ramas y tallo. Bajo condiciones favorables de temperatura (25 a 28°C) y alta humedad del suelo, la mayoría de las especies el hongo son sumamente agresiva, capaces de destruir campos enteros de los hospedantes. Este hongo sobrevive de un ciclo a otro en el suelo en forma de oosporas. (18)

#### A. Diseminación de *Phytophthora*

En *Phytophthora* es el esporangio asexual el responsable de la rápida diseminación de la epidemia, ya que estas liberan zoosporas móviles que subsecuentemente forman cistos, germinan e infectan el material vegetal. La forma de diseminación de los propágulos del patógeno están asociados con la forma del esporangio. Las especies cuyos esporangios son no papilados liberan las esporas por un poro de salida sin soltarse de la hifa que lo sostiene (esporangios no caducos). Luego de la expulsión de las zoosporas una nueva estructura se forma dentro del esporangio vacío el cual se convierte en un esporangio secundario (proliferación esporangial) en este caso la dispersión de las zoosporas esta limitada por el flujo de agua. En el caso de las especies cuyos esporangios son papilados o semipapilados, los mismos pueden desprenderse de las hifas de las cuales nacieron (reciben el nombre de caducos) y poseen más facilidad de ser dispersados por el viento, salpicaduras de lluvia o por las prácticas agrícolas. Los esporangios de las especies papiladas (ej. *P. infestans*)

también muestran la capacidad de infectar directamente vía zoosporas dependiendo de las condiciones climáticas (12).

Varias características son tomadas en cuenta para la clasificación morfológica de las especies de *Phytophthora*, una de las más importantes es la forma del esporangio basado en el tipo de la papila, el desarrollo sexual de la oospora, el arreglo del anteridio con el Oogonio, entre otras.

La figura 2.5 muestra un árbol filogenético de 17 especies de *Phytophthora* que ilustra los dos linajes (papilados-semipapilados y no papilados), además se puede observar ejemplos de cada uno de ellos (12).

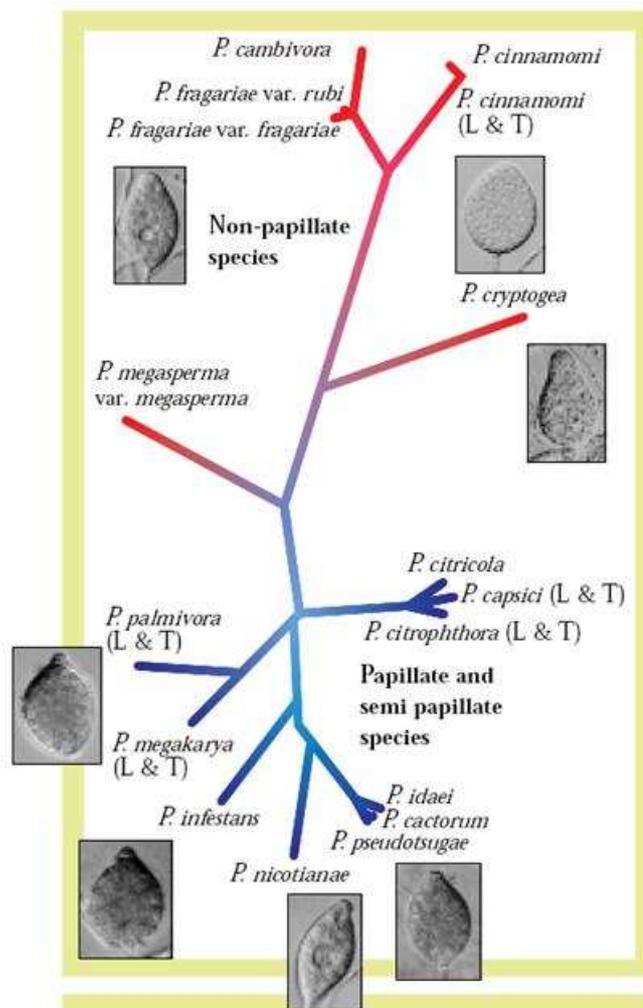


Figura 2.5 Árbol filogenético de 17 especies de *Phytophthora* sp.

Fuente: D. Cooke, N. Williams & J.M. Duncan (17).

## **B. Sobrevivencia de *Phytophthora***

Los miembros de este género producen clamidiosporas, las cuales constituyen un órgano de conservación y supervivencia. Generalmente son de forma redondeada con una pared bien definida (más de 2 micras de espesor), siendo comúnmente intercalares aunque también pueden encontrarse en el extremo terminal de la hifa. Al principio las clamidiosporas son hialinas, tornándose de un color amarillo o ligeramente marrón con la edad. Es importante señalar que no se forman en todas las especies, por lo cual su presencia es importante para la taxonomía de las mismas. Las clamidiosporas pueden germinar dando lugar a numerosos tubos germinativos o a la producción de esporangios. (5)

### **2.2.2.B *Pythium* sp**

El género *Pythium* consiste en aproximadamente 120 especies que ocupan diversos hábitats, que van desde ecosistemas terrestres, hasta el agua salada de los estuarios. Muchas especies son patógenos de plantas, otras son estrictamente saprofitas del suelo o son parásitas de insectos, peces, algas o mamíferos. Se cree que algunas especies no patógenas muestran características de control biológico capaces de proteger a las plantas del ataque de las especies patógenas. Algunas especies patógenas poseen un rango amplio de hospederos, mientras otras infectan un limitado número de especies de plantas. Por ejemplo, *P. aphanidermatum* y *P. ultimum* es patógeno de un gran número de cultivos, mientras que *P. graminicola* y *P. spinosum* tienen un número de hospederos más restringidos. (12)

*Pythium* es el patógeno más importante que infecta a las semillas y plántulas antes de emerger del suelo, el hongo también infecta las raíces e hipocotilo de las plántulas después de emerger, llegando a ocasionar la muerte el resultado de esta infección recibe el nombre de mal del talluelo. Muchas especies de plantas pueden sobrevivir a la infección luego de que ha emergido, no obstante generalmente exhiben síntomas tales como la reducción de su vigor y poco desarrollo. *Pythium* también puede infectar las raíces de plantas maduras ocasionando lesiones necróticas y pudriciones. *Pythium* reduce significativamente el crecimiento y productividad de los cultivos aun cuando no manifieste la sintomatología característica asociada con la enfermedad, debido a que

las raicillas y pelos radiculares son destruidas, el sistema radicular utiliza el nitrógeno y otros nutrientes ineficientemente. (12)

Las oosporas son las estructuras principales de sobrevivencia en la mayoría de las especies de *Pythium*. Estas esporas sexuales son resistentes a la deshidratación y pueden sobrevivir en el suelo durante largos periodos de tiempo en ausencia de un hospedero o un sustrato orgánico que soporte un crecimiento saprofito. Por ejemplo las oosporas de *P. ultimum* pueden sobrevivir en suelos secos hasta por 8 meses, las de *P. aphanidermatum* y *P. graminicola* se ha recuperado del suelo hasta después de 11 meses *Pythium aphanidermatum* sobrevive como oospora hasta 16 meses. Se han reportado recuperaciones de oosporas hasta 12 años después de estar en suelos áridos. Este fenómeno se debe a que las oosporas de *Pythium* exhiben una dormancia o latencia que hace que estas no germinen aunque las condiciones sean favorables para su desarrollo. Los eventos moleculares que sacan a las oosporas de su dormancia hacia el estado germinativo aun no ha sido bien establecido en *Pythium* sin embargo Jiang et al (1989) (*pythium*) postuló que la cariogamia entre los núcleos haploides del anteridio y el oogonio puede ocurrir antes que la oosporas de *Phytophthora sp* puedan germinar. En algunas especies de cómo en *Pythium ultimum*, la maduración es un proceso acompañado de la reducción de la reducción en el espesor de la pared de la oospora. Para otras especies como *P. aphanidermatum* la germinación no se acompaña de esta característica. (12)

Los esporangios y las hifas son las estructuras reproductivas asexuales que forma *Pythium*. Su morfología varía desde filiforme en algunas especies hasta esféricos en otras. Las estructuras esféricas sobreviven por periodos más largos, en contraste con los esporangios filamentosos o lobulados ya que se cree que estos últimos tienen un menor tiempo de vida en el suelo. (12)

Las oosporas y esporangios de *Pythium* se encuentran pasivas en el suelo y no germinan en ausencia de algunos estimulantes químicos. Un numero de aminoácidos, carbohidratos y compuestos volátiles (tales como etanol o aldehídos) presentes en los exudados producidos por las raíces de las plantas, restos de cosechas, o materia orgánica y que estimulan la germinación de la oospora y la producción del tubo germinativo. Cuando el suministro de nutrientes concentrados son suficientes para

estimular la germinación del propágulo, no obstante no tan prolongado como para que se pueda formar el tubo germinativo algunas especies son capaces de modificar su estructura mediante la formación de un esporangio secundario formado a partir de oosporas o de un esporangio primario perfectamente capaz de sobrevivir en el suelo. Los esporangios y las oosporas de todas las especies de *Pythium* germinan directamente produciendo un tubo germinativo, pero los esporangios de algunas especies también pueden producir zoosporas en presencia de ciertos nutrientes o de alta humedad, los esporangios de estas especies son estimulados a producir zoosporas móviles que también germinan directamente. Una vez en la solución del suelo las zoosporas tienen un tiempo limitado para encontrar e infectar un hospedero susceptible. Si hay agua presente, estas son atraídas por las semillas germinadas o raíces, en donde enquistan y penetran en el hospedero. Si las condiciones no son las adecuadas para la infección, las zoospora enquistan en el suelo hasta que la temperatura y humedad sean favorables. Una zoospora puede permanecer viable en el suelo hasta por 7 días. (12)

### **2.2.3 Cultivos bajo estudio**

#### **2.2.3.A Chile pimiento**

##### **A. Taxonomía y Morfología**

Dominio: Eucariota  
 Reino: Viridiplantae  
 Phylum: Spermatophyta  
 Subphylum: Angiospermae  
 Clase: Dicotyledonae  
 Orden: Solanales  
 Familia: Solanaceae  
 Genero: Capsicum

**a. Planta:** herbácea perenne, con ciclo de cultivo anual de porte variable entre los 0,5 metros (en determinadas variedades de cultivo al aire libre) y más de 2 metros (gran parte de los híbridos cultivados en invernadero) (10).

**b. Sistema radicular:** pivotante y profundo (dependiendo de la profundidad y textura del suelo), con numerosas raíces adventicias que horizontalmente pueden alcanzar una longitud comprendida entre 50 centímetros y 1 metro (10).

**c. Tallo principal:** de crecimiento limitado y erecto. A partir de cierta altura (“cruz”) emite 2 ó 3 ramificaciones (dependiendo de la variedad) y continua ramificándose de forma dicotómica hasta el final de su ciclo (los tallos secundarios se bifurcan después de brotar varias hojas, y así sucesivamente). (10)

**d. Hoja:** entera, lampiña y lanceolada, con un ápice muy pronunciado (acuminado) y un pecíolo largo y poco aparente. El haz es glabro (liso y suave al tacto) y de color verde más o menos intenso (dependiendo de la variedad) y brillante. El nervio principal parte de la base de la hoja, como una prolongación del pecíolo, del mismo modo que las nervaciones secundarias que son pronunciadas y llegan casi al borde de la hoja. La inserción de las hojas en el tallo tiene lugar de forma alterna y su tamaño es variable en función de la variedad, existiendo cierta correlación entre el tamaño de la hoja adulta y el peso medio del fruto. (10)

**e. Flor:** las flores aparecen solitarias en cada nudo del tallo, con inserción en las axilas de las hojas. Son pequeñas y constan de una corola blanca. La polinización es autógama, aunque puede presentarse un porcentaje de alogamia que no supera el 10%. (10)

**f. Fruto:** baya hueca, semicartilaginosa y deprimida, de color variable (verde, rojo, amarillo, naranja, violeta o blanco); algunas variedades van pasando del verde al anaranjado y al rojo a medida que van madurando. Su tamaño es variable, pudiendo pesar desde escasos gramos hasta más de 500 gramos. Las semillas se encuentran insertas en una placenta cónica de disposición central. Son redondeadas, ligeramente reniformes, de color amarillo pálido y longitud variable entre 3 y 5 centímetros. (10)

Especies de *Pythium* asociados al cultivo de chile pimiento

La especie de *Pythium* asociadas al cultivo de chile pimiento es: *P. irregulare*. (3)

Especies de *Phytophthora* asociados al cultivo de chile pimiento

Las especies de *Phytophthora* asociadas al cultivo de chile pimiento son: *P. infestans*, *P. capsici*, *P. cryptogea* y *P. nicotianae*. (3)

### 2.2.3.B Brócoli

#### A. Taxonomía y Morfología

Dominio: Eucariota  
 Reino: Viridiplantae  
 Phylum: Spermatophyta  
 Subphylum: Angiospermae  
 Clase: Dicotyledonae  
 Orden: Caparales  
 Familia: Brassicaceae  
 Genero: Brassica  
 Especie: *B. oleraceae* L.

Es una planta bianual que se cultiva como anual (es decir que no formará la inflorescencia hasta pasar un periodo de temperaturas bajas), con tallo corto, hojas grandes con limbo de color azulado y nervaduras gruesas. La parte comestible es la inflorescencia (llamada “pella” o “cabeza”), compacta esférica, formada por pedicelos y botones florales apelmazada, con raíces pivotantes, de la que parte una cabellera de raíces secundarias. (13)

Las flores del brócoli son pequeñas, en forma de cruz de color amarillo y el fruto es una silicua de valvas ligeramente convexas con un solo nervio longitudinal. Produce abundantes semillas redondas y de color rosáceo (9).

Especies de *Pythium* Asociadas al cultivo de brocoli

Las especies de *Pythium* asociadas al cultivo de brócoli son *P. irregulare* y *P. aphanidermatum*. (3)

Especies de *Phytophthora* asociadas al cultivo de brocoli

Las especies de *Phytophthora* asociadas al cultivo de brócoli son *P. megasperma*, *P. cryptogea* y *P. porri* (3).

### 2.2.3.C Lechuga

#### A. Taxonomía y Morfología

Dominio: Eucariota  
 Reino: Viridiplantae  
 Phylum: Spermatophyta  
 Subphylum: Angiospermae  
 Clase: Dicotyledonae  
 Orden: Asterales  
 Familia: Asteraceae  
 Genero: Lactuca  
 Especie: *L. sativa*

**a. Raíz:** la raíz, que no llega nunca a sobrepasar los 25 cm. de profundidad, es pivotante, corta y con ramificaciones. (11)

**b. Hojas:** las hojas están colocadas en roseta, desplegadas al principio; en unos casos siguen así durante todo su desarrollo (variedades romanas), y en otros se acogollan más tarde. El borde de los limbos pueden ser liso, ondulado o aserrado. (11)

**c. Tallo:** es cilíndrico y ramificado. (11)

**d. Inflorescencia:** son capítulos florales amarillos dispuestos en racimos o corimbos (11).

**e. Semillas:** están provistas de un vilano plumoso (11).

Especies de *Pythium* asociados al cultivo de lechuga

La especie de *Pythium* asociado al cultivo de lechuga es *P. aphanidermatum*. (3)

Especies de *Phytophthora* asociados al cultivo de lechuga

Las especies de *Phytophthora* asociadas al cultivo de lechuga son *P. cryptogea*, *P. megasperma* y *P. porii*. (3)

### 2.2.3.D Arveja

#### A. Taxonomía y Morfología

Dominio: Eucariota  
 Reino: Viridiplantae  
 Phylum: Spermatophyta  
 Subphylum: Angiospermae  
 Clase: Dicotyledonae  
 Orden: Fabales  
 Familia: Fabaceae  
 Genero: Pisum  
 Especie: *P. sativum*

**a. Planta:** es una planta anual, con hábitos de crecimiento determinado o indeterminado, según la variedad, las alturas varían de 0.50 a 1.75 mts, con un ciclo vegetativo que va de 75 a 120 días, se reproduce con semillas. (17)

**b. Raíz:** La arveja se caracteriza por tener un sistema radicular no muy profuso en el que se produce la simbiosis de la planta con la bacteria *Rhizobium leguminosarum*, fijadora del nitrógeno atmosférico. (13)

**c. Tallos:** son angulosos, de tamaño variable, se componen de un número par de foliolos, comprendido entre dos y ocho (aunque en algunos cultivares no aparece ninguno), y un zarcillo terminal. Tienen un color azulado y presentan en la base un par de hojas falsas (estípulas) de gran tamaño. (13)

**d. Flores:** las flores aparecen en solitario o en grupos de tres o cuatro, en los nudos del tallo, y tienen una coloración blanca o purpúrea. La fecundación es autógama. (13)

**e. Fruto:** el fruto consiste en una legumbre de tamaño y color variado, que encierra en su interior entre cuatro y doce semillas. (13)

B. Especies de *Pythium* asociados al cultivo de arveja

Las especies de *Pythium* asociadas al cultivo de arveja son *P. irregulare*, *P. aphanidermatum*, *P. myriotylum*, *P. ultimum* y *P. graminícola*. (3)

C. Especies de *Phytophthora* asociados al cultivo de arveja

La especie de *Phytophthora* asociadas al cultivo de arveja es: *P. cryptogea*. (3)

### 2.2.3.E Ejote francés

A. Taxonomía y Morfología

Dominio: Eucariota

Reino: Viridiplantae

Phylum: Spermatophyta

Subphylum: Angiospermae

Clase: Dicotyledonae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Genero: *Phaseolus*

Especie: *Phaseolus vulgaris* L.

- a. Planta:** anual, de vegetación rápida.
- b. Sistema radicular:** es muy ligero y poco profundo y está constituido por una raíz principal y gran número de raíces secundarias con elevado grado de ramificación. (13)
- c. Tallo principal:** es herbáceo. En variedades enanas presenta un porte erguido y una altura aproximada de 30 a 40 centímetros, mientras que en las judías de enrame alcanza una altura de 2 a 3 metros, siendo voluble y dextrógiro (se enrolla alrededor de un soporte o tutor en sentido contrario a las agujas el reloj). (13)
- d. Hoja:** sencilla, lanceolada y acuminada, de tamaño variable según la variedad. (13)
- e. Flor:** puede presentar diversos colores, únicos para cada variedad, aunque en las variedades más importantes la flor es blanca. Las flores se presentan en racimos en número de 4 a 8, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos. (13)
- f. Fruto:** legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen de 4 a 6 semillas. Existen frutos de color verde, amarillo jaspeado de marrón o rojo sobre verde, etc., aunque los más demandados por el consumidor son los verdes y amarillos con forma tanto cilíndrica como acintada. En estado avanzado, las paredes de la vaina o cáscara se refuerzan por tejidos fibrosos. (13)

Especies de *Pythium* asociados al cultivo de ejote francés

Las especies de *Pythium* asociadas al cultivo de ejote francés son *P. aphanidermatum*, *P. arrenomanes*, *P. myriotylum*, *P. irregulare* y *P. debarianum*. (3)

Especies de *Phytophthora* asociados al cultivo de ejote francés

La especie de *Phytophthora* asociadas al cultivo de ejote francés es: *P. cryptogea*. (3)

## 2.2.4 Agentes patógenos determinados

### 2.2.4.A *Pythium ultimum*

Presenta esporangios esféricos o subesféricos, terminales o intercalares de 22 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro, frecuentemente aislado de raíces enfermas y semilleros con damping-off. En medio de cultivo, su crecimiento es radiado y de alta densidad. Su temperatura óptima de crecimiento es de 25°C. (7)

La sintomatología del ataque de *Pythium* sp. Se puede resumir en pudrición de la base del tallo y mal del talluelo, lesiones iniciales acuosas y de color marrón oscuro en el tallo, cerca del suelo, que luego se elongan. Después de ello, las hojas bajas se tornan amarillentas y finalmente la planta se marchita. El volumen de las raíces disminuye y en severas infecciones la planta completa muere. Las lesiones se incrementan rápidamente en condiciones húmedas. La enfermedad a menudo aparece cuando esquejes sin enraizar son plantadas en camas de propagación infectadas. (19)

En el caso de *P. ultimum* el ataque a las plantas se suele producir en estadios muy tempranos, incluso en las semillas, provocando problemas de germinación conocidos como mal del talluelo (*damping off*). Durante los años 2004 y 2005 se realizaron prospecciones en explotaciones gallegas de judía verde y grano, en busca de plantas afectadas por mal del talluelo. De los resultados de estas prospecciones se obtuvieron un total de 19 aislados del género *Pythium* de los cuales 9 fueron determinados taxonómicamente como pertenecientes a la especie *Pythium ultimum* Trow. (1)

Actualmente no existe información documentada acerca de *P. ultimum* en Guatemala.

### 2.2.4 B *Phytophthora cinnamomi*

Hospedantes: Piña, nuez, ciprés, kiwi, quinina, canela, pino, quercus, cedro, abeto, aguacate, entre otros (6).

*P. cinnamomi* pertenece al grupo número 4 de la clasificación de *Phytophthora*. Los esporangios son no papilados, oogonios globosos, clamidiosporas globosas y presentan hinchamientos hifales (6).

Las clamidiosporas usualmente se agrupan en racimos (3-10). Los hinchamientos hifales se forman más profusamente que en otras especies (6).

*P. cinnamomi* es una especie heterotática, de anteridios anfígenos, oogonios redondos de hialinos a amarillos (6).

La temperatura optima de crecimiento se encuentra entre el rango de los 24-28 °C (6).

Entre las características de crecimiento de *P. cinnamomi* en medio de cultivo se puede observar: abundantes hinchamientos hifales, hinchamientos vesiculares, protuberancias laterales, en PDA forma colonias de tipo arrosetado (forma de rosa)(9).

La sintomatología en las plantas se caracteriza por que usualmente después de la pudrición radicular el follaje de las plantas se torna clorótico, marchito y muere rápidamente. En algunos casos la planta muere súbitamente pero en otros casos sobreviven por varios años particularmente en climas fríos. Las plantas que están estresadas por acceso de humedad o sequia son mas susceptibles a infección. El uso excesivo de fertilizantes nitrogenados incrementa la susceptibilidad y severidad de la enfermedad. *P. cinnamomi* puede sobrevivir como saprofita y hasta seis años en suelos húmedos. La defoliación es el síntoma característico. La enfermedad es más severa y se desarrolla mas rápidamente en suelos con mal drenaje, pH de 6.5 y 24°C promedio, y fácilmente se disemina por los zapatos, implementos o vehículos. Las clamidiosporas también se diseminan a través del paso por el tracto digestivo de pájaros y termitas, así como por el agua de lluvia y de riego. El daño radicular ocurre en raíces de tamaño menor a un lápiz, toman coloración negra y se necrosan. Las hojas de árboles infectados disminuyen de tamaño y se tornan de un color verde pálido a amarillento para finalmente defoliarse y producirse la muerte descendente de las ramas (6).

#### **2.2.4.C *Phytophthora capsici***

*P. capsici* fue descrita originalmente por Leonian (1922) como agente causal del tizón del chile en Nuevo México, Estados Unidos, y actualmente se conocen los daños que causa a muchas otras plantas, entre ellas berenjena, pimienta, cacao, tomate y muchas otras. Las enfermedades que causa incluyen tizón foliar, pudrición de frutos, de tallos y de raíces (6).

*P. capsici* posee esporangios en su mayoría papilados o semipapilados, que ocasionalmente tienen de 2 a tres ápices y su forma varía desde subesférica, ovoide, piriforme y sin forma, posee pedicelo elongado y los esporangios son caducos, produce clamidiosporas en abundante cantidad con diámetros de 28 a 29 $\mu$  y el micelio ocasionalmente presenta hinchamientos hifales (6).

La temperatura mínima de crecimiento es de 10<sup>0</sup>C y la óptima de 28<sup>0</sup>C pero no soporta más de 35 (6).

Entre las enfermedades causadas por *P. capsici* está el tizón y pudrición de corona y raíz en *Capsicum annum*, tizón en *Macadamia integrifolia*, pudrición de raíz y corona en *Lycopersicon esculentum*, pata negra en *Piper nigrum*, entre otras (6).

Ocasiona en plántulas mal del talluelo para luego ocasionar pequeñas manchas acuosas que rápidamente se elongan, el tejido infectado se torna seco y finalmente la planta muere.

Lluvias prolongadas o irrigación excesiva favorece la diseminación de la enfermedad.

*P. capsici* sobrevive en tejidos infectados de plantas que quedan en suelos húmedos pero no en suelos secos (6).

### **2.2.5 Técnicas de aislamiento y purificación de especies de *Pythium* y *Phytophthora*.**

El aislamiento de *Phytophthora* de tejidos infectados en descomposición es extremadamente difícil, pero puede ser exitoso si se emplean métodos especiales, como medios selectivos de cultivo tales como el PVP, conformado por harina de maíz agar (HMA) con la adición de los fungicidas pentacloronitrobenceno (PCNB) y pimaricina y el antibiótico vancomicina y el PAR, conformado por HMA, el fungicida pimaricina y los antibióticos ampicilina y rifampicina (Jeffers y Martin, 1986); también se puede adicionar himexazol (tachigaren), para evitar crecimiento de Oomycetes y Zygomycetes, principalmente *Pythium* y *Mortierella* (20).

También se han utilizado varios tipos de trampas para obtener *Phytophthora* del suelo y de tejido enfermo; en tales casos se han empleado frutos de manzana y pera, plántulas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.) y hojas de algunas variedades de durazno. Otros investigadores han utilizado tejido enfermo y suelo contaminado, introduciéndolo dentro de frutos de manzano por llenar los requerimientos de humedad, obscuridad y nivel de alimento necesario y obtienen *Phytophthora* de la pudrición generada (20).

La producción de esporangios y zoosporas es el principal medio para incrementar la cantidad de unidades infectivas y para propiciar una rápida regeneración de especies de *Phytophthora*. La esporulación, al menos en especies del suelo, requiere de un estricto control de las condiciones ambientales, la cual puede inducirse en medios naturales tales como agar o caldo de jugo V8 clarificado, medio de semilla de frijol y agar de semilla de cáñamo. También se han aplicado técnicas de lavado a través de papel filtro, clarificación de medios, centrifugación, inundación con agua destilada, lavados repetitivos y agitación permanente de caldos de cultivo, entre otros (20).

Método indirecto o trampa: La otra mitad de los trozos de tejido se introdujeron en orificios de 5 mm de diámetro y 30 mm de profundidad, hechos en frutos maduros de manzana Anna, luego se cubrieron con cinta de enmascarar y se dejaron a temperatura ambiente (20).

La muestra de suelo se tomó una porción que fue introducida en orificios hechos en frutos como ya se indicó; el resto del suelo se esparció en un recipiente de base ancha, formando una capa de 1 cm de altura, luego se colocó un fruto maduro de manzana variedad Anna, en posición horizontal y se le adicionó agua destilada hasta cubrir la mitad de este.

De las pudriciones obtenidas en los frutos se tomaron porciones de pulpa de 3-4 mm del borde de la lesión y se sembraron en medio selectivo similar al empleado en el método directo (19).

**Esporulación.** Aunque la literatura reporta el uso de técnicas complejas para obtener esporulación de especies de *Phytophthora*, se utilizó un procedimiento sencillo en el que se combinaron varias técnicas. Se vertieron 10 ml de agar jugo V8 compuesto de 200 ml de jugo V8 (Campbell Soup Co), 3g de CaCO<sub>3</sub>, 15g de agar y 800 ml de agua destilada, en cajas de Petri de 100 x 16 mm. Se sembró el hongo y se dejó a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que el micelio alcanzó el borde de la caja; después se inundó con 20 ml de agua destilada estéril y se dejó en presencia de luz fluorescente, a temperatura ambiente, durante 10 a 15 días (20).

### **2.2.6 Medios de cultivo para aislar y purificar especies de *Pythium* y *Phytophthora*.**

Existen muchos medios de cultivo para el aislamiento y purificación. Como se detalla en la parte de anexos, existen varios medios, específicos o selectivos y medios generales. La característica de los medios utilizados es que están en función del propósito perseguido. Es decir, para aislar específicamente un individuo, para hacerlo crecer, para hacer que produzca estructuras reproductivas, etc. (20).

El medio selectivo utilizado para aislar a *Pythium* y *Phytophthora* fue PARPB, que está preparado con Difco Corn Meal Agar, Pimaricina, Ampicilina, Rifampicina, Benomilo y Pentacloronitrobenzeno, adicionado con Hymexazol para aislar *Phytophthora* y sin él para aislar *Pythium*. (20)

Este medio es rico en carbohidratos y azúcares; los antibióticos que se adicionan evitan la contaminación bacteriana, así como fungicidas que evitan el crecimiento de otros hongos y levaduras. (20)

## 2.3 OBJETIVOS

### 2.3.1 General

Establecer la presencia de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* asociados a pudriciones radiculares y de tallo en hortalizas de exportación en el departamento de Chimaltenango.

### 2.3.2 Específicos

1. Establecer un protocolo para la detección, muestreo y aislamiento de *Phytophthora sp* y *Pythium sp*.
2. Establecer un protocolo de pruebas de patogenicidad para el género *Pythium* y *Phytophthora sp*
3. Determinar la patogenicidad del género *Pythium* en hortalizas de exportación a través de bioensayos en el departamento de Chimaltenango.

## 2.4 Metodología

### 2.4.1 Plan de muestreo

#### 2.4.1.A Población objetiva

El muestreo se enfocó a productores de hortalizas de exportación de mayor importancia económica en el departamento de Chimaltenango, asociados a las cooperativas Cuatro Pinos y Labradores Mayas.

#### 2.4.1.B Tipo de muestreo

Para esta investigación se tomó una muestra no probabilística, es decir, una muestra dirigida, ya que se seleccionaron las plantas según los requerimientos (pudriciones de tallo y raíz). La "muestra dirigida" que se llevó a cabo se decidió con el objetivo de buscar aquellas plantas que presentaban la sintomatología ocasionada por enfermedades provocadas por especies de los géneros de *Pythium* y *Phytophthora*, se tomaron muestras de plantas con síntomas y se trasladaron al laboratorio para su análisis.

#### 2.4.1.C Unidad de muestreo

La unidad de muestreo la conformó una parcela cultivada con uno o más cultivos hortícolas de exportación de interés.

#### 2.4.1.D Muestra

La muestra consistió en una o varias plantas completas junto al suelo de la rizósfera que presentaron la sintomatología de las enfermedades causadas por los géneros de *Phytophthora* y *Pythium*.

#### 2.4.1.E Fase de campo

Se realizaron muestreos en las áreas representativas de cada uno de los cultivos a estudiar durante la época seca (febrero a abril) y la época lluviosa (mayo a noviembre),

el período de mayor intensidad de la presencia de los Oomycetes. Para lo cual se necesito contar con el equipo mínimo para el muestreo que incluye palas, rastrillos, tijeras, navaja, así como bolsas de polietileno para empacar las plantas y etiquetas o marcador indeleble para identificarlas; y una hielera para la conservación de las mismas durante el traslado al laboratorio.

Se hizo uso de una libreta de campo en donde se llevó un registro en el cual se detallo localización georeferenciada de la parcela, cultivo al que esta dedicado y numero de muestras colectadas en el lugar.

Se tomó fotografías en el lugar del muestreo para obtener la mayor cantidad de información

#### **2.4.1.F Selección de los puntos de muestreo**

a. Se recorrió las parcelas en busca de puntos en los cuales se observaron depresiones en el cultivo, es decir se buscaron aquellos lugares en los cuales el cultivo presentó menor desarrollo o muerte de plantas (fig. 2.6). Dado que *Phytophthora* y *Pythium* son hongos acuáticos se debió poner atención a los puntos más bajos de las parcelas, así como a aquellas áreas en las cuales hubo encharcamientos.



Figura 2.6 Puntos de depresión en parcelas productoras de hortalizas.

- b. La identificación dependió del material vegetal enfermo por lo que se debió observar características vasculares, podredumbres radicales y del cuello (fig. 2.7 y 2.8).



Figura 2.7 Decoloración anormal en tejido radical



Figura 2.8 Desarrollo radical deficiente y podredumbre del tallo observado en una planta de chile pimiento

#### **2.4.1.G Toma de muestras**

Por tratarse de enfermedades localizadas en el sistema radicular y partes basales del tallo, fue necesaria la toma de muestra de toda la planta, incluyendo rizósfera y el suelo adyacente. En el caso de semilleros y plántulas de vivero, fue necesario coleccionar las plántulas y el substrato donde se desarrollan. (fig. 2.9)



Figura 2.9 Muestra vegetal de lechuga para aislamiento de *Phytophthora* y *Pythium*

#### **2.4.1.H Traslado de las muestras del campo al laboratorio**

Las muestras colectaron con cuidado y fueron introducidas en bolsas de polietileno o papel de empaque, identificadas con algún código fácil de identificar y colocadas adecuadamente en el recipiente térmico, preferiblemente utilizando bolsas de gel congelada para mantener una temperatura de 4° C.

#### **2.4.2 Fase de laboratorio**

##### **A. Lavado de las Muestras**

El primer paso en el laboratorio fue el lavado de las muestras vegetales.

- a. Se separó el suelo de la raíz sobre papel periódico. Este proceso debió realizarse lo más cuidadoso posible de modo de no separar también las raicillas que pueda aun tener la muestra, ya que son estos tejidos los que afecta *Phytophthora* y *Pythium*.
- b. Una vez separado el suelo de la planta este se reservó para aislar *Phytophthora* y *Pythium* en una bolsa debidamente identificado con los datos procedentes del campo.

- c. Se lavaron las plantas con agua corriente con el fin de eliminar completamente cualquier residuo de suelo que se encuentre en las raíces.
- d. Por último se lavó la planta con agua destilada y dejó secar sobre papel absorbente por 30 minutos.

## **B. Selección del material vegetal**

Una vez eliminado el exceso de humedad a las muestras de plantas se procedió a separar el material con el cual se trabajó el aislamiento de *Phytophthora* y *Pythium* de la siguiente manera:

### **a. Raíz**

- Se buscaron entre las raíces aquellas que muestren necrosis o pudrición y se separaron del resto.
- Se cortaron las raíces con ayuda de un bisturí para conservar pequeños trozos de 3 mm, estas porciones debieron ser tomadas de las raíces mas finas y en las partes en donde estas se bifurquen para formar otra raíz, pues es entre estas áreas en donde se encuentra mas concentrado el inóculo.
- Reservar parte de las raíces que no se separaron en una caja de petri.

### **b. Tallos**

- Se cortó con ayuda de un bisturí porciones del tallo longitudinales en la zona de avance de la enfermedad, tomando tanto tejido infectado como tejido sano.
- El tamaño de las porciones usadas para siembra en medio PARBP fueron trozos u hojuelas de 2 a 3mm de diámetro.

### **2.4.2.A Aislamiento de Pythium y Phytophthora**

#### **A. Aislamiento del suelo método del cultivo trampa:**

- a. Se homogenizó la muestra de suelo para que los análisis fueran representativos.
- b. Se utilizaron manzanas verdes maduras de la variedad Granny Smith o Anna, se abrieron cuatro perforaciones equidistantes formando agujeros de 1.5 cm de diámetro (Fig. 2.10A).
- c. Se rellenaron los agujeros con 5 a 10 gr. de suelo (Fig. 2.10B).
- d. Con una pizeta se le agregaron de 1 a 2 cc de agua destilada.
- e. Se colocó el trozo de fruta que se retiró en el agujero y se cubrió con cinta adhesiva (Fig. 2.10C y 2.10D).
- f. Se identificó y se dejó a temperatura ambiente durante 72 horas hasta que se observaron las lesiones. Estas lesiones se manifestaron como una pudrición blanda alrededor del área inoculada con el suelo. (Fig. 2.10E)



Figura 2.10 Método de cultivo trampa para aislamiento de *Phytophthora* y *Pythium*.

**A** Apertura de perforaciones en manzana para inocular suelo infectado con *Phytophthora* y *Pythium*; **B** Inoculación del suelo infectado en manzana; **C** Se cierran las perforaciones de la manzana con el mismo trozo de fruta que se retiró; **D** Se sellan los orificios de la manzana inoculada con cinta adhesiva; **E** Se identifica y se deja a temperatura ambiente; **F** Manzana inoculada con suelo que presenta la pudrición característica por infección *Phytophthora* y *Pythium*.

g. Los frutos que dieron positivo a la presencia de oomicetes fueron procesados de la siguiente forma:

- Se limpió y desinfectó la mesa de trabajo, primero con alcohol al 95% y luego con alcohol al 70%, se colocaron 3 mecheros de gas o alcohol a una distancia prudente del área en la cual se trabajó.
- Se tomó cada una de las manzanas inoculadas con suelo y sobre papel absorbente se retiró la cinta adhesiva (Fig. 2.11A).

- Con ayuda de una navaja se partió cada una de las manzanas en cuatro porciones iguales (Fig. 2.11B).
- Con una pinza, bisturí o aguja de disección se cortaron trozos de 2 a 3 mm diámetro del tejido interno de la manzana, en las zonas de avance de la pudrición, tomando tanto tejido enfermo como sano (Fig. 2.11C).
- Se sembraron de 6 a 9 trozos en una caja de Petri conteniendo el medio selectivo PARBP para aislar especies de *Pythium* y PARBPH con el objeto de aislar especies de *Phytophthora* (Fig. 2.11E).

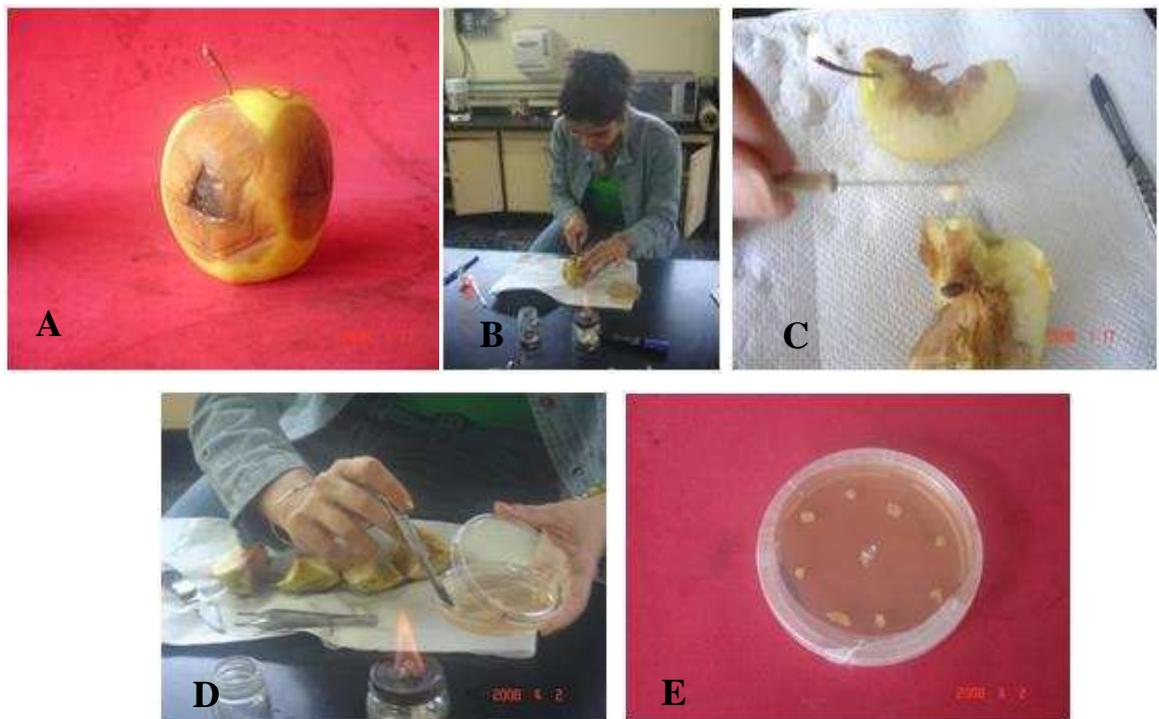


Figura 2.11 Siembra en medio semiselectivo con suelo infectado.

**A** Manzana inoculada con suelo que presenta la pudrición característica por infección de *Phytophthora* y *Pythium* **B** Con ayuda de una navaja se partió cada una de las manzanas en cuatro porciones iguales; **C** Con una pinza, bisturí o aguja de disección se cortaron trozos de 2 a 3 mm diámetro del tejido interno de la manzana, en las zonas de avance de la pudrición; **D** Se sembró de 6 a 9 trozos en una caja de Petri conteniendo el medio selectivo PARBPH. **E** Caja de petri con medio selectivo PARBPH en la cual se realizó la siembra de trozos de manzana infectadas con *Phytophthora* y *Pythium*

h. Se incubó a temperatura ambiente durante una semana revisando periódicamente el crecimiento miceliar.

### **B. Aislamiento a partir de tejido vegetal**

a. Sobre la mesa de trabajo previamente desinfectada con alcohol al 95% y luego con alcohol al 70%, se colocaron 3 mecheros de gas o alcohol a una distancia prudente del área en la cual se trabajó.

b. Se preparó los tallos y raíces con sintomatología de necrosis debidamente lavados y secos cortándolos en pequeñas porciones o trozos.

c. Los tejidos seleccionados fueron pasados por una batería de desinfección preparada con alcohol al 70% y agua destilada estéril.

- Utilizando una pinza se introdujo los trozos de tallo o raíz en un vidrio de reloj con alcohol y dejaron sumergidos por 20 segundos.
- Se lavaron los trozos con el agua destilada estéril contenida en un segundo vidrio.
- Para eliminar completamente cualquier residuo se trasladaron los trozos a un tercer vidrio con agua destilada estéril.
- Luego de pasar por el proceso de desinfección y lavado se sacaron los tejidos de la muestra y se colocaron sobre papel absorbente para eliminar el exceso de agua.

d. Se sembraron de 6 a 9 trozos de tallo o raíz en cajas Petri que contenían el medio selectivo PARBP

e. Los medios de cultivo se incubaron a temperatura ambiente y se revisó periódicamente el desarrollo miceliar.

### C. Siembra Indirecta con Solución de Suelo

- a. En un erlenmeyer de 1000cc colocaron 50 gr. de suelo y aforó, se mezcló bien y se dejó reposar durante 24 horas.
- b. Luego de este periodo se extrajo 50cc. de la solución de suelo, se colocó en otro erlenmayer de 2000cc y se aforó a 1000cc con agua destilada. Se esterilizó en el autoclave a 121<sup>0</sup>C durante 15 minutos y se dejó enfriar antes de ser utilizado (Fig. 2.12).
- c. Se colocaron las semillas de las manzanas que dieron positivo a la presencia de *Pythium* y *Phytophthora* en cajas de petri llenándola con la solución de suelo (Fig. 2.13).
- d. Se cortaron trozos de raíces y tallos con síntomas de necrosis de 3 x 3 cm y se colocaron dentro de cajas de petri llenándola con la solución de suelo tratando de exponer la mayor área posible.
- e. Se identificaron y se dejaron a temperatura ambiente revisando periódicamente el desarrollo miceliar. iluminado con luz natural indirecta, por un periodo de 24 a 48 horas. Si *Phytophthora* o *Pythium* estaban presentes desarrollaron un micelio visible en el estereoscopio.
- f. Una vez producido el micelio en las muestras se procedió a tomar porciones de este con ayuda de una aguja de disección y a sembrarse en el medio selectivo PARBP con y sin himexasol.
- g. Se incubó por 24 a 72 horas revisando periódicamente el desarrollo miceliar.



Figura 2.12 Solución de suelo estéril para inducción de micelio en muestras vegetales

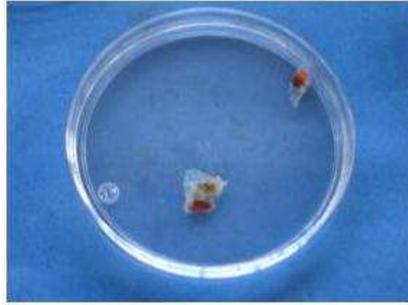


Figura 2. 13 Semillas con micelio producto de la infección zoosporas de *Phytophthora*.

#### 2.4.2.B Reaislamientos

Obtenidas las colonias de *Pythium* y *Phytophthora* en el medio selectivo PARBP, se reislaron en medio agar papa dextrosa (PDA) colocando un disco de 5 mm en medio de la placa con el objeto de observar y documentar los patrones de crecimiento característico de cada especie (petaloide, rosáceo, radiado, estolonífero, etc. (fig. 2.14)) y su conservación. Simultáneamente se realizaron siembras en agar V8, para estimular la producción de estructuras sexuales y asexuales.

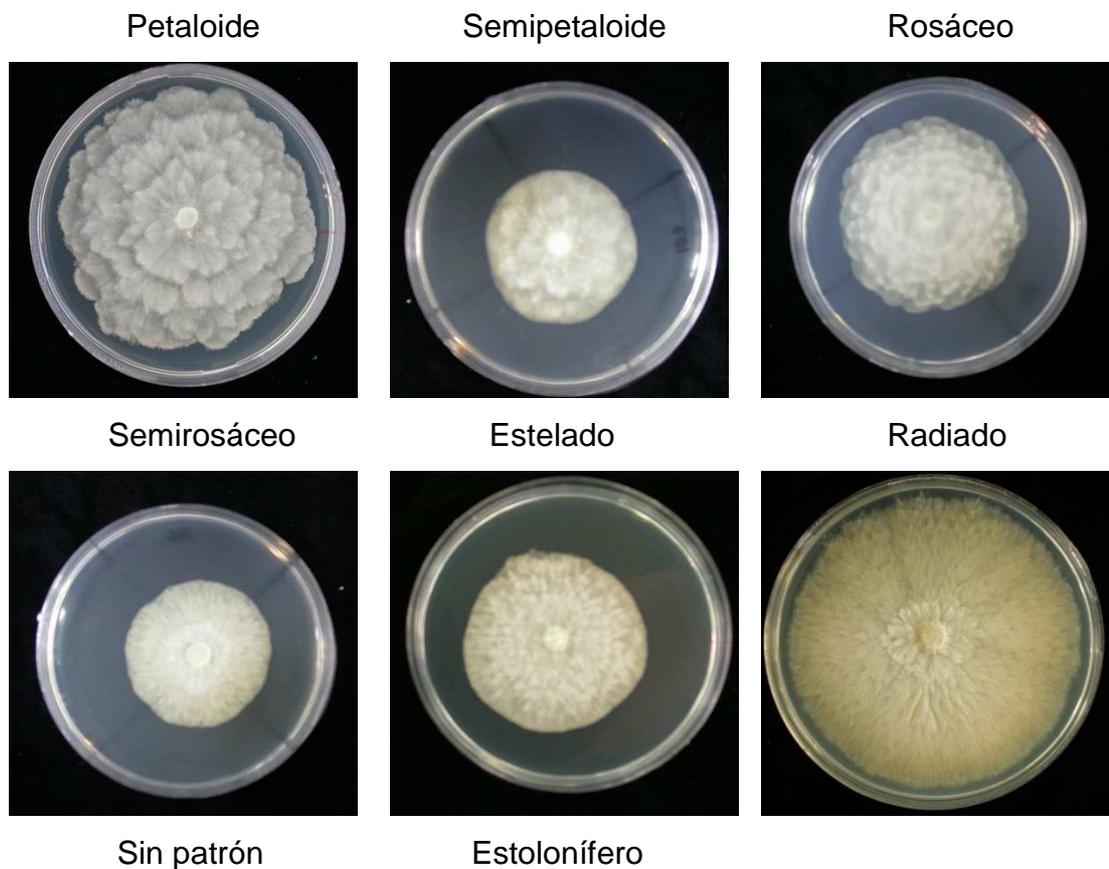




Figura 2.14 Descripción pictográfica de las características de crecimiento para identificar especies de *Phytophthora* desarrolladas en medio PDA según Edwin y Riveiro (7)

#### 2.4.2.C Conservación de los reislamientos

*Pythium* y *Phytophthora* son muy sensibles a los cambios de temperatura por lo tanto no deben mantenerse a temperaturas menores de 20 y no mayores de 25°C, aunque hay especies que deben mantenerse a temperaturas menores para un mejor desarrollo.

A. Se preparó el medio para la conservación de los aislamientos de la siguiente manera:

- En un recipiente plástico se mezcló dos partes de turba con una parte de arena y una parte de jugo de vegetales (V8).
- La mezcla se colocó en frascos de compota y se sellaron con papel parafilm y papel aluminio.
- se esterilizó una vez al día por tres días consecutivos con el objetivo de eliminar cualquier microorganismo presente en la mezcla.

B. Se seleccionaron los aislamientos puros, es decir aquellos que no presentaban ningún tipo de agente ajeno a *Pythium* o *Phytophthora*.

C. Una vez seleccionadas las cepas se procedió a conservarlas de la siguiente manera:

- Se cortaron pequeños discos de agar de 0.5 cm de diámetro en la zona de desarrollo miceliar de cada una de las cepas seleccionadas
- Dentro de la campana de flujo laminar se introdujeron los discos en un frasco de compota con la mezcla estéril.
- Se sellaron con tapas de papel parafilm y papel aluminio y se identificó cada uno de los frascos con el código de la cepa original.
- Los aislados se conservan dentro de un locker a temperatura ambiente (Fig. 2.15)



Figura 2.15 Conservación de cepas de *Pythium* y *Phytophthora*.

#### 2.4.2.D Pruebas de patogenicidad para *Pythium*

En el caso del genero *Pythium*, todos los aislamientos provenientes de los muestreos fueron sometidos a prueba de Patogenicidad para comprobar si dichos aislamientos corresponden a especies patógenas de los cultivos con síntomas de los que fueron sujeto de muestreo, de donde procede la muestra de suelo de donde se aislaron inicialmente. Para tal efecto, se procedió a obtener plantas sanas de la misma especie de todas y cada una de las que durante el proceso de muestreo dieron positivo para la presencia de dicho agente y se procedió a inocular a cada especie con el agente respectivo originado del aislamiento del muestreo inicial.

Para ello fue necesario preparar inóculo de los aislamientos iniciales en medio básico Agar vómito y plántulas sanas de cada una de las especies de donde se originaron los aislamientos.

Para dicho efecto se utilizaron, manzanas verdes, cajas para camisa plásticas y transparentes, cajas de Petri, agua destilada, semilla de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), arveja china (*Pisum sativum*), Lechuga (*Lactuca sativa* L.), brócoli (*Brassica oleracea* L), chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) y repollo (*Brassica oleracea* var. *Viridis*). para la obtención de plántulas, bandejas piloneras de plástico de 400 plántulas, macetas de ½ galón (14 cm. De diámetro), sustrato estéril para germinación, sustrato estéril para trasplante, cinta adhesiva transparente, bolsas plásticas de 2 libras para colecta de muestras, cinta selladora Parafilm, hielera, regadera y cámara fotográfica.

#### **A. Obtención y propagación del inóculo de *Pythium* y *Phytophthora***

- a. Se reaisló en agar vómito (AV) las cepas de *Pythium* que se obtuvieron de las placa madre de PARPB.
- b. Se procedió a inocular el aislamiento a plantas sanas.

#### **B. Obtención de plántulas sanas para prueba de patogenicidad**

- a. Se utilizaron semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), arveja china (*Pisum sativum*), Lechuga (*Lactuca sativa* L.), brócoli (*Brassica oleracea* L), chile pimiento (*Capsicum annuum* L.) y repollo (*Brassica oleracea* var. *Viridis*). para la obtención de plántulas.
- b. Se colocaron semillas en doble postura en bandejas piloneras en sustrato estéril y fueron regadas dos veces al día con agua desmineralizada (Fig. 2.16).



Figura 2.16 Bandejas con sustrato especial para pilones a utilizar en el bioensayo.

- c. Una vez germinadas las semillas se trasladaron las bandejas a un invernadero.
- d. Se procedió a inocular el patógeno en la plántula al aparecimiento de las primeras hojas verdaderas, seleccionando las plántulas que presenten mejor crecimiento y condiciones en general (Fig. 2.17).



Figura 2.17 Plántulas para ser inoculadas con las cepas de *Pythium*.

### C. Inoculación de la cepa de *Pythium* y *Phytophthora* a las plántulas.

- a. Ya enraizadas las plántulas, se trasladaron en macetas conteniendo sustrato estéril (turba + vermiculita) y el inóculo de *Pythium* en agar vómito (AV), a razón de 3% del volumen total del sustrato. Se sembraron 10 plántulas en cada maceta y cada tratamiento consistió de 1 maceta inoculada con aislamiento de *Pythium* obtenido y una maceta testigo (Fig. 2.18).



Figura 2.18 Siembra de 10 plántulas en cada maceta.

- b. Se colocaron las macetas en invernadero ubicado en el Centro Experimental Docente de Agronomía (fig. 2.19), se regó con agua estéril 2 veces al día a capacidad de campo.



Figura 2.19 Pruebas de patogenicidad de cepas de *Pythium*, Centro Experimental Docente de Agronomía.

- c. Se evaluó el desarrollo final de las plántulas a los 20 días después de la inoculación, según la severidad del daño ocasionado, con el siguiente criterio:
  - Planta sana.
  - Planta que presentaba la sintomatología de *Pythium* en tallo y/o raíz.

**D. Aislamiento del patógeno proveniente de las pruebas de patogenicidad para su verificación.**

Se procedió a inocular y purificar el agente patógeno causante del daño de la manera siguiente:

- a. Se Homogenizó el sustrato proveniente de cada tratamiento que haya presentado la sintomatología ocasionada por *Pythium*.
- b. Se procedió a aislar el patógeno del sustrato de cada tratamiento con sospecha de infección por *Pythium*.
- c. Se realizaron montajes de los aislamientos y se observaron en microscopio para confirmar que se trataba del mismo agente patógeno que causó el daño originalmente.

**2.4.3 Análisis de la Información**

- A. Presentación de cuadros de descripción, localización, sintomatología, cultivo hospedante, georeferenciación, etc.
- B. Presentación de mapas de ubicación de los agentes fitopatógenos en cuestión, en el departamento de Chimaltenango.
- C. Descripción en cuadros y registro fotográfico de los géneros encontrados tanto en los muestreos realizados como en las pruebas de patogenicidad para el género *Pythium* hortalizas de exportación.

## 2.5 Resultados y Discusión

Se obtuvo 109 muestras para su análisis en el departamento de Chimaltenango, en los municipios de Patzicia, Técpán, Zaragoza, El tejar, Parramos, Comalapa, en donde se encuentran concentrados el mayor número de productores de hortalizas. Los cultivos bajo estudio hortalizas de exportación entre las que predominaron ejote (*Phaseolus vulgaris* L.), arveja china (*Pisum sativum*), Lechuga (*Lactuca sativa* L.), brócoli (*Brassica oleracea* L), chile pimiento (*Capsicum annum* L.) y repollo (*Brassica oleracea* var. *Viridis*).

El cuadro 2.7 muestra que de los 109 aislamientos se obtuvo que 46 de ellos fueron positivos a la presencia de oomycetes, en 42 de ellos de aisló *Pythium* y en 4 *Phytophthora*.

Cuadro 2.7 Áreas de muestreo y cultivos con presencia de *Pythium* y *Phytophthora*

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA	PATÓGENO AISLADO
1	Técpán	Lechuga	15p 0718703 1625674	Pythium
4	Técpán	Arveja china	15p 0718703 1625674	Pythium
6	Zaragoza	Repollo	15p 725734 1619289	Pythium
7	Zaragoza	Lechuga	15p 725734 1619289	Pythium
9	Zaragoza	Brócoli	15p 725734 1619289	Pythium
13	Zaragoza	Brócoli	15p 725734 1619289	Pythium
14	Zaragoza	Arveja china	15p 725734 1619289	Pythium
24	Tululchè Zaragoza	Arveja china	15p 727367 1628746	Pythium
25	Tululchè Zaragoza	Arveja china	15p 727367 1628746	Pythium
30	Valle de Patzicia	Lechuga	N 14°38'41.1'' S 90° 55'51,5''	Pythium
31	Valle de Patzicia	Lechuga	15p 723120 162006	Pythium
32	Valle de Patzicia	Lechuga	15p 723066 1620892	Pythium
34	Valle de Patzicia	Ejote	15p 720317 1625117	Pythium
37	El Tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium
38	El Tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium
45(p6p2)	Rincón	Fresa	N 14°40'41.7'' S 90°53'48,5 ''	Phytophthora sp.
51 (p7p4)	Patzicia	Fríjol	N 14°38'41.1'' S 90°55' 51,5''	Pythium
54 (31)	El tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium sp, Phytophthora capsici
55 (32)	El tejar	Tomate	15p 740597 1619506	Phytophthora cinnamomi
59(36)	Patzicia	Papa	15p 719733 1621024	Pythium sp
60 (37)	Choycoc	Fríjol	15p 710117 1621385	Pythium sp

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA		PATÓGENO AISLADO
61 (38)	Sumpango	Chile Pimiento	15p 742291	1618903	Pythium sp
63	Técpan	Arveja china	15p 718880	1625469	Pythium
64	Técpan	Lechuga	15p 718880	1625469	Pythium
65	Técpan	Lechuga	15p 0718703	1625674	Pythium
66	Técpan	Brócoli	15p 0718703	1625674	Pythium
71	Zaragoza	Brócoli	15p 725850	1618671	Pythium
72	Zaragoza	Repollo	15p 726297	1618528	Pythium
73	Zaragoza	Repollo	15p 725826	1618687	Pythium
76	Comalapa	Arveja china	15p 726340	1616229	Pythium
77	Comalapa	Arveja china	15p 726340	1616229	Pythium
78	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308	1621680	Pythium sp, Phytophthora capsici
79	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308	1621680	Pythium sp
84	Santa Cruz Balanyá	Lechuga	15p 721577	1626364	Pythium sp
85	Santa Cruz Balanyá	Lechuga	15p 721844	1626807	Pythium sp
86	Santa Cruz Balanyá	Brócoli	15p 72258	1626118	Pythium sp
87	Patzicia	Lechuga	15p 722975	1619723	Pythium sp
88	Patzicia	Arveja China	15p 723090	1621010	Pythium sp
91	Parramos	Fríjol	15p 738388	1617390	Pythium sp
92	Parramos	Fríjol	15p 738388	1617390	Pythium sp
96	Patzicia	Papa	15p 722305	1620738	Pythium sp
99	Patzicia	Brócoli	15p 721749	1621516	Pythium sp
100	Patzicia	Repollo	15p 721096	1623878	Pythium sp
102	Patzicia	Brócoli	15p 722308	1619121	Pythium sp



Cuadro 2.8 Áreas de muestreo y cultivos con presencia de *Phytophthora* sp.

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA		PATÓGENO AISLADO
54	El tejar	Chile Pimiento	15p 740597	1619506	<i>Phytophthora capsici</i>
55 (32)	El tejar	Tomate	15p 740597	1619506	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
78	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308	1621680	<i>Phytophthora capsici</i>
79	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308	1621680	<i>Phytophthora capsici</i>

### 2.5.1 Descripción de las especies de *Phytophthora* encontradas en los municipios de El Tejar y Comalapa, departamento de Chimaltenango

#### 2.5.1.A *Phytophthora capsici*

Se determinó la presencia de *P. Capsici* en tres muestras de suelo provenientes de los municipios de El tejar y Comalapa en el cultivo de Chile Pimiento (*Capsicum annuum* L.) (Cuadro 2).

Según el CPC 2007 (3) *P. capsici* está reportada para especies de solanáceas, cucurbitáceas, algunas plantas ornamentales tales como clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), así como para algunos cultivos perennes arbóreos entre los que se encuentran: hule (*Hevea brasiliensis*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), cacao (*Theobroma cacao*) y pimienta (*Pipper nigrum*). Por lo que no sorprendió la presencia de *P. capsici* parasitando el cultivo de chile pimiento (*Capsicum annum*) ya que este es uno de sus hospederos principales.

#### A. Síntomas ocasionados por *P. capsici* en el cultivo de chile pimiento

Los síntomas visibles a nivel de campo provocados por *P. capsici* fueron marchitez rápida e irreversible (Fig. 2.21) se observaron lesiones oscuras en el cuello del tallo que se extienden rápidamente, el tejido infectado se seca. El sistema radicular también se vio afectado y se manifestó con un pobre desarrollo, podredumbre o ausencia total de raíces secundarias (Fig. 2.22). En los frutos se observaron coloraciones anormales, podredumbre tanto del tejido del mesocarpio del fruto como de las semillas. Debido a esta sintomatología se conoce a la enfermedad ocasionada por *P. capsici* como tristeza o marchitez del chile.



Figura 2.21 Marchitez y desarrollo deficiente en chile pimiento provocado por *P. capsici*



Figura 2.22 Lesiones en el cuello del tallo y deficiente desarrollo radicular provocado por *P. capsici* en el cultivo de chile pimiento.

#### **B. Descripción de los aislados de *P. capsici* obtenidos en el cultivo de chile pimiento**

Según Erwin, D. y Ribeiro, O. (9) los esporangios de *P. capsici* son la mayoría papilados, pero en algunos casos se muestran semipapilados, ocasionalmente los esporangios pueden tener dos o tres ápices. La forma de los esporangios pueden ser de forma subesféricos, ovoides, elipsoides o tener formas distorsionadas, sin embargo los esporangios observados en los aislamientos realizados de las muestras provenientes del departamento de Chimaltenango mostraron ser limoniformes (fig. 2.23).



Figura 2.23 Esporangios limoniformes de *P. capsici*.

Fotografía Dr. Luis Álvarez

### 2.5.1.B *Phytophthora cinnamomi*

Se determinó la presencia de *P. cinnamomi* en el municipio de El tejar en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*) (cuadro 2). Cabe destacar que *P. cinnamomi* esta reportada en cultivos tales como: piña (*Ananas comosus*), kiwi (*Actinidia deliciosa*), aguacate (*Persea americana*), canela (*Cinnamomum verum*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), ciruela japonesa (*Prunus salicina*), pino (*Pinus radiata*) y laurel (*Laurus nobilis* L.) los cuales se reportan como hospederos principales (6), pero no se encontró literatura que respaldara o reportara a *P. cinnamomi* como patógeno del cultivo de tomate, sin embargo en las muestras obtenidas en el departamento de Chimaltenango de este cultivo se observaron síntomas que condujeron a tomar la muestra dando como resultado el aislamiento de este patógeno.

#### a. Síntomas observados en el cultivo de tomate

Los síntomas observados fueron principalmente amarillamiento y acoloramiento de las hojas, al evolucionar la enfermedad, las plantas mostraban marchitez y pérdida del follaje (Fig. 2.24), las raíces presentaban una coloración oscura y eran quebradizas, en casos muy avanzados no existía sistema radicular.



Figura 2.24 Depresión en el cultivo de tomate.

### B. Descripción de los aislados de *P. cinnamomi* obtenidos en el cultivo de tomate

El micelio de los aislados estudiados presentó hifas coraloides en y abundantes hifas hinchadas y clamidosporas. Los esporangios de todos los aislados eran de forma elipsoidal u ovoide, no papilados o semipapilados y no caducos, con proliferación interna (Fig. 2.25). El anterido anfigino, unicelular y con forma esférica, el oogonio esférico y las oosporas pleróticas (6).

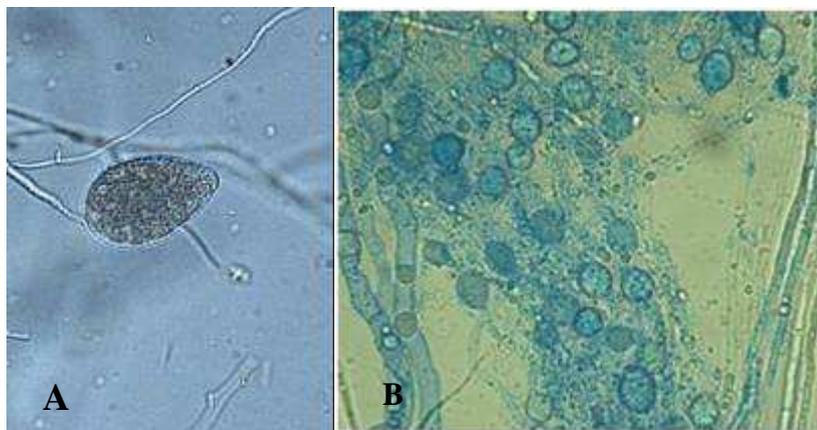


Figura 2.25 A Esporangios de *P. cinnamomi* forma elipsoidal u ovoide. B. Esporangios no papilados o semipapilados y no caducos *P. cinnamomi*.

### C. Bioensayo para *Phytophthora cinnamomi*

Se determino la presencia de *P. cinnamomi* en la muestra de suelo 55 (32) obtenida del municipio de El Tejar departamento de Chimaltenango, dado que dicha muestra correspondía a una plantación de tomate (*Lycopersicum esculentum*) y no se encontró literatura que respaldara que *P. cinnamomi* fuera un agente causal de enfermedades en dicho cultivo, se procedió a realizar una prueba de patogenicidad con la cepa aislada, con base a la metodología para pruebas de Patogenicidad citadas en el inciso 6.3.6. (fig. 2.26).

El bioensayo indico que *P. cinnamomi* no era el agente causal de la enfermedad cuya sintomatología fue observada a nivel de campo y que condujeron a tomar la muestra para ser analizada ya que dichos síntomas no se presentaron en las plántulas inoculadas, por lo que podemos concluir que posiblemente se encontraban estructuras de conservación de dicho patógeno tales como oosporas o clamidiosporas presentes en el suelo debido a la posibilidad de que anteriormente se encontrara en dicha área algún otro cultivo hospedero, como por ejemplo aguacate (*Persea americana*), o bien haya llegado por los medios usuales de dispersión del hongo. Las clamidiosporas también se pudieron diseminar a través del paso por el tracto digestivo de pájaros y termitas, así como por el agua de lluvia y de riego.



Figura 2.26 Bioensayo de *P. cinnamomi* en plantas de tomate.

## 2.5.2 Descripción de los aislamientos *Pythium ultimum* encontrados en el departamento de Chimaltenango.

De las 109 muestras obtenidas para el efecto de esta investigación, se aisló *Pythium sp.* en 42 de ellas, localizadas principalmente en los municipios de Tecpan, Zaragoza, Patzicia, El Tejar, Sumpango, Santa Cruz Balanyá y Comalapa (Cuadro 2.9).

El cuadro 2.9 muestra la localidad, cultivo y localización geoposicionada de los puntos de muestreo en los cuales se obtuvieron los aislamientos de *Pythium*.

Cuadro 2.9 Áreas de muestreo y cultivos con presencia de *Pythium sp.*

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA	PATÓGENO AISLADO
1	Tecpan	Lechuga	15p 0718703 1625674	Pythium sp
4	Tecpan	Arveja china	15p 0718703 1625674	Pythium sp
6	Saragoza	Repollo	15p 725734 1619289	Pythium sp
7	Saragoza	Lechuga	15p 725734 1619289	Pythium sp
9	Saragoza	Brocolí	15p 725734 1619289	Pythium sp
13	Saragoza	Brocolí	15p 725734 1619289	Pythium sp.
17	Saragoza	Arveja china	15p 725734 1619289	Pythium sp.
24	Tululchè Saragoza	Arveja china	15p 727367 1628746	Pythium sp
25	Tululchè Saragoza	Arveja china	15p 727367 1628746	Pythium sp
30	Valle de Patzicia	Lechuga	N 14°38'41.1" S 90° 55'51,5"	Pythium sp
31	Valle de Patzicia	Lechuga	15p 723120 162006	Pythium sp
32	Valle de Patzicia	Lechuga	15p 723066 1620892	Pythium sp
34	Valle de Patzicia	Ejote	15p 720317 1625117	Pythium sp
37	El Tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium sp
38	El Tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium sp
51 (p7p4)	Patzicia	Frijol	N 14°38'41.1" S 90°55' 51,5"	Pythium sp
54	El tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium sp
59 (36)	Patzicia	Papa	15p 719733 1621024	Pythium sp
60	Choycoc	Frijol	15p 710117 1621385	Pythium sp
61	Sumpango	Chile Pimiento	15p 742291 1618903	Pythium sp
63	Tecpán	Arveja china	15p 718880 1625469	Pythium sp
64	Tecpán	Lechuga	15p 718880 1625469	Pythium sp
65	Tecpán	Lechuga	15p 0718703 1625674	Pythium sp
66	Tecpán	Brócoli	15p 0718703 1625674	Pythium sp
71	Saragoza	Brócoli	15p 725850 1618671	Pythium sp
72	Saragoza	Repollo	15p 726297 1618528	Pythium sp
73	Saragoza	Repollo	15p 725826 1618687	Pythium sp
76	Comalapa	Arveja china	15p 726340 1616229	Pythium sp
77	Comalapa	Arveja china	15p 726340 1616229	Pythium sp

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA		PATÓGENO AISLADO
78	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308	1621680	Pythium sp
79	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308	1621680	Pythium sp
84	Santa Cruz Balanyá	Lechuga	15p 721577	1626364	Pythium sp
85	Santa Cruz Balanyá	Lechuga	15p 721844	1626807	Pythium sp
86	Santa Cruz Balanyá	Brócoli	15p 72258	1626118	Pythium sp
87	Patzicia	Lechuga	15p 722975	1619723	Pythium sp
88	Patzicia	Arveja China	15p 723090	1621010	Pythium sp
91	Parramos	Frijol	15p 738388	1617390	Pythium sp
92	Parramos	Frijol	15p 738388	1617390	Pythium sp
99	Patzicia	Brócoli	15p 721749	1621516	Pythium sp
100	Patzicia	Repollo	15p 721096	1623878	Pythium sp
102	Patzicia	Brócoli	15p 722308	1619121	Pythium sp
103	Patzicia	Brócoli	15p 722308	1619121	Pythium sp

Los aislamientos fueron enviados a la Universidad Politécnica de Valencia, España, para su análisis por medios morfomoleculares, y se comprobó que de los 42 aislados de *Pythium* obtenidos solamente 8 eran fitopatógenos, siendo *P. ultimum* el agente causal de la enfermedad. (Cuadro 2.10)

El cuadro 2.10 muestra el cultivo y la localización geoposicionada de las zonas de muestreo de donde se aisló *Pythium ultimum*.

Cuadro 2. 10 Áreas de muestreo y cultivos con presencia de *P. ultimum*.

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA		PATÓGENO AISLADO
4	Saragoza	Arveja china	718703	1625674	<i>Pythium ultimum</i>
17	Saragoza	Arveja china	725734	1619289	<i>Pythium ultimum</i>
24	Tululchè Saragoza	Arveja china	727367	1628746	<i>Pythium ultimum</i>
25	Tululchè Saragoza	Arveja china	727367	1628746	<i>Pythium ultimum</i>
59(36)	Patzicia	Papa	719733	1621024	<i>Pythium ultimum</i>
76	Comalapa	Arveja china	726340	1616229	<i>Pythium ultimum</i>
77	Comalapa	Arveja china	726340	1616229	<i>Pythium ultimum</i>
88	Patzicia	Arveja China	723090	1621010	<i>Pythium ultimum</i>

Según el CPC 2007 (3) los hospederos principales de *Pythium ultimum* son: remolacha (*Beta vulgaris*), repollo (*Brassica oleracea var. capitata*), chile (*Capsicum*), azafrán (*Carthamus tinctorius*), garbanzo (*Cicer arietinum*), pepino (*Cucumis sativus*), zanahoria (*Daucus carota*), fresa (*Fragaria*), Soya (*Glycine max*), algodón (*Gossypium*), girasol

(*Helianthus annuus*), lechuga (*Lactuca sativa*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), manzana (*Malus domestica*), arroz (*Oryza sativa*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), Arveja (*Pisum sativum*), rábano (*Raphanus sativus*), berenjena (*Solanum melongena*), papa (*Solanum tuberosum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), espinaca (*Spinacia oleracea*), maíz (*Zea mays*) y jengibre (*Zingiber officinale*).

#### A. Síntomas ocasionados por *P. ultimum*

*P. ultimum* ocasiona principalmente mal del talluelo en semillas pero en plantas de arveja china se observó un marcado deterioro en el sistema radical ya que en esta se podía observar pudriciones, coloración anormal y ausencia total de raíces secundarias, así como amarillamiento del follaje y un bajo desarrollo de la planta (fig. 2.27)



Figura 2.27 Sintomatología del daño causado por *Pythium* en el cultivo de arveja china.

#### B. Bioensayo para *P. ultimum*

Martin N. F.1999. (12) reporta que el genero *Pythium* consiste en aproximadamente 120 especies, pero no todas ellas son fitopatógenas. Muchas especies son estrictamente saprofitas del suelo o son parásitas de insectos, peces, algas o mamíferos. Se cree que algunas especies no patógenas muestran características de control biológico capaces de proteger a las plantas del ataque de las especies patógenas.

Debido a lo anterior se vio la necesidad de realizar pruebas biológicas para determinar la patogenicidad de las cepas de *Pythium sp.* aisladas de las muestras de suelo provenientes de los diferentes municipios del departamento de Chimaltenango.

En las figuras 2.28 y 2.29 se observa el establecimiento del bioensayo bajo condiciones controladas un invernadero ubicado en el Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía (CEDA) de la universidad de San Carlos de Guatemala.



Figura 2.28 Establecimiento de pruebas de patogenicidad.



Figura 2.29 Plantas de Arveja china y Ejote Francés inoculadas con cepas de *Pythium*.

Del total de 42 cepas inoculadas, 8 fueron de *P. ultimum*, según el reporte de la Universidad Tecnológica de Valencia. Las restantes 34 muestras no mostraron ser patógenas bajo las condiciones obtenidas en el invernadero del Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía (fig. 2.30 y 2.31).



Figura 2.30 Plantas de lechuga inoculadas con cepas de *Pythium*.



Figura 2.31 Plantas de Brócoli inoculadas con cepas de *Pythium*.

Se determinó la presencia de *Pythium ultimum* en una muestra de suelo proveniente del cultivo de papa (muestra 56(36)), a pesar que esta especie de *Pythium* esta reportada como patógena de este cultivo, en las pruebas de patogenicidad realizadas para esta investigación, el crecimiento y desarrollo de las plántulas inoculadas con los aislamientos de *P. ultimum* no se vio afectado. Por lo que podemos decir que la especie de *P. ultimum* aislada de la muestra del cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.) obtenida de la muestra número 56 (36) proveniente del municipio de Patzicia, departamento de Chimaltenango no fue patógena para las condiciones obtenidas en el invernadero del Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía.

Para las muestras 4, 14, 24, 24, 76,77 y 88 que correspondían a plantas de arveja china se pudo comprobar el resultado positivo de la patogenicidad del inóculo ya que en todas se observó un menor desarrollo de la parte aérea de la planta, así como también, poco desarrollo del sistema radical, pudrición de raíces y ausencia de raíces secundarias (fig. 2.32).



Figura 2.32 A la izquierda, efecto del daño ocasionado por *Pythium ultimum* en plantas inoculadas , colectado en muestras de suelo de arveja china, departamento de Chimaltenango. A la derecha plantas testigo.

En la figura 2.33 y 2.34 se puede observar las diferencias en cuanto al desarrollo tanto de la parte aérea de las plantas de arveja china como del sistema radical, nótese que las plantas inoculadas con las cepas de *Pythium ultimum* (a la izquierda de la figura) muestran un menor tamaño, desarrollo deficiente y un marcado deterioro del sistema radical ya que este muestra una coloración anormal debido a la pudrición de las raíces, así como también menor desarrollo y ausencia total o parcial de raicillas secundarias en comparación de las plantas testigo (a la derecha de la figura).



Figura 2.33 A la izquierda Efecto del daño ocasionado por *Pythium ultimum* en plantas de arveja china desarrollo deficiente, deterioro del sistema radical y coloración anormal debido a la pudrición de las raíces. A la derecha plantas testigo.



Figura 2.34 A la izquierda se observa una planta de arveja china inoculada con una cepa de *Pythium ultimum* en la que se muestra un menor desarrollo en comparación con el testigo (a la derecha).

La figura 2.35 muestra los síntomas característicos de *Pythium ultimum* en las raíces de las plantas de arveja china (*Pisum sativum*), se puede observar la pudrición en la base del tallo, así como también la diferencia en el desarrollo del sistema radical, la planta inoculada muestra una coloración marrón a causa de la pudrición de las raíces y una ausencia parcial de raicillas secundarias. Otra característica observada fue que en plantas sanas las raíces colonizaban todo el espacio de suelo dentro de la maseta, mientras que las raíces de las plantas inoculadas en su afán de sobrevivir, solamente abarcaban el área que tenía el pilón trasplantado, conservando la forma de la bandeja en la cual se había utilizado para obtener la plántula, esto le daba una apariencia de acolochamiento a las raíces.

También se puede observar la presencia de *Rhizobium* en las plantas sanas, y la ausencia de esta bacteria fijadora de nitrógeno en las plantas infectadas, dado que *Rhizobium* coloniza las raicillas secundarias.



Figura 2.35 A la Izquierda de la fotografía efecto del daño ocasionado por *Pythium ultimum* en raíces de arveja china, malformación, desarrollo deficiente y ausencia de raíces secundarias. Planta testigo (a la derecha).

## 2.6 Conclusiones y Recomendaciones

### 2.6.1 Conclusiones

- Se estableció la presencia de *Phytophthora capsici* asociado al cultivo de chile pimiento (*Capsicum annum*) en las muestras número 54, 78 y 79 procedentes de los municipios de El Tejar y Comalapa, departamento de Chimaltenango, Guatemala.
- Se estableció la presencia de *Phytophthora cinnamomi* en la muestra número 55(32) perteneciente al cultivo de tomate (*Lycopersicum esculentum*), procedente del municipio de El Tejar departamento de Chimaltenango, Guatemala. Dado que *P. cinnamomi* no está reportado como patógeno de este cultivo se procedió a realizar bioensayos en los cuales se determinó que *P. cinnamomi* no es patógeno para el cultivo de tomate.
- Se estableció *Pythium ultimum* asociado los cultivo arveja china (*Pisum sativum*) en muestras procedentes de los municipios de Saragoza, Patzicía y Comalapa, departamento de Chimaltenango, Guatemala. Las plantas de arveja china del bioensayo inoculadas con las cepas aisladas de *P. ultimum* presentaron un marcado deterioro en el sistema radicular ya que en esta se podía observar pudriciones, coloración anormal y ausencia total de raíces secundarias, así como amarillamiento del follaje y un bajo desarrollo de la planta.
- Se aisló *Pythium ultimum* en la muestra de suelo número 59(36) perteneciente al cultivo de papa procedentes del municipio de Patzicia departamento de Chimaltenango, Guatemala. Pese a que existen reportes de *P. ultimum* como patógeno de la papa, el resultado del bioensayo realizado fue negativo para este cultivo bajo las condiciones obtenidas en el invernadero del Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía.

- Se desarrollaron y validaron los protocolos para el muestreo, aislamiento y conservación de cepas de los géneros *Pythium* y *Phytophthora*.
- Se valida el protocolo para pruebas de patogenicidad para *Pythium* desarrollado en la presente investigación.

### 2.6.2 Recomendaciones

- Se recomienda continuar los muestreos y análisis en el departamento de Chimaltenango para establecer la incidencia y dispersión de estos agentes patógenos en el aérea y así aumentar el cepario iniciado en esta investigación para, que pueda servir en estudios posteriores y con ello generar soluciones que ayuden a los productores de hortalizas de exportación a optimizar su producción.
- Realizar evaluaciones y estudios para establecer el grado de importancia de *Pythium* y *Phytophthora* y además formular y evaluar planes de manejo para dichas especies.

## 2.7 Bibliografía

1. Abad, G. 2007. *Phytophthora bisheria* sp. nov., a new species from the *Rosaceous raspberry*, rose and strawberry in three continents. Carolina del Norte, US, Universidad Estatal de Carolina del Norte, Departamento de Patología, Laboratorio de Identificación de Patógenos Vegetales. 21 p.
2. Brock, JH; Beard, GH. 2002. A simplified technique for recovering *Pythium* and *Phytophthora* from infected plant tissue (en línea). US, University of Georgia. Consultado 7 mar 2007. Disponible en: <http://pubs.caes.uga.edu/caespubs/pubcd/MP-104.htm>
3. CABI, UK. 2007. CPC - crop protection compendium. UK. 2 CD.
4. Días DJ; Martínez JM. 2001. Evaluación de la oportunidad de usos de zonas húmedas del ámbito territorial del plan hidrológico 1 de la Confederación Hidrológica Guadiana (en línea). España. Consultado 28 feb 2007. Disponible en: <http://www.chguadiana.es/avisos/PEAG/Anexo%20IV%20Alegaciones.pdf>
5. Echemendia Medina, Y. 2002. *Phytophthora*: características, diagnóstico y daños que provoca en algunos cultivos tropicales: medidas de control (en línea). Consultado 16 feb 2007. Disponible en: <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/1060/cuf0022s.pdf>
6. Erwin, D; Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwide. US, American Phytopathological Society. 456 p.
7. Heffer Link, V; Powelson, ML; Johnson, KB. 2002. Oomycetes: laboratory exercises in Plant Pathology (en línea). Oregon, US, Oregon University. Consultado 3 mar 2007. Disponible en: [www.apsnet.org/education/Labexercises/Oomycetes/top.html](http://www.apsnet.org/education/Labexercises/Oomycetes/top.html)
8. Hong, X; Richardson, PA; Kong, P. 2006. *Phytophthora tropicalis* isolated from diseased leaves of *Pieris japonica* and *Rhododendron catawbiense* and found in irrigation water and soil in Virginia (en línea). Plant Disease 90:525. Consultado 5 abr 2008. Disponible en: <http://www.apsnet.org/pd/searchnotes/2006/PD-90-0525C.asp>
9. Infoagro.com. 2003. El cultivo de brócoli (en línea). España. Consultado 1 abr 2007. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/broculi.htm#10.%20PLAGAS%20Y%20ENFERMEDADES>
- 10.\_\_\_\_\_. 2003. El cultivo de chile pimiento (en línea). España. Consultado 1 abr 2007. Disponible en : <http://www.infoagro.com/hortalizas/pimiento.htm>
- 11.\_\_\_\_\_. 2003. El cultivo de lechuga (en línea). España. Consultado 1 abr 2007. Disponible en: <http://www.infoagro.com/hortalizas/lechuga.htm>

12. Martín, NF. 1999. Soilborne plant diseases caused by *Pythium* spp.: ecology, epidemiology and prospects for biological control. US, American Phytopathological Society Press. 8 p.
13. Oceano, ES. 2001. Enciclopedia practica de la agricultura y ganadería. España. 1872 p.
14. Partridge, JE. 2007. Characteristics of protist, protozoa and chromist (en línea). US, Universidad Nebraska-Lincoln. Consultado 3 marzo 2007. Disponible en: <http://nu-distance.unl.edu/homer/class/9/index.html>
15. Pérez Jiménez, RM; Zea Bonilla, T; López Herrera, CJ. 1989. Podredumbres radiculares del aguacate en la Costa del Sol: revisión y estado actual de la investigación (en línea). In World Avocado Congress (5, 2003, ES). Proceedings. España. p. 531-536. Consultado 5 abr 2008. Disponible en: [http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5\\_p531.pdf](http://www.avocadosource.com/WAC5/Papers/WAC5_p531.pdf)
16. Pérez-Moreno, L; Durán-Ortiz, LJ; Ramírez-Malagón, R; Sánchez-Pale, JR; Olalde-Portugal, V. 2007. Sensibilidad *in vitro* de aislados del hongo *Phytophthora capsici* a fungicidas (en línea). In Congreso mundial del chile (2004, MX). Fitosanidad. México. Consultado 28 mar 2007. Disponible en: [http://www.world-pepper.org/2004/memorias2004/144\\_perez\\_moreno\\_wpc2004.pdf](http://www.world-pepper.org/2004/memorias2004/144_perez_moreno_wpc2004.pdf)
17. Productos Superb, GT. 2001. Manual agrícola Superb. 7 ed. Guatemala. 144 p.
18. Singleton, L; Mihail, J; Rush, C. 1992. Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. US, American Phytopathological Society Press. 265 p.
19. Takao, T; Yoshiaki, C. 2007. Root and stem rot of chrysanthemum caused by five *Pythium* species in Japan. US. Consultado 8 abr 2008. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/c85r801514617685/>
20. Universidad de Caldas, Facultad de Ciencias Agropecuarias, CO. 1998. Aislamiento, esporulación y patogenicidad de *Phytophthora* sp. en manzana Anna sobre patrón MM 106 en Caldas. Colombia. Consultado 6 abr 2008. Disponible en: <http://acad.ucaldas.edu.co/jcg/fitotecnia/boletin/20/AISLAMIENTO,%20ESPORULA%20Y%20PATOGENICIDAD%20DE%20phytophthora%20s.htm>
21. Wikipedia.com. 2007. Oomycota (en línea). España. Consultado 28 feb 2007. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/Oomycota>
22. \_\_\_\_\_. 2007. PCR (en línea). España. Consultado 28 feb 2007. Disponible en: <http://es.wikipedia.org/wiki/pcr>

## **APENDICE**

Cuadro 2.11A Presentación de coordenadas del muestreo realizado en Chimaltenango.

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA	PATÓGENO AISLADO
1	Técpan	Lechuga	15p 0718703 1625674	Pythium
2	Técpan	Papa	15p 0718703 1625674	No presentó
3	Técpan	Güicoy	15p 0718703 1625674	No presentó
4	Técpan	Arveja china	15p 0718703 1625674	Pythium
5	Técpan	Haba	15p 0718703 1625674	No presentó
6	Zaragoza	Repollo	15p 725734 1619289	Pythium
7	Zaragoza	Lechuga	15p 725734 1619289	Pythium
8	Zaragoza	Brócoli	15p 725734 1619289	No presentó
9	Zaragoza	Brócoli	15p 725734 1619289	Pythium
10	Zaragoza	Frijol ejotero	15p 725734 1619289	No presentó
11	Zaragoza	Güicoy	15p 725734 1619289	No presentó
12	Zaragoza	Papa	15p 725734 1619289	No Presentó
13	Zaragoza	Brócoli	15p 725734 1619289	Pythium
14	Zaragoza	Arveja china	15p 725734 1619289	Pythium
15	Zaragoza	Arveja china	15p 725734 1619289	No Presentó
16	Zaragoza	Papa	15p 725734 1619289	No presentó
17	Tululchè Zaragoza	Repollo	15p 726297 1618528	No presentó
18	Tululchè Zaragoza	Lechuga	15p 726297 1618528	No presentó
19	Tululchè Zaragoza	Brócoli	15p 727550 1619544	No presentó
20	Tululchè Zaragoza	Brócoli	15p 727550 1619544	No presentó
21	Tululchè Zaragoza	Frijol	15p 727968 1618972	No presentó
22	Tululchè Zaragoza	Güicoy	15p 727968 1618972	No presentó
23	Tululchè Zaragoza	Papa	15p 727367 1628746	No presentó
24	Tululchè Zaragoza	Arveja china	15p 727367 1628746	Pythium
25	Tululchè Zaragoza	Arveja china	15p 727367 1628746	Pythium
26	Tululchè Zaragoza	Papa	15p 726494 1623593	No presentó
27	Párramos	Arveja china	N 14°35'6.5" S 90°48'29.5"	No presentó
28	Párramos	Tomate	N 14°34'57.3" S 90°48'32.5"	No presentó
29	Párramos	Miltomate	N 14°35'53.3" S 90°48'4.7"	No presentó
30	Valle de Patzicia	Lechuga	N 14°38'41.1" S 90° 55'51.5"	Pythium
31	Valle de Patzicia	Lechuga	15p 723120 162006	Pythium
32	Valle de Patzicia	Lechuga	15p 723066 1620892	Pythium
33	Valle de Patzicia	Ejote	15p 720317 1625117	No presentó
34	Valle de Patzicia	Ejote	15p 720317 1625117	Pythium
35	Valle de Patzicia	Ejote	15p 720540 1622579	No presentó
36	Valle de Patzicia	Ejote	15 721248 1621510	No presentó
37	El Tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium
38	El Tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium
39	El Tejar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	No Presentó
40	El Tejar	Chile Pimiento	15p 739909 1618470	No Presentó
41	El Tejar	Chile Pimiento	15p 739909 1618470	No presentó
42	Santa Cruz Balanya	Brócoli	15p 723363 1623812	No presentó

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA	PATÓGENO AISLADO
43	Santa Cruz Balanya	Brócoli	15p 7227763 1623878	No presentó
44 (p6p1)	Rincón	Fresa	N 14°40'41.7'' S 90°53'48, 5''	No Presentó
45(p6p2)	Rincón	Fresa	N 14°40'41.7'' S 90°53'48,5 ''	Phytophthora sp.
46 (p6p3)	Rincón	Fresa	N 14°40'41.7'' S 90°53'48, 5''	No Presentó
47 (p6p4)	Rincón	Fresa	N 14°40'41.7'' S 90°53'48, 5''	No Presentó
48(p7p1)	Patzicia	Lechuga	N 14°38'41.1'' S 90°55' 51,5''	No Presentó
49(p7p2)	Patzicia	Zanahoria	N 14°38'41.1'' S 90°5 5'51,5''	No Presentó
50 (p7p3)	Patzicia	Zanahoria	N 14°38'41.1'' S 90° 55'51,5''	No Presentó
51 (p7p4)	Patzicia	Frijol	N 14°38'41.1'' S 90°55' 51,5''	Pythium
52 (p7p5)	Patzicia	Zanahoria	N 14°38'41.1'' S 90° 55'51,5''	No Presentó
53 (p7p6)	Patzicia	Zanahoria	N 14°38'41.1'' S 90° 55'51,5''	No Presentó
54 (31)	El tejlar	Chile Pimiento	15p 740597 1619506	Pythium sp, Phytophthora capsici
55 (32)	El tejlar	Tomate	15p 740597 1619506	Phytophthora cinnamomi
56 (33)	Patzicia	Brócoli	15 p 719201 1621173	No Presentó
57 (34)	Patzicia	Repollo	15 p 719201 1621173	No presentó
58 (35)	Patzicia	Haba	15p 719733 1621024	No presentó
59(36)	Patzicia	Papa	15p 719733 1621024	Pythium sp
60 (37)	Choycoc	Frijol	15p 710117 1621385	Pythium sp
61 (38)	Sumpango	Chile Pimiento	15p 742291 1618903	Pythium sp
62	Técpan	Güicoy	15p 719150 1625793	No presentó
63	Técpan	Arveja china	15p 718880 1625469	Pythium
64	Técpan	Lechuga	15p 718880 1625469	Pythium
65	Técpan	Lechuga	15p 0718703 1625674	Pythium
66	Técpan	Brócoli	15p 0718703 1625674	Pythium
67	Técpan	Papa	15p 0718703 1625674	No Presentó
68	Zaragoza	Repollo	15p 726127 1618491	No presentó
69	Zaragoza	Lechuga	15p 726028 1618619	No presentó
70	Zaragoza	Brócoli	15p 726028 1618619	No presentó
71	Zaragoza	Brócoli	15p 725850 1618671	Pythium
72	Zaragoza	Repollo	15p 726297 1618528	Pythium
73	Zaragoza	Repollo	15p 725826 1618687	Pythium
74	Zaragoza	Lechuga	15p 725826 1618687	No presentó
75	Zaragoza	Lechuga	15p 726517 1621679	No presentó
76	Comalapa	Arveja china	15p 726340 1616229	Pythium
77	Comalapa	Arveja china	15p 726340 1616229	Pythium
78	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308 1621680	Pythium sp, Phytophthora capsici
79	Comalapa	Chile Pimiento	15p 726308 1621680	Pythium sp
80	Comalapa	Haba	15p 727367 1628746	No Presentó
81	Comalapa	Haba	15p 727423 1628730	No Presentó
82	Santa Cruz Balanyá	Zanahoria	15p 722366 1623889	No Presentó
83	Santa Cruz Balanyá	Zanahoria	15p 722366 1623889	No Presentó
84	Santa Cruz Balanyá	Lechuga	15p 721577 1626364	Pythium sp
85	Santa Cruz Balanyá	Lechuga	15p 721844 1626807	Pythium sp
86	Santa Cruz Balanyá	Brócoli	15p 72258 1626118	Pythium sp

CORRELATIVO	LOCALIDAD	CULTIVO	LOCALIZACION GEOPOSICIONADA		PATÓGENO AISLADO
87	Patzicia	Lechuga	15p 722975	1619723	Pythium sp
88	Patzicia	Arveja China	15p 723090	1621010	Pythium sp
89	Patzicia	Brócoli	15p 722550	1620414	No Presentó
90	Patzicia	Brócoli	15p 722438	1620166	No Presentó
91	Parramos	Frijol	15p 738388	1617390	Pythium sp
92	Parramos	Frijol	15p 738388	1617390	Pythium sp
93	Técpan	Lechuga	15p 718880	1625469	No Presentó
94	Técpan	Lechuga	15p 718698	1625935	No Presentó
95	Técpan	Lechuga	15p 719625	1625660	No Presentó
96	Patzicia	Papa	15p 722305	1620738	Phythium sp
97	Patzicia	Bróculi	15p 721630	1620960	No presentó
98	Patzicia	Repollo	15p 721630	1620960	No presentó
99	Patzicia	Brócoli	15p 721749	1621516	Pythium sp
100	Patzicia	Repollo	15p 721096	1623878	Pythium sp
101	Patzicia	Bróculi	15p 721096	1623878	No Presentó
102	Patzicia	Brócoli	15p 722308	1619121	Pythium sp
103	Patzicia	Brócoli	15p 721867	161953	No Presentó
104	Patzicia	Repollo	15p 700539	1622906	No Presentó
105	Patzicia	Papa	15p 720642	1625014	No presentó
106	Patzicia	Cebolla	15p 721248	1621510	No presentó
107	Zaragoza	Tomate	15p 726308	1621680	No presentó
108	Zaragoza	Chile Pimiento	15p 726308	1621680	No presentó
109	Zaragoza	Tomate	15p 726517	1621679	No presentó

## **MEDIOS DE CULTIVO PARA AISLAMIENTO DE *Pythium* Y *Phytophthora*.**

### **Caldo de papa agarizado y glucosado (PDA)**

39 grs. De PDA  
1000 ml de agua

Disolver el medio en el agua en un recipiente resistente apto para autoclave. Esterilizar por 15 min. En campana de flujo laminar llenar con el medio las cajas Petri para posteriormente realizar la siembra. Se puede modificar agregando PCNB para evitar contaminación.

### **Agar- arveja**

100 g. de Arveja en conserva  
20 gr. de agar-agar  
1000 ml de agua

Ecurrir los guisantes y hacerlos puré. Calentar con 300 ml de agua por 5-7 min. Evitando la ebullición, removiendo continuamente. Dejar reposar y filtrar por muselina o tamiz fino el sobrenadante. Repetir la operación y ajustar hasta 1000 ml y llevar a pH 5.5. El filtrado puede congelarse por 5 meses.

### **Medio de caldo agarizado de papa y zanahoria (PZA)**

20 gr., de papa  
20 gr. de zanahoria  
15 gr. de agar  
1000 ml de agua

Es un medio excelente para aislar *Pythium*. Las papas y zanahorias se pelan y se cortan en rodajas, se cocinan a ebullición durante 10 min. En un litro de agua. Filtrar el caldo y enrasar hasta el volumen proporcional del peso de tubérculos y raíces cocidos.

**Medio agarizado del jugo o zumo V-8 (V-8 agar)**

200 ml de V-8 Jugo Vegetal  
3 gr. de carbonato de calcio  
20 gr. de agar  
Agua hasta 1000 ml

Se utiliza para aislar *Phytophthora* y para la producción de esporofitos y zoosporas en especies del género. Filtrar por muselina fina la cantidad deseada según la fórmula.

Clarificar con un segundo filtrado a través de algodón hidrófilo. (En este caso el algodón deberá ser escurrido con la mano, pues empapa una importante cantidad de líquido. Aforar al volumen de un litro con agua. Añadir los otros ingredientes y esterilizar.

**Medio agarizado de harina de avena.**

40 gr. de hojuelas de avena  
15 gr. de agar  
1000 ml de agua

Es muy utilizado para la taxonomía de *Pythium* y *Phytophthora*. Calentar las hojuelas de avena en 1000 ml de agua por 30-45 min. Debe removerse para evitar la ebullición (o a Baño de María por 2 hrs.) Filtrar por muselina sucesivas veces para clarificar el líquido. Enrasar con agua hasta 1000 ml. Agregar 1 garbanzo por caja Petri.

**Cornmeal Agar.**

19 g de cornmeal agar (Diffco)  
1000 ml de agua destilada

Mezclar los ingredientes hasta homogeneizar. Llevar a autoclave y esterilizar durante 15 min a 125 ° C.

**PARPBH**

(CMA+PIMARICINA+AMPICILINA+RIFAMPICINA+PCNB+BENOMILO+HYMEXAZOL)

CMA	1 l
Pimaricina	0.4 ml
Ampicilina	0.150g
Rifampicina	0.01 g
PCNB	0.1 g
Benomilo	0.2 g
Hymexazol	0.069 ml

Al momento de agregar los antibióticos el medio CMA deberá estar a una temperatura no mayor de 40 0C, pues los antibióticos y fungicidas utilizados son termolábiles. Los reactivos deberán agregarse en el orden establecido. El PCNB y benomilo deberán ser disueltos previamente en 10 cc de etanol al 95% y 10 cc de agua destilada. Luego colocar el medio de cultivo selectivo en cajas de Petri. (11)

**Agar Vómito.**

20 g de avena instantánea molida

20 g de agar

300 ml de jugo V-8

Mezclar los ingredientes hasta homogeneizar. Llevar a autoclave y esterilizar durante 15 min a 125 ° C.

## PROTOCOLO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS VEGETALES Y DE SUELO PARA EL AISLAMIENTO DE *Pythium* y *Phytophthora*

### MATERIALES:

- Palas
- Rastrillos
- Tijeras
- Navaja
- Bolsas de polietileno para empacar las plantas
- Etiquetas o marcador indeleble para identificar cada una de las muestras
- Hielera para la conservación de las muestras durante el traslado al laboratorio.
- Libreta de campo para llevar registros de: localización georeferenciada de la parcela, cultivo al que esta dedicado y numero de muestras colectadas en el lugar.

### METODOLOGÍA

1. Recorrió la parcela en busca de puntos en los cuales se observe depresiones en el cultivo, es decir se buscaron aquellos lugares en los cuales el cultivo presentó menor desarrollo o pérdida de plantas. Se debe de poner especial atención a las áreas anegadas de las parcelas ya que *Phytophthora* y *Pythium* son hongos acuáticos.
2. Una vez localizados dichos puntos de depresión se procede al análisis inmediato de las plantas mediante la observación directa en busca de la sintomatología característica de *Phytophthora* y *Pythium*. Se debe observar características vasculares, podredumbres radicales y del cuello.
3. Por tratarse de enfermedades localizadas en el sistema radicular y partes basales del tallo, es necesario la toma de muestra de toda la planta, incluyendo rizósfera y el suelo adyacente (aproximadamente una libra del suelo será suficiente). En el caso de semilleros y plántulas de vivero, es necesario coleccionar las plántulas y el substrato donde se desarrollan. Plantas herbáceas (tomate, pimiento, hortalizas etc.) se debe extraer la planta completa con el bloque de suelo que incluye el sistema radical a una profundidad no menor de 10 cm

4. Si se trata de una planta herbácea se debe enterrar la pala cerca del tallo de la planta sospechosa de infección por *Pythium sp* o *Phytophthora sp* a 10 cm de profundidad.
5. Si se trata de pilones en invernadero, coleccionar las plántulas junto al sustrato que contiene.
6. Extraer cuidadosamente la planta completa, teniendo cuidado de no dejar la raíz en el suelo.
7. Colocar la muestra de planta y una libra del suelo de la rizósfera en una bolsa de polietileno.
8. Amarrar la bolsa dejando la parte aérea de la planta expuesta.
9. Identificar la muestra.
10. Colocar la muestra tomada en una hielera con cuidado de no dañarla para el traslado al laboratorio.

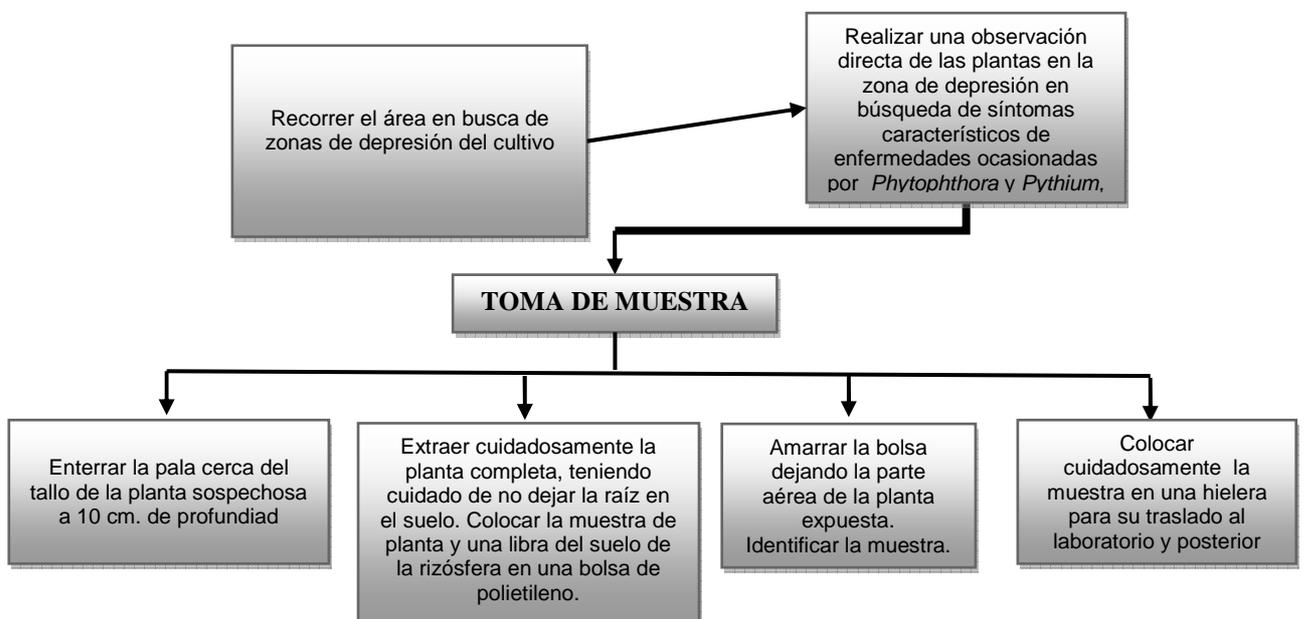


Figura 2.36A Diagrama de bloques para el procedimiento y toma de muestras de *Pythium* y *Phytophthora*.

**PROTOCOLO PARA EL AISLAMIENTO Y CONSERVACION DE CEPAS DE  
*Pythium* y *Phytophthora* DE MUESTRAS VEGETALES Y DE SUELO.**

**MATERIALES**

- Agua corriente
- Agua destilada o desmineralizada
- Alcohol al 95% y 70%
- Bisturí
- Cajas de petri
- Vidrios de reloj
- Papel mayordomo
- Manzanas verdes o amarillas
- Pinzas
- Mecheros
- Agujas de disección
- Navaja
- Beaker de 50 mm
- Pizeta
- Cinta adhesiva de 2 pulgadas
- Cajas de petri con medio PARBPH
- Cajas de petri con medio PDA
- Cajas de petri con medio Agar V8
- Papel periódico.
- Papel parafilm
- Marcadores permanentes
- Balanza semianalítica
- Campana de flujo laminar
- Fósforos o encendedor.
- Recipiente plástico lo suficientemente grande para mezclar.
- Frascos de compota (uno para cada aislado purificado).
- Turba o peatmost (de 10 a 15 gr. por frasco de compota).
- Arena.

## **METODOLOGÍA**

### **Lavado de las Muestras**

1. Sobre papel periódico separar el suelo de la raíz con sumo cuidado tratando de no separar también las raicillas que pueda aun tener la muestra, ya que es en estas partes en donde se encuentra con mas frecuencia *Phytophthora* y *Pythium*.
2. Una vez separado el suelo de la planta reservar para aislar *Phytophthora* y *Pythium* en una bolsa debidamente identificado con los datos procedentes del campo.
3. Lavar las plantas con agua corriente con el fin de eliminar completamente cualquier residuo de suelo que se encuentre en las raíces.
4. Lavar la planta con agua destilada
5. Dejar secar sobre papel absorbente por 30 minutos.

### **Selección del Material Vegetal**

Una vez eliminado el exceso de humedad a las muestras de plantas se procede a separar el material con el cual se trabajó el aislamiento de *Phytophthora* y *Pythium* de la siguiente manera:

#### **Raíz**

1. Se debe buscar entre las raíces aquellas que muestren necrosis o pudrición y se deben separar del resto.
2. Cortar las raíces con ayuda de un bisturí para conservar pequeños trozos de 3 mm, estas porciones deben ser tomadas de las raíces mas finas y en las partes en donde estas se bifurquen para formar otra raíz, pues es entre estas áreas en donde se encuentra mas concentrado el inóculo.
3. Reservar parte de las raíces que no se separaron en una caja de petri.

## **Tallos**

1. Cortar con ayuda de un bisturí porciones del tallo longitudinales en la zona de avance de la enfermedad, tomando tanto tejido infectado como tejido sano en trozos u hojuelas de 2 a 3 mm de diámetro.

## **Aislamiento de *Pythium* y *Phytophthora***

### **Aislamiento del suelo método del cultivo trampa:**

1. Higienizar la mesa de trabajo con alcohol al 95% y colocar sobre ella 6 hojas de papel mayordomo doblada en dos o 2 hojas de papel periódico de modo de que cubra el área de trabajo.
2. En un beacker de 50 cc colocar alcohol al 95% para desinfectar el bisturí, navaja y agujas de disección cada vez que son utilizados y cada vez que se cambia de muestra.
3. Colocar un mechero de alcohol o gas para desinfectar el instrumental de trabajo cada vez que se cambia de muestra
4. Agitar la bolsa de polietileno que contiene la muestra de suelo a ser analizada con la finalidad de homogenizar la muestra de suelo para que los análisis sean representativos
5. Sumergir navaja o bisturí en el beaker con alcohol al 95% y luego cuidadosamente flamear en el mechero a modo de desinfectarlos.
6. En una manzana verde o amarilla abrir cuatro perforaciones equidistantes formando agujeros de 2.5 cm de diámetro, reservar los trozos de manzana retirados.
7. Rellenar los agujeros con 5 a 10 gr. de suelo.
8. Con una pizeta agregar de 1 a 2 cc de agua destilada.

9. Sellar el agujero con el trozo de fruta que se retiró y cubrir con la cinta adhesiva.
10. Se debe identificar cada una de las manzanas con un código para saber que manzana corresponde a cada muestra de suelo a analizar, esto se puede realizar con un marcador permanente colocando el código sobre la cinta adhesiva que recubre la manzana.
11. Dejar a temperatura ambiente dentro de una caja plástica para mantener orden durante 24 a 48 horas hasta que se puedan observar las lesiones ocasionadas por oomicetos en la pulpa de la fruta. Estas lesiones se manifiestan como una pudrición blanda alrededor del área inoculada con el suelo.
12. Una vez obtenidas las lesiones características en la pulpa ocasionadas por *Pythium* o *Phytophthora* se procede a su aislamiento.
13. Higienizar y desinfectar la mesa de trabajo, asperjando con ayuda de un atomizador primero alcohol al 95% y luego con alcohol al 70% y limpiando simultáneamente con papel mayordomo.
14. Colocar 2 hojas de papel periódico o 6 hojas de papel mayordomo dobladas en dos de modo de cubrir la mesa de trabajo para mantener limpia el área.
15. En un beaker de 50 cc colocar alcohol al 95% para desinfectar la navaja, bisturí y agujas de disección cada vez que se cambie de manzana.
16. Colocar 3 mecheros de gas o alcohol a una distancia prudente del área en la cual se va a trabajar.
17. Con un marcador indeleble identificar una caja de petri conteniendo el medio PARBPH con el código de la manzana que se va a trabajar.
18. Sobre el papel periódico o mayordomo tomar una por una las manzanas inoculadas con suelo y retirar la cinta adhesiva.
19. Sumergir navaja o bisturí en el beaker con alcohol al 95% y luego cuidadosamente flamear en el mechero a modo de desinfectarlos.

20. Con ayuda de la navaja se partir cada una de las manzanas en cuatro porciones iguales.
21. Con una pinza, bisturí o aguja de disección previamente desinfectada con alcohol al 95% y posteriormente flameada, cortar trozos de 2 a 3 mm diámetro del tejido interno de la manzana, en las zonas de avance de la pudrición, tomando tanto tejido enfermo como sano.
22. Sembrar de 6 a 9 trozos en una caja de Petri conteniendo el medio selectivo PARBP con Himexasol con el objeto de aislar especies de *Phytophthora*, y PARBP sin Himexasol para aislar especies de *Pythium*
23. Sellar las cajas con papel parafilm para evitar contaminación.
24. Repetir los pasos 17 al 23 para cada una de las manzanas inoculadas.
25. Incubar por 24 a 72 horas dentro de una caja plástica a temperatura ambiente revisando periódicamente si hubo crecimiento micelial.

### **Aislamiento a partir de Tejido Vegetal**

#### **Siembra directa en medio PARBP**

1. Higienizar y desinfectar la mesa de trabajo, asperjando con ayuda de un atomizador primero alcohol al 95% y luego con alcohol al 70% y limpiando simultáneamente con papel mayordomo.
2. Organizar una batería de desinfección: en un vidrio de reloj agregar alcohol al 70% y en otros dos agua destilada estéril.
3. En un beaker de 50 cc colocar alcohol al 95% para desinfectar las pinzas.
4. colocar 3 mecheros de gas o alcohol a una distancia prudente del área de trabajo.

5. Utilizando una pinza previamente desinfectada con alcohol y flameada se deben de introducir los trozos de tallo o raíz previamente seleccionados como se describe en el inciso B secciones a y b, en el vidrio de reloj con alcohol y dejaron sumergidos por 20 segundos.
6. Lavar los trozos con el agua destilada estéril contenida en el segundo vidrio.
7. Finalmente para eliminar completamente cualquier residuo se trasladaron los trozos a un tercer vidrio con agua destilada estéril.
8. Dejar sacaron los trozos de la muestra del vidrio de reloj sobre papel mayordomo.
9. Sembrar de 6 a 9 trozos de tallo o raíz en cajas Petri que contengan medio selectivo PARBP sin Himexasol con el objeto de aislar especies de *Phytophthora*, y PARBP con Himexasol para aislar especies de *Pythium*.
10. Sellar las cajas de petri con papel parafilm para evitar contaminación
11. Incubar por 24 a 72 horas dentro de una caja plástica revisando periódicamente si hubo crecimiento miceliar.

### **Siembra Indirecta Utilizando Solución de Suelo**

#### **Elaboración de la Solución de Suelo**

1. Pesar con ayuda de una balanza semianalítica 50 gr Se suelo.
2. Colocar los 50 gr. de suelo en un erlenmayer de 1000 ml
3. Aforar el erlenmayer y mezclar bien.
4. Dejar reposar durante 24 horas.
5. Después de transcurridas las 24 horas decantar 50 ml del sobrenadante de la solución de suelo.

6. Colocar los 50 ml de la solución de suelo en un earlenmayer de 1000ml.
7. Aforar el earlenmayer con agua.
8. Esterilizar en el autoclave a 121<sup>0</sup>C durante 15 minutos.
9. Dejar enfriar antes de ser utilizado.

#### **INDUCCIÓN DE MICELIO UTILIZANDO SOLUCIÓN DE SUELO**

1. En cajas de petri colocar 20 a 30 ml de solución de suelo estéril.
2. Introducir en las cajas de petri trozos de manzana inoculados previamente con muestras de suelo sospechosas de estar infectada por *Pythium sp.* o *Phytophthora sp.* o las semillas de estas manzanas tratando de exponer la mayor área posible.
3. Identificar con marcador indeleble cada caja para saber la procedencia de cada una de las muestras.
4. Dejar a temperatura ambiente hasta que se pueda observar crecimiento miceliar (aproximadamente por 24-48 hrs).
5. Una vez producido el micelio en las muestras se proceder a tomar porciones de este con ayuda de una aguja de disección y a sembrarse en el medio selectivo PARBP con y sin himexasol.
6. Incubar por 24 a 72 horas revisando periódicamente si hay crecimiento miceliar.

## Reaislamientos

1. Desinfectar la campana de flujo laminar asperjando con ayuda de un atomizador alcohol al 95% y limpiando simultáneamente con papel mayordomo.
2. Colocar dentro de la campana un beaker con alcohol al 95%, pinzas, bisturí, un marcador indeleble, agujas de disección, papel mayordomo, un mechero de gas o de alcohol, fósforos o encendedor y las cajas petri que contienen el medio PDA y medio agar V8. Dejar con luz ultra violeta (UV) por 45 minutos con el objeto de esterilizar la campana y los materiales a ser utilizados.
3. Asegurase que de cuenta con todos los materiales necesarios dentro de la campana ya que una vez se empieza a trabajar no se podrán sacar las manos de la campana ya que esto causa contaminación.
4. Desinfectarse las manos hasta los codos con alcohol al 95% rociándolas con un atomizador.
5. Rociar con alcohol al 70% las cajas de petri que contienen los aislados de *Pythium* y *Phytophthora* obtenidos en el medio PARBP con y sin himexasol e introducirlos dentro de la campana de flujo laminar.
6. Una vez volatilizado el alcohol de las manos encender con cuidado el mechero y colocarlo frente al área de trabajo.
7. Identificar con el marcador indeleble cada caja de Medio PDA y agar V8 con el código que corresponda a la caja con el aislado de PARBP que se va a repicar.
8. Introducir el bisturí y las agujas de disección dentro del beaker que contiene alcohol al 95% y flamear cuidadosamente en el mechero.
9. Abrir la caja que contiene el aislado en PARBP.
10. Con el bisturí cortar un trozo del medio PARBP que contenga micelio de 2 a 3 mm

11. Con la aguja de disección colocar el trozo de PARBP en medio de la placa con PDA con el objeto de observar y documentar los patrones de crecimiento característico de cada especie (petaloide, rosáceo, radiado, estolonífero, etc.) y su conservación.
12. Colocar en una caja de petri con agar V8 un trozo del aislado en PARBP que contenga micelio para estimular la producción de estructuras sexuales y asexuales.
13. Repetir los pasos 7 al 12 para cada aislamiento de cada muestra en medio PARBP.

### **CONSERVACION DE LAS CEPAS DE *Pythium* y *Phytophthora***

1. Lavar un recipiente plástico suficientemente grande para mezclar.
2. Agregar al recipiente plástico dos partes de turba o peatmost por una de jugo de vegetales y una de arena.
3. Homogenizar bien, hasta que todos los componentes se mezclen por completo.
4. Una vez obtenida una mezcla homogénea proceder a llenar los frascos de compota con 25 a 30 gramos de la mezcla.
5. Cerrar los frascos con la tapadera respectiva de cada uno de ellos y cubrir la tapa hasta la mitad del frasco utilizando doble hoja de papel aluminio para evitar rupturas en la manipulación.
6. Esterilizar los frascos de compota con el sustrato previamente sellados con papel aluminio en autoclave a 120 °C por 20 minutos, por 3 días consecutivos para asegurarse que no queden organismos que nos puedan contaminar el sustrato.
7. Dejar enfriar a temperatura ambiente los frascos con la mezcla antes de ser utilizados.

8. Limpiar la campana de flujo laminar y desinfectar con alcohol al 95%.
9. Introducir dentro de la campana un beacker de 50 cc, alcohol al 95%, bisturí, papel parafilm y la cantidad de frascos de compota llenos del sustrato para conservación realizado en los incisos 1 al 7. Y dejarlos con luz ultravioleta (UV) por 30 minutos para asegurar que estén estériles.
10. Una vez transcurrido los 30 minutos apagar la luz ultra violeta, encender la luz blanca y el ventilador de la campana de flujo laminar.
11. Asperjar con alcohol al 70% las placas de petri con los aislados purificados antes de introducirlos a la campana.
12. Desinfectarse las manos hasta los codos con alcohol al 70% antes de utilizar la campana.
13. Una vez se hayan introducidas las manos dentro de la campana tratar de no sacarlas para evitar contaminación.
14. Encender con cuidado el mechero.
15. Identificar con el marcador indeleble el envase de compota que contienen el sustrato para conservación de sepas con el código de la caja de petri con el aislado purificado a conservar.
16. Introducir el bisturí en el beaker de 50 cc que contiene alcohol y flamear en el mechero a modo de desinfectarlo.
17. Abrir cuidadosamente la caja de petri con el aislamiento purificado a conservar y cortar con ayuda del bisturí trocitos de 3mm x 3mm.
18. Con una mano abrir parcialmente cerca de la llama del mechero el envase de compota que contiene el sustrato para conservación y con la otra mano y con ayuda del bisturí introducir los trocitos de Medio PDA con el aislado purificado que se quiere conservar.

19. Sellar el frasco con su respectiva tapadera, luego envolver la tapa hasta la mitad del frasco con papel parafilm.
20. Guardar los frascos con las cepas a conservar en un lugar fresco y oscuro.

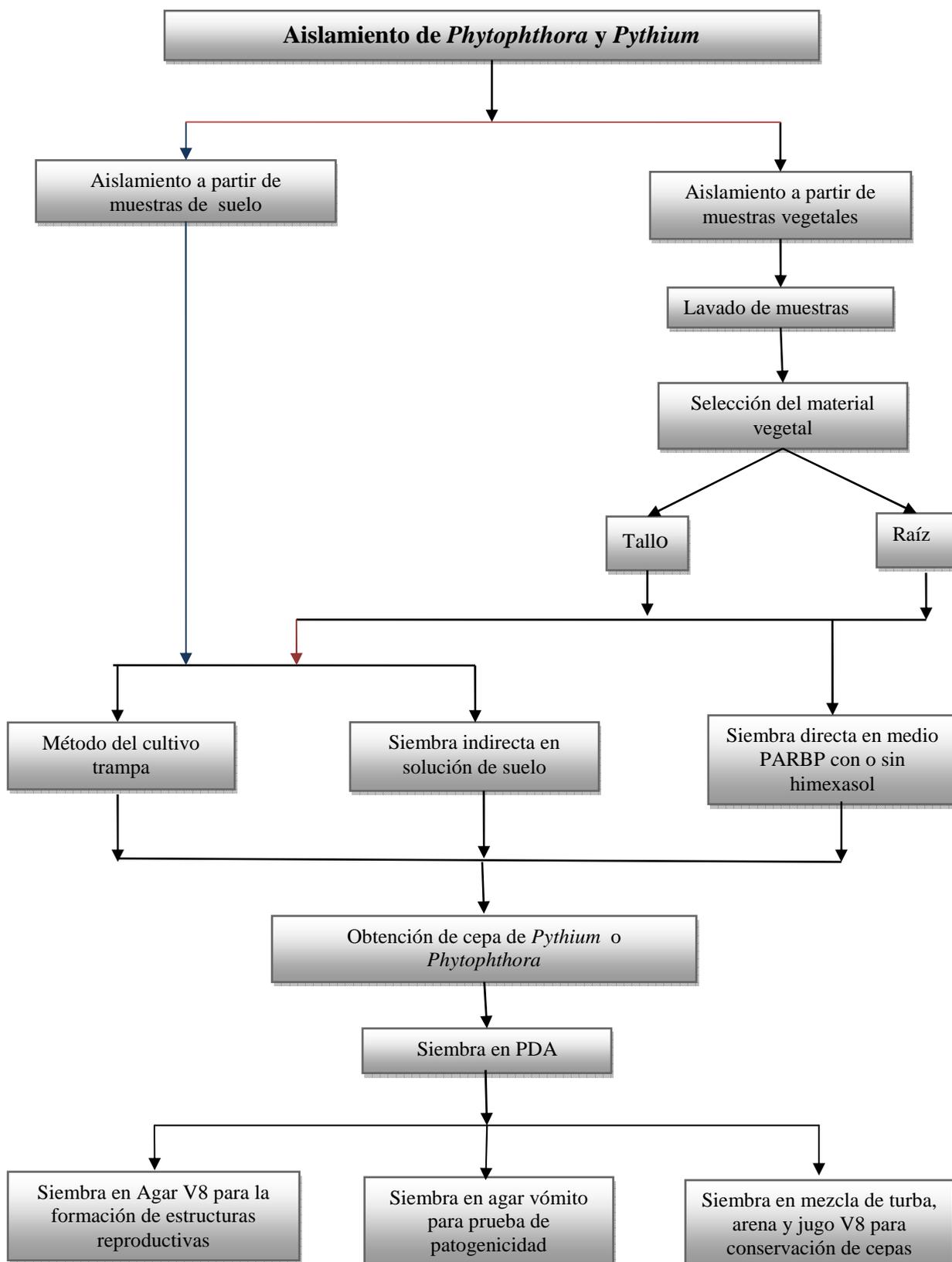


Figura 2.37A Diagrama de bloques para el proceso del aislamiento y conservación de cepas de *Pythium* y *Phytophthora*.

## PROTOCOLO PARA PRUEBAS DE PATOGENICIDAD PARA ESPECIES DE *Pythium* y *Phytophthora*.

### MATERIALES

- Cepas purificadas en medio de cultivo agar vómito
- Agua destilada
- Pizeta
- Semilla o esquejes de plantas de la misma especie de las cuales se aisló el patógeno
- Bandejas piloneras de plástico de 400 plántulas
- Macetas de ½ galón (14 cm. De diámetro)
- Sustrato estéril para germinación
- Sustrato estéril para trasplante
- Cinta adhesiva transparente
- Bolsas plásticas de 2 libras para colecta de muestras
- Cinta selladora Parafilm
- Hielera
- Regadera
- Cámara fotográfica.

### METODOLOGÍA

#### Obtención de plántulas sanas para prueba de patogenicidad

1. Colocar las bandejas piloneras sobre una superficie plana.
2. Llenar las bandejas piloneras con el sustrato estéril para germinación.
3. Con ayuda de una pizeta regar las bandejas con agua destilada lo suficiente para mantener el sustrato a capacidad de campo. Este procedimiento deberá realizarse dos veces al día hasta que termine el bioensayo.
4. La siembra dependerá del material vegetativo que se va a utilizar, sembrar un esqueje por espacio de la bandeja, o bien si son semillas sembrar en doble postura para aumentar la probabilidad de germinación.

5. Una vez germinadas las semillas o enraizados los trasladar las bandejas a un invernadero y mantenerlas allí hasta que se presenten las primeras hojas verdaderas de cada cultivo, esto dependerá de la especie con la cual se está trabajando.
6. Cuando hayan aparecido las primeras hojas verdaderas en las plántulas se deberá proceder a la inoculación y trasplante de las plántulas a las macetas de 14 cm de diámetro.

### **Inoculación de la cepa de *Pythium* y *Phytophthora* a las plántulas.**

1. Llenar las macetas con sustrato estéril para trasplante.
2. Regar las macetas con agua destilada o desmineralizada hasta alcanzar la capacidad de campo. Este proceso se deberá realizar 2 veces al día durante todo el bioensayo.
3. Se deben utilizar 2 macetas por cepa a inocular.
4. En la primera maceta previamente regada trasplantar 10 plántulas (testigo).
5. Identificar la maceta preferiblemente con un marcador indeleble.
6. Desinfectar un bisturí con alcohol y flamear con ayuda de un mechero.
7. Tomar la caja petri con agar vómito que contiene la cepa purificada de *Pythium* o *Phytophthora* para inocular y con ayuda del bisturí previamente desinfectado cortar pequeños trozos de 5 x 5 mm
8. Incorporar los trozos de agar vómito de la placa de petri previamente cortado en trozos al sustrato de la segunda maceta.
9. Trasplantar 10 plántulas a la maceta a la cual se le incorporo los trozos de agar vómito conteniendo el inóculo de *Pythium* o *Phytophthora*.
10. Identificar la maceta preferiblemente con un marcador indeleble.

11. Repetir los pasos del 1 al 10 por cada cepa de *Pythium* o *Phytophthora* que serán sometidas al bioensayo.
12. Regar las masetas a capacidad de campo con agua desmineralizada o destilada una vez por la mañana y otra por la tarde durante 20 días.
13. A los 20 días después de la inoculación trasladar las masetas al laboratorio.
14. Sacar las plantas de las macetas y proceder a lavarlas con agua corriente con cuidado de no desprender las raíces.
15. Conservar en una bolsa plástica previamente identificada con el código de la muestra correspondiente el sustrato de la maseta inoculada.
16. Analizar comparativamente las plantas inoculadas con el testigo observando si existen pudriciones de cuello y raíz, coloraciones anormales, presencia de raicillas secundarias, desarrollo foliar, radical y de la planta en general.
17. Si se encuentran uno o más de los síntomas descritos anteriormente las plantas proceder a tomar fotografías de las plantas.
18. Comparar la sintomatología presentada en las plantas del bioensayo con los síntomas de la enfermedad a nivel de campo y comprobar si concuerdan.
19. Proceder al Reaislamiento de la cepa de de *Pythium* o *Phytophthora* según la metodología empleada en el protocolo para aislamiento y conservación de cepas de *Pythium* y *Phytophthora*
20. Verificar si la cepa de *Pythium* o *Phytophthora* *reaislada* concuerda con la cepa inoculada.

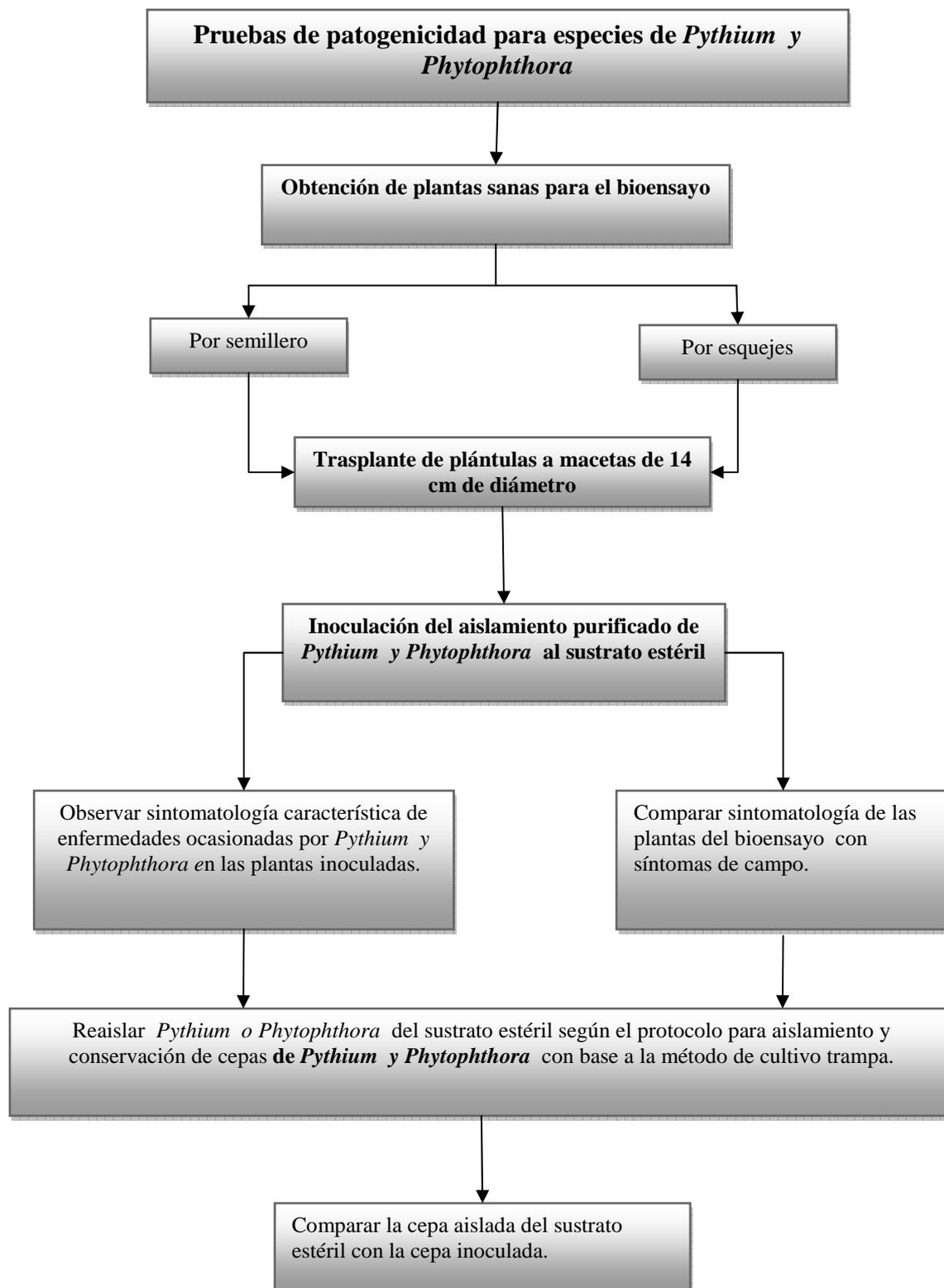


Figura 2.38A Diagrama de bloques para el proceso de pruebas de patogenicidad para especies de *Pythium* y *Phytophthora*.

### **CAPÍTULO III**

**INFORME DE SERVICIOS REALIZADOS EN EL LABORATORIO DE  
DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO DE LA UNIDAD DE NORMAS Y REGULACIONES,  
MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERÍA Y ALIMENTACIÓN.**

### 3.1 Presentación

Durante los meses comprendidos entre febrero y noviembre de 2007 se llevaron a cabo los servicios asignados en el Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la USAC (CDP-FAUSAC) y el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura. Según las necesidades en ese período, las actividades de servicio realizadas fueron:

- Elaboración del manual de procedimientos para el aislamiento de bacterias fitopatógenas.
- Gestión de Calidad para la certificación según la Normativa ISO-9001-2000 del Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación LFS.
- Realización de diagnósticos fitopatológicos de muestras ingresadas al CDPFAUSAC y LDF provenientes de usuarios particulares y de estudiantes que realizaron en ese período su EPS, como apoyo a su trabajo en campo.

## **3.2 Manual de Procedimientos para el Aislamiento e Identificación de Bacterias Fitopatógenas**

### **3.2.1 Objetivos**

- **General**

Desarrollar un manual de procedimientos para el aislamiento e identificación de bacterias fitopatógenas.

- **Específicos**

- Definir detalladamente cada fase del proceso de aislamiento e identificación de bacterias fitopatógenas.
- Integrar la información obtenida en un documento, que será parte de los manuales de procedimiento del CDP-FAUSAC.
- Estandarizar los procedimientos de aislamiento e identificación de bacterias fitopatógenas para garantizar el resultado confiable y en tiempo de los diagnósticos requeridos por los usuarios del Centro de Diagnostico Parasitológico de la Facultad de Agronomía.

### **3.2.2 Metodología**

Se reunió toda la información disponible acerca de procedimientos y técnicas para el aislamiento de bacterias fitopatógenas a través de consultas bibliográficas y consultas en línea, a través del servicio de Internet.

Se culminó esta actividad con el desarrollo del protocolo final, compilando todas las etapas del proceso y detallando cada una de ellas para que, finalmente, el documento quedara como parte de los procedimientos del laboratorio CDP-FAUSAC.

### **3.2.3 Resultados**

#### **3.2.3.A Introducción**

El siguiente manual describe los materiales, métodos y procedimiento a seguir para el aislamiento y diagnóstico de bacterias fitopatógenas en muestras analizadas en el Centro de Diagnóstico Parasitológico, con la finalidad de brindar al personal técnico del laboratorio una guía que permita llevar a cabo el proceso de análisis de bacterias para la ejecución del diagnóstico.

La fase de diagnóstico es de suma importancia por cuanto deberá garantizarse que los procedimientos sean tipificados desde el momento de la recepción de la muestra de la cual se requiere un análisis hasta el momento de la entrega de resultados.

#### **3.2.3.B Objetivo**

Estandarizar los procedimientos de recepción de muestras para garantizar el resultado confiable y en tiempo de los diagnósticos requeridos por los usuarios del Centro de Diagnóstico Parasitológico de la Facultad de Agronomía.

#### **3.2.3.C Materiales**

- Marcador permanente
- Algodón
- Área de lavado
- Refrigerador
- Campana de flujo laminar
- Pinzas
- Alcohol al 70%
- Hipoclorito de sodio al 0.3%
- Agua desmineralizada estéril
- Vidrios de reloj
- Varilla de agitación

- Hojas y mango de bisturí
- Cajas de petri
- Asa de nicromo en argolla
- Agujas de bisección
- KOH al 3%
- Colorantes para tinción Gram
- Colorante para tinción Verde de Malaquita
- Microscopio
- Laminas portaobjetos y cubreobjetos
- Lámpara de luz UV
- Placas con Agar B de King
- Placas con medio YDC
- Placas con medio Agar Nutritivo
- Incubadora
- Mechero
- Fósforos

### **3.2.3.D Procedimiento**

- Lave con agua del chorro las muestra vegetal manipulándola con sumo cuidado con el fin de quitar todas las partículas de suelo que puedan estar adheridas a la planta y que puedan interferir con el diagnostico.
- Haga un lavado de la muestra con agua desmineralizada para quitar cualquier resto que pueda haber quedado o cualquier impureza que pueda haber traído el agua corriente.
- Seleccione y separe las partes de la planta que contengan características de infección bacteriana.
- Con ayuda de una hoja de afeitar cortar un trozo de hoja o tallo 2.5 mm de largo x 2.5 mm de ancho y 0.5 mm de espesor de la zona de avance de la enfermedad.

- Colocar el trozo de material vegetal infectado en el centro de un portaobjetos y agregarle una gota de agua desmineralizada estéril.
- Cubrirla con un cubre procurando no englobar aire.
- Examinar al microscopio, procurando disminuir al máximo la iluminación con objeto de aumentar el contraste. El examen ha de ser lo más rápido posible, ya que con este método la preparación está expuesta a mayor número de corrientes que pueden desecarla con rapidez.
- Con esta técnica podemos determinar de una forma rápida si la enfermedad de la muestra es ocasionada por algún género de bacterias, ya que estas se mueven de manera rápida y desordenada por todo el campo del microscopio.

#### **A. Prueba de flujo bacteriano (PFB)**

- Desinfectar el material sumergiéndolo por 3 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 2%. Enjuagar tres veces con agua destilada.
- Cortar con un bisturí estéril en forma vertical a la zona afectada y obtener trozos pequeños de la zona en transición (es decir, tratando de abarcar tejido sano y tejido enfermo).
- Con una pinza, tomar un trozo de tejido y sumergirlo en una columna de agua contenida en un tubo de ensayo o vaso alto de cristal (beaker o erlenmeyer).
- Casi inmediatamente o a veces después de unos 5-10 minutos, comienza a fluir hacia abajo un hilo continuo en forma de humo. Son células bacterianas de uno o más vasos vasculares que luego se disipan en una nube lechosa. Si se observa con claridad, existe la posibilidad de que el agente causal del síntoma

sea una fitopatógena. La tinción y la observación microscópica son esenciales para comprobar la presencia de éstas.

## **A.1 Aislamiento y cultivo de bacterias**

### **Preparación de la muestra**

- Limpie la campana de flujo laminar con alcohol al 70%
- Prepare todo el material y equipo necesario para realizar el cultivo y colóquelo dentro de la campana de flujo laminar con el objeto de trabajar en condiciones asépticas y evitar interrupciones.
- Asegúrese que todo el equipo y materiales a utilizar este completamente estériles. (vidrios de reloj, beaker, pinzas, azas, cajas de petri con medio se cultivo y papel mayordomo).
- Desinféctese las manos con alcohol al 70% antes de ingresarlas dentro de la campana de flujo laminar para comenzar a trabajar.
- En vidrios de reloj estériles prepare la batería de desinfección de la siguiente manera:
  - Vidrio de reloj 1 : alcohol al 70%
  - Vidrio de reloj 2: agua desmineralizada estéril
  - Vidrio de reloj 3 : hipoclorito de sodio al 0.3%
  - Vidrio de reloj 4 y 5: agua desmineralizada estéril.
- Encienda 1 mechero bunsen y colóquelo a una distancia prudente al área de trabajo.
- Corte dentro de una caja de petri trozos 2.5 mm x 2.5 mm en la zona de avance de la enfermedad de la muestra vegetal. Para este proceso utilizar una pinza y un bisturí completamente estériles.

- Utilizando una pinza estéril introduzca 1 gramo de los trozos cortados de la muestra en el vidrio de reloj con alcohol al 70% y déjelo sumergido por 30 segundos.
- Seguidamente lave los trozos vegetales en el vidrio de reloj que contiene agua desmineralizada estéril.
- Con ayuda de la pinza traslade los pequeños trozos al vidrio con hipoclorito al 0.3% y deje actuar por 2 minutos.
- Finalmente para eliminar los restos de hipoclorito lave la muestra en los 2 últimos vidrios de reloj con agua desmineralizada estéril.

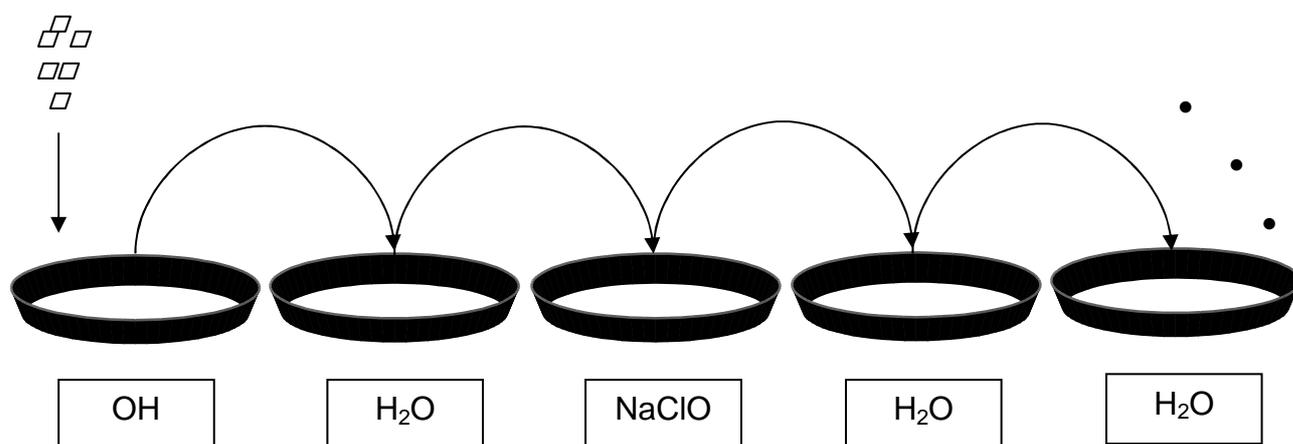


Figura 3.39 Batería de desinfección para análisis de muestras de bacterias.

- Elimine el exceso de agua de los trozos de la muestra y colóquelos en una caja petri de vidrio; con ayuda de la punta de la varilla de agitación estéril macháquelos hasta obtener una masa y agregue 1 mililitro de agua desmineralizada estéril. Con este paso se obtiene una dilución 1:10 de la muestra (fig. 3.39)

## A. 2 Inoculación en Medios de Cultivo.

- Introduzca un asa en argolla estéril dentro de la dilución 1:10 preparada de la muestra agitando a manera de homogenizar.

- Siembre para aislar, estriando una asada en una caja de petri conteniendo agar nutritivo (AN) y en otra conteniendo agar papa dextrosa (PDA). Realícelo por duplicado (fig. 3.40)

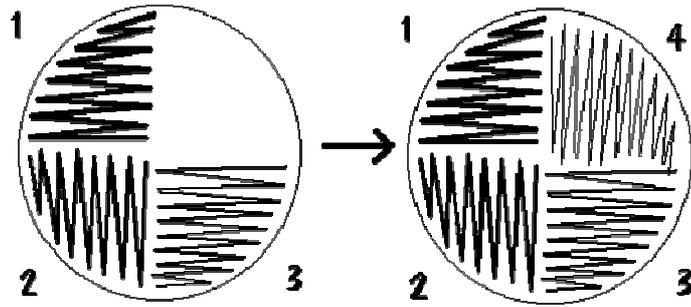


Figura 3.40 Estriado para siembra de bacterias.

- Incube a 28 °C revisando las cajas periódicamente cada 24 horas para observar crecimiento bacteriano.
- Transcurridas de 48 a 72 horas, observe las placas de cultivo en busca de colonias diferentes entre si. Observe diferencias en tamaño, forma, y color de la colonia y anote la descripción en la hoja de registro.
- con ayuda de una aguja de disección tomar una porción de cada colonia diferente y reaísle en agar nutritivo, B de King, agar YDC, agar D1M y Medio Hugh & Leifson. Incube de nuevo a 28 °C por 48 a 72 horas.

### A.3 Pruebas para la Identificación de Géneros

#### Prueba KOH

- Con un asa en argolla tome una porción de la colonia bacteriana reaislada en el medio agar nutritivo (cultivo de 48 a 72 horas).
- Coloque la asada de la colonia de bacterias en un portaobjetos y agregue una gota de KOH al 3%.

- Con una aguja de disección mezcle bien. Si el líquido se pone pegajoso y forma hilo el resultado es positivo (Gram Negativo). Si no es pegajoso ni forma hilos el resultado es negativo (Gram Positivo).

### **Tinción Gram**

- Distribuya en una gota de agua estéril una asada del cultivo de la bacteria en estudio sobre un portaobjeto, fije la bacteria flameando cuidadosamente con ayuda de un mechero.
- Añada una gota de la solución de cristal violeta encima de la bacteria fijada y déjelo reposar 1 minuto.
- Lave con agua el portaobjetos eliminando el colorante y posteriormente adicione una gota de la solución de lugol espere 1 minuto.
- Aplique etanol al 95% gota a gota hasta que no salga mas colorante.
- Lave rápida y cuidadosamente el frote con agua.
- Agregue una gota de safranina al 1% y espere 1 minuto.
- Lave con agua y seque.
- Observe en el microscopio para asegurarse de la coloración adoptada. Las estructuras que muestren coloración azul o violeta son Gram positivo y las que muestren coloración roja o rosada son Gram negativo.

### **Crecimiento en Anaerobiosis (Medio Hugh & Leifson)**

- Tome con un asa en punta una parte de la colonia bacteriana a evaluar (cultivo de 48 a 72 horas) y pinche el medio sin tocar el fondo del tubo.
- Coloque en la incubadora a 28 °C durante 24 a 48 horas. Realice por duplicado.

- Agregue aceite mineral o parafina líquida para evitar el contacto con el oxígeno que puede quedar dentro del tubo de ensayo.
- El crecimiento es positivo si se observa evidencia alrededor de la punción o turbidez en el medio de cultivo
- La movilidad es positiva si se observa turbidez en el medio; y negativo si el crecimiento se restringe al área de la punción.
- Si el medio vira o cambia de color (azul o amarillo) el metabolismo es positivo para la fermentación.

### **Tinción de Esporas (verde de malaquita)**

- Coloque una gota de suspensión acuosa en un portaobjetos y deje secar
- Fije la preparación flameando cuidadosamente 3 veces.
- Cubra completamente la lamina con verde de malaquita y caliente hasta liberar vapores manteniéndola de esta forma de 5 a 10 minutos.
- Lave con agua corriente y agregue safranina dejándola actuar durante 30 segundos.
- Lave nuevamente con agua corriente y deje secar la lamina.
- Observe las células bacterianas teñidas de color rosado o rojo y las esporas de verde.

DIAGRAMA DE FLUJO PARA EL PROCESO MICROBIOLÓGICO

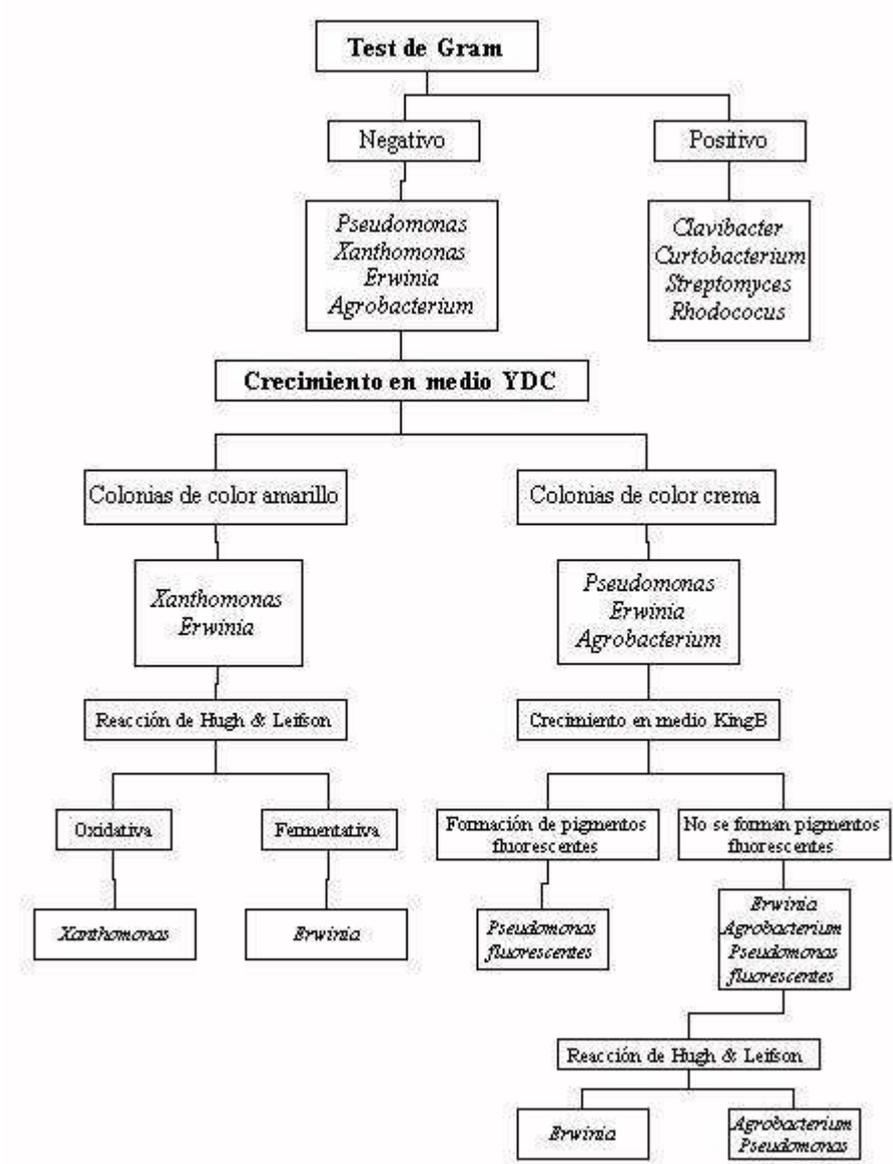


Figura 3.41 Diagrama de flujo para el proceso microbiológico.

CLAVE PARA GÉNEROS COMUNES DE BACTERIAS FITOPATOGENAS

- 1 (a) Formación de micelio aéreo constituido por tres o mas esporas. Tinción Gram positiva pero no por fijación alcohol – ácido..... **Streptomyces**
- 1 (b) Ausencia de micelio. Tinción Gram positiva o Gram negativa....2

2 (a)	Colonias con coloración amarilla o naranja en medio YDC.....	3
2 (b)	Colonias con coloración diferente a la anterior.....	4
3 (a)	Tinción Gram positiva. Aerobia obligada.....	<b>Clavibacter</b>
3 (b)	Tinción Gram negativa. Aerobia obligada .....	<b>Xanthomonas</b>
4 (a)	Formación de pigmentos fosforescentes en medio B de King. Gram negativas.....	<b>Pseudomonas</b> <b>Burkholderia</b>
4 (b)	Sin formación de pigmentos fosforescentes en medio B de King.....	5
5 (a)	Crecimiento anaerobio obligado con formación de endosporas. Tinción Gram positiva. En caso de crecer en aerobiosis su crecimiento es limitado y se inhibe la formación de esporas.....	<b>Clostridium</b>
5 (b)	Crecimiento aerobio.....	6
6 (a)	Formación de endosporas. Crecimiento aerobio o Anaerobio facultativo.....	<b>Bacillus</b>
6 (b)	Sin formación de endosporas.....	7
7 (a)	Desarrollo sobre medio D1M.....	<b>Agrobacterium</b>
7 (b)	No se desarrolla sobre medio D1M.....	8
8 (a)	Aerobias facultativas.....	<b>Erwinia</b>
8 (b)	Aerobias obligadas.....	<b>Ralstonia</b>

## Medios de Cultivo

- **Agar Nutritivo**

- Extracto de carne	1.0 g
- Extracto de levadura	2.0 g
- Peptona	5.0 g
- Cloruro de sodio (NaCl)	5.0 g
- Agar	15.0 g
- Agua desmineralizada	1000.0 ml

Disolver los ingrediente en el agua desmineralizada por calentamiento y evaluar si el pH se encuentra entre los 6-8.

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos en un autoclave y colocar en cajas de petri.

Si el agar nutritivo es comercial disuelva 20 g en un litro de agua desmineralizada, o según las recomendaciones del proveedor.

- **Agar B de King**

- Peptona proteosa	20.0 g
- Fosfato dipotasico $K_2HPO_4$	1.8 g
- Sulfato heptahidratado de magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.5 g
- Agar	15.0 g
- Glicerol	10.0 ml
- Agua destilada	990 ml

Disolver los ingrediente en el agua desmineralizada por calentamiento y evaluar si el pH se encuentra entre los 6-8.

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos en un autoclave y colocar en cajas de petri, deje enfriar y almacénelas a 2-8 °C .

- **Medio YDC (extracto de levadura, dextrosa y carbonato de calcio)**

- Extracto de levadura	2.0 g
- Dextrosa (glucosa)	20.0 g
- Carbonato de Calcio (USP)	20.0 g
- Agar	15.0 g
- Agua desmineralizada	1000.0 ml

Esterilice el preparado en autoclave a 121<sup>o</sup>C por 15 minutos, para obtener el medio de color uniforme déjelo en el erlenmeyer hasta que enfrié mas o menos a 50 <sup>o</sup>C después de autoclavar y colóquelo en cajas petri, mezclando continuamente el medio. Se recomienda que el carbonato de calcio sea el ultimo ingrediente que se agregue después de disolver los otros componentes por calentamiento.

- **Medio de Hugh-Leifson**

-		
-	Peptona de caseína	2.0 g
-	Extracto de levadura	1.0 g
-	Cloruro sódico NaCl	5.0 g
-	Fosfato dipotásico KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (tampón)	0.3 g
-	Azul de bromotimol (solución 1%)	3.0 ml
-	Glucosa	10.0 g
-	Agar	3.0 g
-	Agua destilada	1000 ml
-	pH final: 7,0	

- Disolver los ingredientes en el agua desmineralizada por calentamiento y ajustar el pH a 7.1

- Esterilizar a 121 °C por 20 minutos en un autoclave y colocar en tubos de 13 cm de largo 9 ml del medio semisólido déjelo enfriar y almacénelo.

- **Agar Christensen urea**

Peptona neutra	1.0 g
- Glucosa	1.0 g
- Cloruro de Sodio NaCl	5.0 g
- Fosfato diácido de potasio KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0 g
- Rojo fenol	0.012 g
- Agar	12.0 g
- Agua destilada	1000.0 ml
- Solución acuosa de urea al 40%	5 ml
- pH final: 6.8 – 6.9	

Esterilice el preparado en autoclave a 121<sup>0</sup>C por 15 minutos, para obtener el medio de color uniforme déjelo en el erlenmeyer hasta que enfrié más o menos a 50 °C después de autoclavar y adicione la solución acuosa de urea al 40% mezcle bien y coloque 1 ml de la solución del caldo en tubos de ensayos de vidrio con rosca.

### 3.2.4 Evaluación

Se llegaron a cumplir los objetivos en su totalidad, generando un documento que reúne paso a paso, el proceso completo para el aislamiento de bacterias fitopatógenas, así como los materiales y procedimientos para la elaboración de los medios de cultivo requeridos en este proceso.

### **3.3 Gestión de Calidad para la certificación según la Normativa ISO-9001-2000 del Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación**

#### **3.3.1 Objetivos**

- General

Establecer la metodología o lineamientos de los procesos de Gestión de Calidad para la certificación según la Normativa ISO-9001-2000 del Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación.

- Específicos
  - Establecer la metodología o lineamientos para la recepción, ingreso, análisis y entrega de resultados de las muestras agrícolas que ingresan al Laboratorio para el diagnostico fitosanitario.
  - Realizar el manual de procedimiento para el llenado del formulario de ingreso de muestras al Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario ( FTS-03-R-002).
  - Elaborar un instructivo que brinde la información requerida para ingresar la información en el Libro de Recepción de Muestras (FTS-03-D-003).
  - Elaborar un instructivo que brinde la información requerida para ingresar la información en el Libro de Control de Muestras Rechazadas (FTS-03-D-002)
  - Elaborar un instructivo que brinde la información requerida para ingresar la información en el Libro de Custodia (FTS-03-D-004).
  - Elaborar un instructivo que brinde la información requerida para ingresar la información en el Libro de Resultados.

- Elaborar un flujograma de rutas que toma una muestra al momento de ser ingresada para su respectivo análisis hasta la emisión de su resultado.

### **3.3.2 Metodología**

Con la finalidad de facilitar y agilizar el proceso de recepción e ingreso de muestras y emisión de resultados de los análisis correspondientes, se elaboraron los instructivos de gestión de calidad en base a los formularios y libros de control oficiales del Laboratorio Fitosanitario del Ministerio de Agricultura.

Se describieron los procesos para los siguientes formularios y libros de control:

- Formulario de ingreso de muestras ( FTS-03-R-002).
  - Libro de Recepción de Muestras (FTS-03-D-003).
  - Libro de Control de Muestras Rechazadas (FTS-03-D-002)
  - Libro de Custodia (FTS-03-D-004).
  - Libro de Resultados
- a. Se realizó un instructivo para el ingreso de la muestra a la base de datos.
- b. Se elaboró un flujograma de rutas que toma una muestra al momento de ser ingresada para su respectivo análisis hasta la emisión de su resultado.

### 3.3.3 Resultados

#### REGISTRO DE CONTROL DE DOCUMENTOS

Cuadro 3.12 Listado de documentos y registros del Laboratorio de Diagnostico

Código	Nombre del Documento	Tiempo de Archivo	Lugar de Retención
Fitosanitario.			
FTS-03-R-001	Control de Documentos y Registros	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-R-002	Formulario para el ingreso de muestras al laboratorio para su diagnostico.	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-R-003	Emisión de Resultados	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-D-002	Control de Muestras de Rechazadas	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-D-003	Libro de Recepción de Muestras	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-D-004	Libro de Custodia	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-D-006	Libro para Ingreso a la Base de Datos	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-I-001	Instructivo para el formulario de Ingreso de muestras al laboratorio para su diagnostico fitosanitario	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-I-002	Instructivo para la boleta de control de muestras rechazadas	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-I-003	Instructivo para ingreso al libro de Recepción de muestras	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-I-004	Instructivo para el llenado del Libro de Custodia	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-I-005	Instructivo para el ingreso de resultados a la base de datos	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-I-006	Instructivo para la Emisión de Resultados de diagnostico fitosanitario	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico
FTS-03-P-001	Procedimiento de Recepción, Análisis y Entrega de Resultados de Diagnóstico Fitosanitario	Revisión anual	Archivo Físico y electrónico

## PROCEDIMIENTO DE RECEPCION, ANALISIS Y ENTREGA DE RESULTADOS DE DIAGNOSTICO FITOSANITARIO

### 1. OBJETIVO

Establecer la metodología o lineamientos para la recepción, ingreso, análisis y entrega de resultados de las muestras agrícolas que ingresan para el diagnóstico fitosanitario.

### 2. ALCANCE

Aplica para la recepción, ingreso, análisis y entrega de resultados de todas las muestras que ingresan al laboratorio para su diagnóstico fitosanitario.

### 3. ABREVIATURAS:

ABREVIATURAS	DEFINICION
MAGA	Ministerio de Agricultura Ganadería y Alimentación
UNR	Unidad de Normas y Regulaciones
OIRSA	Organismo Internacional de Sanidad Agropecuaria
SEPA	Servicios de Protección Agropecuaria
VISAN	Vice - Ministerio de Seguridad Alimentaria y Nutrición
PROFRUTA	Proyecto para el Desarrollo de la Fruticultura
INAB	Instituto Nacional de Bosques
PIPAA	Programa Integral de Protección Agropecuaria y Ambiental
LDF	Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario
DA	Diagnóstico Acarológico
DE	Diagnóstico Entomológico
DF	Diagnóstico Fitopatológico
DM	Diagnóstico de Malezas
DN	Diagnóstico en Nematodos

#### 4. RESPONSABILIDADES:

Todo ejecutor de este procedimiento, persona asignada o en funciones encargados de realizar la recepción, ingreso, análisis y entrega de resultados de todas las muestras que ingresan al laboratorio para su diagnóstico fitosanitario.

#### 5. DEFINICIONES:

**Diagnóstico Fitosanitario:** Procedimiento para determinar la presencia o ausencia de una plaga o enfermedad en mercancías agrícolas.

**Diagnóstico Nematológico:** Procedimiento en el cual se determina la presencia o ausencia y la determinación taxonómica del espécimen encontrado. Herramienta que sirve para determinar el status de plagas cuarentenadas, no cuarentenada en los diferentes cultivos del sector agrícola.

**Diagnóstico Fitopatológico:** Proceso mediante el cual se realiza el análisis propio del laboratorio para la detección de enfermedades, provocadas por agentes fitopatógenos identificados como parásitos en los cultivos agrícolas y forestales

**Diagnóstico Acarológico:** Procedimiento en el cual se determina la presencia o ausencia y la determinación taxonómica del espécimen encontrado. Herramienta que sirve para determinar el status de plagas cuarentenadas y no cuarentenada en los cultivos del sector Agrícola, Forestal, Granos almacenados y Envíos que se importan y exportan al país.

**Diagnóstico Entomológico:** Procedimiento en el cual se realiza el análisis para la determinación de plagas cuarentenadas, endémicas y exóticas en todos los cultivos del sector Agrícola y Forestal.

**Diagnóstico de Semillas de Malezas:** Procedimiento en el cual se determina la presencia o ausencia y la determinación taxonómica de semillas de malezas encontradas. Herramienta que sirve para determinar el status de la semilla de maleza

cuarentenadas, no cuarentenada en los envíos de origen agrícola de importación y exportación.

**Usuario:** Empresas agrícolas, ONG, productores, Comerciantes, sector oficial y personas individuales que demandan el servicio de diagnóstico fitosanitario.

**Muestra:** Conjunto de casos o individuos procedente de una población que cumple las siguientes características: La muestra debe ser representativa de la población de estudio. Para cumplir esta característica la inclusión de sujetos en la muestra debe seguir una técnica de muestreo.

#### **Información Taxonómica:**

- Información sobre la taxonomía de la plaga pertinente e incluye: el nombre (nombre científico actual, autor y año)
- los sinónimos (incluyendo los nombres anteriores)
- Los nombres comunes aceptados
- La posición taxonómica (incluyendo información sobre clasificación de subespecies).

#### **Detección:**

- Brinda información y orientación sobre:
- Las plantas, productos vegetales u otros artículos capaces de albergar plagas.
- Los signos y/o síntomas asociados con la plaga (rasgos característicos, diferencias o similitudes con los signos y/o síntomas por otras causas), incluyendo ilustraciones, cuando sea apropiado.
- La parte o partes de la planta, productos vegetales u otros artículos en los cuales se pueda encontrar la plaga.
- Las etapas de desarrollo de la plaga que puedan detectarse, junto con su posible abundancia y distribución en las plantas/productos vegetales u otros

artículos.

- La posible presencia de la plaga asociada con etapas de desarrollo de los hospedantes, las condiciones climáticas y la estacionalidad.
- Los métodos de detección de la plaga en el producto básico (por ejemplo, visual, lupa de mano)

### **Determinación:**

- Este apartado brinda información y orientación sobre métodos que ya se utilizan en forma individual o combinada conducen a la identificación de la plaga. Cuando se mencionan diversos métodos, se indican sus ventajas/desventajas, así como la medida en que dichos métodos o combinaciones de métodos son equivalentes. Si se requieren diversos métodos para identificar la plaga o se incluyen diferentes métodos alternativos se puede presentar un diagrama de flujo.
- Los tipos principales de metodologías utilizadas en las técnicas de diagnóstico incluyen aquellas que se basan en características morfológicas y morfométricas, propiedades biológicas como la virulencia o el rango de hospedante de una plaga, y aquellas basadas en propiedades bioquímicas y moleculares.

## **6. DOCUMENTOS INTERNOS:**

FTS-03-R-002	Formulario para Ingreso de muestras al laboratorio para diagnóstico fitosanitario.
FTS-03-D-001	Guía de la Toma, preservación y envío de muestras al Laboratorio.
FTS-03-D-002	Control de muestras rechazadas
FTS-03-D-003	Libro de recepción de muestras
FTS-03-D-004	Libro de Custodio
FTS-03-D-005	Guía Técnica para la preparación de muestras.
FTS-03-D-006	Ingreso de resultados a la Base de Datos
FTS-03-R-003	Informe de Resultados
FTS-03-I-001	Instructivo para el Formulario de ingreso de muestras al

laboratorio de diagnostico fitosanitario.

FTS-03-I-002	Instructivo para la boleta de control de muestras rechazadas
FTS-03-I-003	Instructivo para ingreso al libro de recepción de muestras
FTS-03-I-004	Instructivo para el llenado del libro de custodio
FTS-03-I-005	Instructivo para ingreso de resultados a la base de datos
FTS-03-I-006	Instructivo de llenado de boleta de resultados

## 7. DESCRIPCIÓN

- El usuario entrega la muestra al encargado de recepción y llena la información requerida en el formulario de ingreso (FTS-03-R-002).
- El técnico de laboratorio revisa la muestra según la guía técnica de Toma, preservación y envío de muestras al laboratorio (FTS-03-D-001).
- El responsable de la recepción de muestras de acuerdo a las condiciones de la muestra toma la decisión de ingresarla o rechazarla. Se rechaza si no cumple con los requerimientos descritos en la guía técnica para la toma, preservación y envío de muestras al laboratorio (FTS-03-D-001).
- Si la muestra no cumple con las condiciones descritas en la guía técnica para la toma, preservación y envío de muestras al laboratorio (FTS-03-D-001), que son las necesarias para realizar el diagnostico, se rechaza, codifica, se anota en el control de muestras rechazadas y se le informa y devuelve la muestra con las observaciones del porque se rechazó la muestra al usuario (FDS-03-D-002).
- Si la muestra cumple con las condiciones requeridas en la guía técnica para la toma, preservación y envío de muestras al laboratorio (FTS-03-D-001). El técnico de laboratorio procede a realizar el ingreso y codificación en el libro de recepción de muestras (FTS-03-D-003).
- El técnico de laboratorio envía la información de la muestra ingresada a la responsable de la base de datos para que esta sea registrada en el libro de custodia (FTS-03-D-004).

- El técnico de laboratorio prepara la muestra según Guía Técnica de preparación de muestras para diagnóstico fitosanitario (FTS-03-D-005).
- La muestra preparada para su análisis se procede a distribuirla al o a los analistas responsables de realizar el análisis correspondiente utilizando para el diagnóstico claves dicotómicas y artículos científicos.
- El o los analistas responsables proceden a realizar el diagnóstico de la muestra según el análisis requerido por el usuario para determinar la presencia de un organismo vivo.
- El resultado del análisis realizado se entrega a la responsable de la base de datos quien lo ingresa en el libro de ingreso de muestras a la base de datos FTS-03-D-006.
- La responsable de la base de datos envía el resultado de la muestra a la secretaria administrativa.
- La secretaria administrativa realiza la emisión de los resultados de los diagnósticos según el registro código FTS-03-R-003 y entrega al Jefe del Laboratorio para su revisión, autorización y firma del registro de informe de resultados, código FTS-03-R-003.
- La responsable de la base ingresa los resultados del diagnóstico fitosanitario a la base de datos para su archivo (FTS-03-D-006).
- La secretaria administrativa entrega de resultados del diagnóstico fitosanitario al usuario.

## **INSTRUCTIVO PARA EL FORMULARIO DE INGRESO DE MUESTRAS AL LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO FITOSANITARIO**

### **OBJETIVO:**

Dearrollar un instrumento que proporcione la información necesaria al personal técnico que realiza los diagnósticos fitosanitarios para el ingreso de muestras al laboratorio.

### **DESCRIPCIÓN DEL FORMULARIO:**

En el Formulario **FTS-03-R-002** se proporciona la información necesaria de los datos mas relevantes del cultivo, y que son de utilidad para el personal técnico que realiza los diagnósticos, así mismo proporciona datos específicos de ubicación para una posterior referencia del personal del campo, quienes eventualmente toman las acciones a seguir a partir del diagnóstico de laboratorio.

### **Muestra No:**

Se refiere al número correlativo que se le asigna a la muestra que ingresa al Laboratorio.

### **Fecha:**

En esta casilla se anota el día, mes y año, en el que ingresa la muestra al laboratorio.

### **1. Usuario o empresa:**

Persona individual u Organización constituida legalmente que se dedica a actividades industriales, mercantiles o de prestación de servicios con fines lucrativos.

En esta Casilla se indican los datos de la persona o empresa que requiere el diagnostico fitosanitario.

### **Teléfono:**

Se refiere al numero de telefónico del Usuario / Empresa.

**Correo electrónico:**

Se refiere al correo electrónico del usuario / Empresa si no cuenta con dicho servicio la casilla se deja en blanco.

**2. Persona que toma la Muestra:**

En este espacio se escribirá el nombre del responsable que a recolectado dicha muestra.

**Teléfono:**

Se refiere al Número de Telefónico del responsable que a recolectado la muestra.

**Correo Electrónico:**

Se refiere al correo electrónico de la persona que a recolectado dicha muestra.

**3. Procedencia de la muestra (Departamento):**

Se debe anotar el nombre del departamento donde se realice el muestreo.

**Municipio:** Se debe anotar el nombre del municipio donde se realice la toma de la muestra.

**Aldea:** Se refiere al nombre del caserío donde se realice el muestreo

**Finca:** Se refiere al nombre de la finca donde se realice el muestreo

**4. Coordenadas X\_\_\_Y\_\_\_:**

Georeferenciación UTM se anotan los datos que proporciona el GPS ubicado en el punto que se ha realizado el muestreo.

**Cultivo:** Es toda clase de especie vegetal cultivada en un campo, generalmente con fines económicos. Se refiere al tipo de muestra que ingresa al laboratorio para su respectivo diagnóstico.

**Cultivo anterior:**

Se refiere al cultivo igual o diferente al actual que fue establecido en la misma área.

**5. FASE FENOLÓGICA (al tomar la muestra)**

Se refiere a la etapa de desarrollo en cual se encuentra el cultivo al momento de tomar la muestra.

**6. COMPORTAMIENTO DE LA ENFERMEDAD O PLAGA: Regional:**

Se refiere a la manifestación de la enfermedad en puntos localizados.

**En el Cultivo:**

**Uniforme:** Se refiere si la enfermedad o plaga está difundida en todo la plantación.

**Manchones o Parche:** Se refiere al comportamiento de la enfermedad o plaga en cultivo en puntos localizados.

**Plantas Aisladas:** Se refiere al comportamiento de la enfermedad o plaga que se encuentra en un lugar específico.

**7. SINTOMATOLOGÍA:** En esta casilla se debe seleccionar cual es el estado de la muestra para analizar si presenta los siguientes síntomas:

- Acolochamiento
- Marchites
- Clorosis
- Necrosis
- Acaparamiento
- Pudrición
- Moteado
- Mancha Foliar
- Nódulos Radiculares
- Agallas
- Minas
- Otros

**8. Tipo de análisis:**

En esta casilla se debe de seleccionar el tipo de análisis que requiere dicha muestra:

→ Entomológico

→ Nematológico

→ Fitopatológico

→ Bacteriológico

→ Acarológico

→ Maleza

→ Otros

**9. Observaciones:**

Información que se desea aportar relacionada a la muestra o el análisis.

**Nombre del Receptor:**

Se debe de anotar, el nombre de la persona que ha revisado la información y la muestra para ver si cumple con el requisito necesario para su análisis.

**Nombre Enterante:**

Se debe de anotar el nombre de la persona que entrega la muestra al laboratorio para su respectivo análisis.

**Anexo**

Formulario de ingreso de muestras al laboratorio de diagnóstico Fitosanitario FTS-03-R-002

## **INSTRUCTIVO PARA LA BOLETA DE DE CONTROL DE MUESTRAS RECHAZADAS:**

### **1. OBJETIVO:**

Desarrollar un registro que proporcione la información necesaria al personal técnico que realiza los diagnósticos fitosanitarios un control de las muestras que no cumplieron con las condiciones establecidas por el laboratorio.

### **2. DESCRIPCIÓN DEL FORMULARIO:**

El formulario **FTS-03-D-002** proporciona la información de las muestras ingresadas a laboratorio que por diversas razones no fueron analizadas, pero que ya cuentan con una asignación de correlativo dentro de la base de datos del Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario.

#### **Fecha:**

En esta casilla se debe escribir la fecha por día, mes y año, en que la muestra ingreso al laboratorio.

#### **Código:**

Es el número que se le va asignar a la muestra rechazada. M=Muestra, R= Rechazo.

#### **Usuario y/o Empresa:**

Organización constituida legalmente que se dedica a actividades industriales, mercantiles o de prestación de servicios con fines lucrativos.

En esta casilla se llenan los datos de la persona o empresa de la que requiere el diagnostico.

#### **Inspector:**

Funcionario público, privado o particular que tiene a su cargo la vigilancia y la inspección de las mercancías agrícolas.

Indica el nombre exacto de la persona que colecto la muestra.

**Cultivo:**

Es toda clase de especie vegetal cultivada en un campo, generalmente con fines económicos.

Es el tipo de muestra que ingresa al laboratorio para su respectivo diagnóstico.

**Ubicación:**

Conformada por la siguiente información:

Departamento: Se debe escribir el nombre del departamento donde se realice el muestreo.

Municipio: Debe escribirse el nombre del municipio donde se realice la toma de muestra.

Aldea: Escribir el nombre del caserío, si tiene en donde se ubique.

Finca: Nombre que tiene la finca para ubicarla en caso de muestreo.

**Condición de la Muestra:**

Descripción paso a paso la definición de cómo viene físicamente la muestra para el análisis.

Se especifica el empaque en donde viene la muestra.

Ejemplo: bolsa plástica, vial, costal, etc.

**Análisis Requerido:**

Es el tipo de análisis que solicito para dicha muestra.

Ejemplo: Entomológico, Fitopatológico, Nematológico, Bacteriológico Acarológico.

**Quién recibe y revisa la muestra:**

Aquí se escribirá el nombre de la persona que recibe y revisa la muestra cuando ingreso al laboratorio para su respectivo análisis

**Observaciones por qué fue rechazada la muestra:**

Se describirá las condiciones de la muestra por el cual fue rechazada.

**INSTRUCTIVO PARA INGRESO AL LIBRO DE RECEPCIÓN DE MUESTRAS**

**OBJETIVO:**

Desarrollar una herramienta útil para asistir en el ingreso de información de las boletas de recepción de muestras vegetales, al libro de ingreso y posteriormente a la base de datos del laboratorio.

**DESCRIPCIÓN DEL FORMULARIO:**

El Formulario **FTS-03-D-003** asiste al técnico de recepción de muestras al correcto ingreso de la información proveniente de las boletas de recepción para el ingreso de las mismas al libro de registro de recepción de muestras.

**Fecha:**

En esta casilla se debe escribir la fecha por día, mes y año, en que la muestra ingreso al laboratorio.

**Código LDF:**

Es una combinación de tres series, la primera conformada por tres letras, las otras dos series por números. La primera serie corresponde a las siglas del Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario-LDF-, la segunda, al numero correlativo de ingreso de la muestra y la tercera se refiere al año.

**Empresa:**

Organización constituida legalmente que se dedica a actividades industriales, mercantiles o de prestación de servicios con fines lucrativos.

En esta Casilla se llenan los datos de la persona o empresa de la que requiere el diagnóstico.

**Usuario:**

Empresa, técnico, inspector y persona individual que demandan el servicio de diagnóstico fitosanitario.

**Inspector:**

Funcionario público, privado o particular que tiene a su cargo la vigilancia y la inspección de las mercancías agrícolas.

Indica el nombre exacto de la persona que colecta la muestra.

**Cultivo:**

Es toda clase de especie vegetal cultivada en un campo, generalmente con fines económicos.

Es el tipo de muestra que ingresa al laboratorio para su respectivo diagnóstico.

Ejemplo: papa, haba, maíz, Maleza, etc.

**Ubicación:**

Esta casilla se compone de la siguiente información:

Departamento: Se debe escribir el nombre del departamento donde se realice el muestreo.

Municipio: Debe escribirse el nombre del municipio donde se realice la toma de muestra.

Aldea: Escribir el nombre del caserío, si tiene en donde se ubique.

Finca: Nombre que tiene la finca para ubicarla en caso de muestreo.

**Descripción de la Muestra:**

Es la que debe describir paso a paso la definición de cómo viene físicamente la muestra para el análisis.

Se especifica el empaque en donde viene la muestra.

Ejemplo: bolsa plástica, vial, costal etc.

**Análisis Requerido:**

Es el tipo de análisis que solicito para dicha muestra.

Ejemplo: Entomológico, Fitopatológico, Nematológico, Bacteriológico, Acarológico.

**Georeferenciación mediante el método de proyección geográfica transversa de Mercator –UTM-**

Se escriben los datos que proporciona el GPS, ubicando la posición georeferencial, del punto donde se tomo la muestra.

En esta casilla se escriben los números completos de las coordenadas correspondientes del punto que identifican el lugar exacto donde se tomaron los datos.

**Quién recibe y revisa la muestra:**

Aquí se escribirá el nombre de la persona que recibe y revisa la muestra cuando ingresa al laboratorio para su respectivo análisis

**OBSERVACIONES:**

Nota que lleva la muestra para precisar en un punto dudoso.

## INSTRUCTIVO PARA EL LIBRO DE CUSTODIO

### **OBJETIVO:**

Desarrollar un registro que proporcione la información necesaria al personal técnico que realiza los diagnósticos control del tiempo transcurrido entre la fecha de ingreso, preparación y distribución de la muestra.

### **DESCRIPCIÓN DEL FORMULARIO:**

El Formulario **FTS-03-D-004** permite al técnico de recepción de muestras la correcta distribución de las muestras a cada analista para su respectivo análisis fitosanitario.

### **Fecha:**

En esta casilla se debe escribir la fecha exacta por día, mes y año, que ingreso al laboratorio.

### **Descripción de la Muestra:**

Es la que debe describir paso a paso la definición de cómo viene físicamente la muestra para el análisis.

Se especifica el empaque en donde viene la muestra. Ejemplo: bolsa plástica vial, costal etc.

### **Código:**

Es el número que se le asigna para identificar cada muestra. El primer dígito es D que significa Diagnóstico. El segundo dígito identifica el tipo de análisis que es requerido. 07 año de ingreso de la muestra al laboratorio, y 01 número correlativo de la muestra.

### **Analista que Recibe la muestra:**

**Nombre:**

El nombre es una denominación que tiene una persona o que se le da a una cosa o a un concepto intangible, para distinguirla de otras. Los nombres se eligen de forma breve, para que la identificación de la persona, cosa o concepto sea fácil y rápida.

En esta casilla la identificamos con la primer sigla de nombre y la primera de apellido del la persona encargada de realizar el análisis.

**Análisis Nematológico****Fecha:**

En esta casilla se escribe el día, mes, año, en que recibe la muestra el analista.

**Firma:**

Nombre y apellido de una persona que esta pone con rúbrica al pie de un escrito:

En esta casilla firma el analista que recibió la muestra.

**Análisis Fitopatológico****Fecha:**

En esta casilla se escribe el día, mes, año, en que recibe la muestra el analista.

**Firma:**

Nombre y apellido de una persona que esta pone con rúbrica al pie de un escrito:

En esta casilla firma el analista que recibió la muestra.

**Análisis Acarológico****Fecha:**

En esta casilla se escribe el día, mes, año, en que recibe la muestra el analista.

**Firma:**

Nombre y apellido de una persona que esta pone con rúbrica al pie de un escrito:

En esta casilla firma el analista que recibió la muestra.

**Análisis de Malezas****Fecha:**

En esta casilla se escribe el día, mes, año, en que recibe la muestra el analista.

**Firma:**

Nombre y apellido de una persona que esta pone con rúbrica al pie de un escrito:

En esta casilla firma el analista que recibió la muestra.

## INSTRUCTIVO PARA EL INGRESO DE RESULTADOS A LA BASE DE DATOS

### OBJETIVO:

Elaborar una guía que permita y facilite el ingreso de la información general a la base de datos de los resultados de los diagnósticos que se realizan en el laboratorio.

### DESCRIPCIÓN:

El Formulario FTS-03-D-006 recopila información de la muestra que ingresa al laboratorio y que ha de procesarse para análisis fitosanitario. En el mismo se incluyen los resultados emitidos por la persona encargada del diagnóstico, el método utilizado que lo condujo a dicho resultado e indica el destino final de la muestra después de haber sido procesada.

**Fecha de ingreso:** En esta casilla se anota el día, mes y año, en el que ingresa la muestra al laboratorio.

**Código de muestra:** Es una combinación de tres series, la primera conformada por letras, las otras dos series conformadas por números. La primera serie corresponde a las siglas del Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario -LDF-, la segunda, al numero correlativo de ingreso de la muestra y la tercera se refiere al año.

**Responsable de diagnóstico:** Define firma e iniciales del analista.

**Iniciales del analista:** Se refiere a las iniciales del primer nombre y primer apellido del analista responsable de diagnóstico.

**Firma:** El analista aprueba la integridad de sus resultados colocando su firma en la casilla correspondiente.

**Resultado Taxonómico:** clasificación taxonómica del espécimen analizado.

**Orden:** Dentro de la taxonomía, se refiere al orden al que pertenece el agente causal.

**Familia:** Dentro de la taxonomía, se refiere a la familia a la que pertenece el agente causal.

**Género:** Dentro de la taxonomía, se refiere al género al cual pertenece el agente causal.

**Especie:** Dentro de la taxonomía, se refiere a la especie al cual pertenece el agente causal.

**Método Utilizado:** Se refiere a la metodología utilizada que conduce a la obtención del resultado de diagnóstico.

**Código Cuaderno:** Es la serie utilizada como control personal que corresponde a la muestra procesada por cada analista.

**Fecha de entrega de resultados:** Se indica el día, mes y año en que se completo el análisis y fue entregado a la persona correspondiente de ingresar los datos.

### **Expediente a archivo**

**Fecha entrega a la secretaria:** Se indica el día, mes y año en que fue entregado el resultado del análisis a la persona encargada de elaborar el informe de diagnóstico.

**Firma:** La secretaria administrativa firma en la casilla correspondiente para dar fe de que recibió el resultado.

**Muestra:** Mercancía agrícola que ingresa el usuario para su análisis.

**Alamcenada:** Se indica si la muestra es almacenada como respaldo del análisis efectuado.

**Descartada:** Esta casilla es utilizada para indicar si la muestra es desechada por condiciones de deterioro.

**Observaciones:** Información que se desea aportar relacionada a la muestra o el análisis.

## **INSTRUCTIVO PARA LA BOLETA DE EMISION DE RESULTADOS**

### **OBJETIVO:**

Desarrollar con la información de los análisis realizados por muestra para poder realizar la emisión de resultados.

### **DESCRIPCIÓN DEL FORMULARIO:**

El Formulario FTS-03-R-003 asiste a la secretaria administrativa para que de acuerdo a la información generada por el análisis se emita el resultado de la muestra.

### **Código:**

Sistema de signos y de siglas que permiten formular y comprender un mensaje.

Es el número que se le asigna para identificar cada muestra. En esta casilla se identifica con el número asignada al momento de ingresar la muestra.

### **Cultivo:**

Es el tipo de muestra que ingresa al laboratorio para su un diagnostico como pueden ser Ornamentales, frutales e insectos.

### **Descripción de la Muestra:**

Es la que debe describir paso a paso la definición de cómo viene físicamente la muestra para el análisis. Se especifica empaque en donde viene la muestra.

### **Empresa:**

Organización constituida legalmente que se dedica a actividades industriales, mercantiles o de prestación de servicios con fines lucrativos. Es esta casilla se indican los datos de la Empresa y/o usuario que requiere el diagnóstico.

### **Familia:**

Dentro de la taxonomía, se refiere a la familia a la que pertenece el agente causal.

**Género:**

Dentro de la taxonomía, se refiere al género al cual pertenece el agente causal.

**Especie:**

Dentro de la taxonomía, se refiere a la especie al cual pertenece el agente causal.

**Resultado:**

Es el resultado de la muestra realizado por el analista encargado.

**Observaciones:**

Se define a los mecanismos de solución de problemas.

**Método Utilizado:**

Técnica utilizada por el analista para llegar al resultado final.

**Sello:**

En esta casilla va el sello oficial que identifica al Laboratorio.

**Firma:**

Nombre y apellido de una persona que esta pone con rúbrica al pie de un escrito:

En esta casilla firma el Jefe o Persona Responsable del Laboratorio.

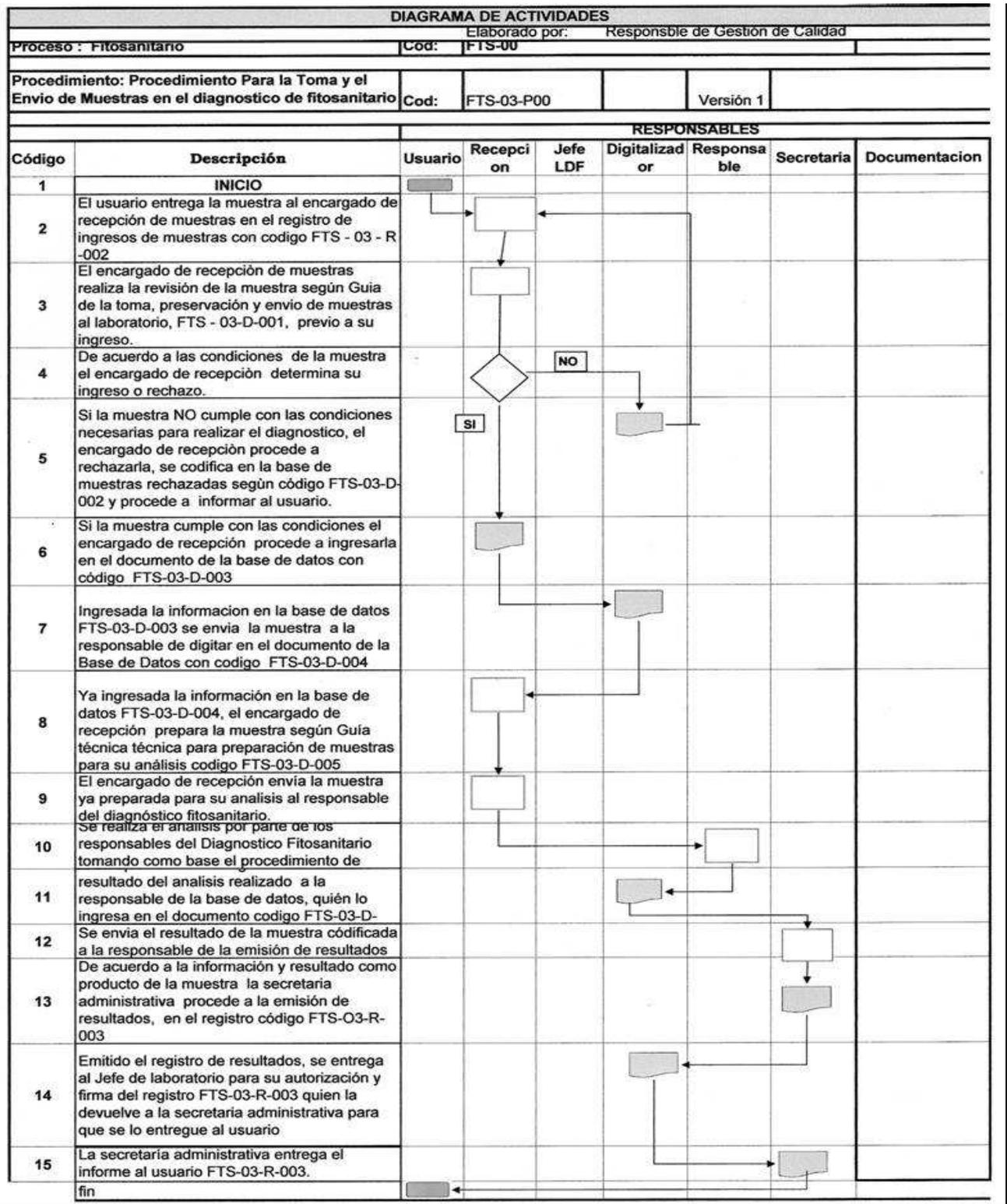


Figura 3.42 Diagrama de las actividades realizadas en el laboratorio

### **3.3.4 Evaluación**

Se llegó a cumplir los objetivos en su totalidad, generando un documento que reúne paso a paso, el proceso completo para el tratamiento de muestras para el análisis fitosanitario desde el ingreso de la muestra al laboratorio hasta la elaboración de la boleta de resultados que se le entrega al usuario.

Se elaboró un flujograma de rutas que toma una muestra al momento de ser ingresada para su respectivo análisis hasta la emisión de su resultado.

### **3.4 Diagnóstico de hongos fitopatógenos en muestras de suelo y planta ingresadas al CDP-FAUSAC y laboratorio fitosanitario del Ministerio de Agricultura durante febrero a noviembre de 2007.**

#### **3.4.1 Objetivos**

- General

Ejecutar el servicio de diagnóstico de hongos fitopatógenos en el CDP-FAUSAC y el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura durante los meses de febrero a noviembre de 2007.

- Específicos

Realizar los diagnósticos de hongos fitopatógenos y preparar los informes de resultados a los usuarios.

Llevar el registro de ingreso de muestras en los libros de ingresos CDP-FAUSAC.

#### **3.4.2 Metodología**

Se siguió el procedimiento respectivo de ingreso, procesamiento de muestras establecido en los manuales de procedimiento del laboratorio del CDP-FAUSAC y Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Ministerio de Agricultura, que se resumen de la siguiente manera:

- a. Recepción de muestra, llenado de boleta y registro de datos en lo libros.
- b. Procesamiento de muestra para el análisis micotico iniciando con la observación detallada de la muestra para verificar síntomas y/o signos, seguido de la observación bajo estereoscopio, para luego elaborar montajes (si procede

hacerlos) o la colocación de las muestras en cámara húmeda, para posteriores observaciones.

- c. Observación de estructuras de crecimiento o reproductivas del agente encontrado y en base a ellas y con el auxilio de las claves de identificación llegar a un diagnóstico final.
- d. Elaboración de informe de resultados en que se detalló el cultivo dañado, sintomatología, observaciones e identificación del hongo responsable del daño.

### **3.4.3 Resultados**

Como resultado de la actividad realizada, se efectuaron diagnósticos a 43 usuarios particulares, en diferentes cultivos, así como el apoyo que se les dio a 14 estudiantes de Ejercicio Profesional Supervisado (EPS), quienes llevaron o enviaron sus muestras, de hortalizas, frutales y ornamentales en su mayoría, habiéndolas procesado y emitido informes de resultados en el Centro Parasitológico de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.

Se efectuó 816 análisis fitopatológicos en el Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del MAGA correspondientes a 58 usuarios.

### **3.4.4 Evaluación**

La actividad cumplió con su cometido, pues se realizaron los diagnósticos fitopatológicos a los usuarios tanto del Centro Parasitológico del la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos y el Laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario del MAGA .

## **APENDICE**



**MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION**  
**UNIDA DE NORMAS Y REGULACIONES**  
**LABORATORIO DE DIAGNOSTICO FITOSANITARIO**  
 Km. 22 Carretera al Pacifico, Bárcenas, Villa Nueva  
 Teléfono: 66306035 Ext. 226



**FORMULARIO PARA INGRESO DE MUESTRAS AL LABORATORIO PARA DIAGNOSTICO FITOSANITARIO.**

MUESTRA No. \_\_\_\_\_

FECHA

--	--	--

1. USUARIO O EMPRESA \_\_\_\_\_ TEL: \_\_\_\_\_ CORREO ELECTRONICO \_\_\_\_\_
2. PERSONA QUE TOMA LA MUESTRA : \_\_\_\_\_ TEL: \_\_\_\_\_ CORREO ELECTRONICO \_\_\_\_\_
3. PROCEDENCIA DE LA MUESTRA, (Dpto.): \_\_\_\_\_ Municipio: \_\_\_\_\_
4. CORDENADAS X \_\_\_\_\_ Y \_\_\_\_\_ Cultivo: \_\_\_\_\_ Cultivo Anterior: \_\_\_\_\_
5. FASE FENEOLÓGICA (al tomar la muestra): \_\_\_\_\_
6. COMPORTAMIENTO DE LA ENFERMEDAD O PLAGA: Regional: \_\_\_\_\_  
 En el Cultivo. Uniforme: \_\_\_\_\_ Manchones o Parches: \_\_\_\_\_ Plantas Aisladas: \_\_\_\_\_
7. PARTE AFECTADA: Raíz \_\_\_\_\_ Tallo \_\_\_\_\_ Ramas \_\_\_\_\_ Hojas \_\_\_\_\_ Yemas \_\_\_\_\_ Flores \_\_\_\_\_ Frutos \_\_\_\_\_ Semilla \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_
8. SINTOMATOLOGIA: Acolochamiento \_\_\_\_\_ Marchites \_\_\_\_\_ Clorosis \_\_\_\_\_ Necrosis \_\_\_\_\_ Achaparramiento \_\_\_\_\_ Pudricion \_\_\_\_\_  
 Moteado \_\_\_\_\_ Mancha Foliar \_\_\_\_\_ Nódulos Radiculares \_\_\_\_\_ Agallas \_\_\_\_\_ Minas \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_  
 Especifique: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_
9. Tipo de análisis: Entomológico: \_\_\_\_\_ Nematológico: \_\_\_\_\_ Fitopatológico: \_\_\_\_\_ Bacteriológico: \_\_\_\_\_  
 Acarológico: \_\_\_\_\_ Maleza: \_\_\_\_\_ Otros \_\_\_\_\_
10. OBSERVACIONES: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Nombre de Receptor

\_\_\_\_\_  
Nombre Enterante







MINISTERIO DE AGRICULTURA, GANADERIA Y ALIMENTACION  
 UNIDA DE NORMAS Y REGULACIONES  
 LABORATORIO DE DIAGNOSTICO FITOSANITARIO  
 Km. 22 Carretera al Pacifico, Bárcenas, Villa Nueva  
 Teléfono: 66306035 Ext. 226



## INFORME DE RESULTADOS

Página 1 de 1

**Cultivo:**

**Descripción de la muestra:**

**Empresa:**

**Finca:**

**Ubicación:**

**Procedencia:**

**Inspector:**

**Fecha de Ingreso:**

**Fecha de Egreso:**

### RESULTADO

**DETERMINACION:**

ORDEN	FAMILIA	GENERO	ESPECIE

**METODO UTILIZADO:**

**OBSERVACIONES:**

(F) \_\_\_\_\_  
 Jefe del Laboratorio

**Sello**

**NOTA IMPORTANTE:** El usuario tiene (30) días hábiles a partir de que recibe el informe para presentar reclamos relacionados con los resultados de análisis.

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento sin previa autorización del laboratorio de Diagnóstico Fitosanitario