

I C A

1675

manual
de
laboratorio
para

EDDIE ECHANDI

FITOPATOLOGIA GENERAL

E 630 E181m 1967





PEU 630 E13/m 1967

manual de laboratorio para FITOPATOLOGIA GENERAL



manual
de EDDIE ECHANDI
laboratorio
para

FITOPATOLOGIA GENERAL



INSTITUTO INTERAMERICANO DE CIENCIAS AGRICOLAS DE LA O. E. A.
Lima, Perú
1967

PRIMERA EDICION

Diseño de la cubierta: A. Otayza Ibáñez

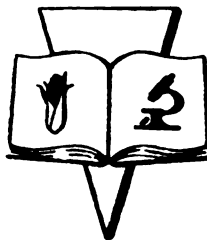
016476

I. I. C. A. - C. I. R. A.	
BIBLIOTECA	
COMPRADO A	<u>I. I. C. A.</u>
OBSEQUIO DE	_____
FECHA	PRECIO <u>\$ 30</u>

7.1970

EDITORIAL IICA

IICA
TME-17
S. 7



1967

Serie: Textos y Materiales de Enseñanza N° 17

Este libro ha sido publicado por el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Es parte del Programa de Textos y Materiales de Enseñanza para las Facultades de Agricultura de América Latina, financiado con una donación de la Fundación Kellogg, que tiene a su cargo la Dirección Regional para la Zona Andina.

Setiembre de 1967

Lima, Perú

CONTENIDO

	Pág.
PREFACIO	vii
PRESENTACION DE LOS INFORMES DE LABORATORIO	1
EQUIPO ENTREGADO A CADA ESTUDIANTE	1
CAPITULO I. BACTERIAS FITOPATOGENAS.	3
A. AISLAMIENTO	3
EJERCICIO 1. Aislamiento de bacterias fitopatógenas de material vegetal enfermo	3
B. TINCION	4
EJERCICIO 2. Tinción de bacterias	4
EJERCICIO 3. Tinción de Gram	5
EJERCICIO 4. Tinción de flagelos	6
C. TRANSFERENCIA Y SIEMBRA	8
EJERCICIO 5. Transferencia y siembra de bacterias fitopatógenas	8
D. CULTIVO Y CARACTERIZACION	9
EJERCICIO 6. Caracterización de bacterias fitopatógenas	9
E. INOCULACION	11
EJERCICIO 7. Inoculación de plantas de tomate con la bacteria (<i>Pseudomonas solanacearum</i>) causante de la marchitez bacteriana	11
EJERCICIO 8. Importancia de las heridas en la penetración y en el establecimiento de las bacterias fitopatógenas	12
CAPITULO II. HONGOS FITOPATOGENOS	13
A. PREPARACION DEL MATERIAL PARA OBSERVARLO AL MICROSCOPIO Y AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATOGENOS	13
EJERCICIO 9. Preparar material fungoso fresco y material fungoso seco para observarlo al microscopio	13
EJERCICIO 10. Métodos para lograr preparaciones permanentes de material fungoso	14
EJERCICIO 11. Aislamiento de hongos fitopatógenos de material vegetal enfermo	15
EJERCICIO 12. Obtención de cultivos monospóricos por los métodos de dilución y rayado	16
EJERCICIO 13. Aislamiento del suelo de <i>Phytophthora Cinnamomi</i> y otras especies del mismo género	17
EJERCICIO 14. Aislamiento de esporas procedentes de hongos con basidiocarpos grandes y carnosos	18
B. ESPORULACION Y GERMINACION	19
EJERCICIO 15. Formación de oosporas en <i>Phytophthora Cinnamomi</i>	19
EJERCICIO 16. Método para inducir la rápida esporulación de algunos hongos	20
EJERCICIO 17. Efecto estimulante de extractos de plantas en la germinación de las esporas	21
C. PENETRACION, INFECCION Y PROCESOS POSTERIORES	22
EJERCICIO 18. Importancia de las heridas en la penetración, infección y establecimiento de ciertos hongos	22
EJERCICIO 19. Formación de apresorios	23
EJERCICIO 20. Formación de apresorios por un hongo parásito de la raíz en respuesta a exudados radicales	24
EJERCICIO 21. Penetración directa de <i>Phytophthora infestans</i> en folíolos de tomate	25
EJERCICIO 22. Maceración de tejidos suculentos causada por filtrados de <i>Rhizopus stolonifer</i>	26

	Pág.
D. RAZAS FISIOLÓGICAS	27
EJERCICIO 23. Determinación de razas fisiológicas en un hongo fitopatógeno ..	27
CAPITULO III. TOXINAS	28
A. FORMACION DE FUNGITOXINAS	28
EJERCICIO 24. Producción de compuestos fungitóxicos en tejidos de zanahoria .	28
CAPITULO IV. NEMATODOS FITOPATOGENOS	29
A. AISLAMIENTO DEL SUELO	29
EJERCICIO 25. Método del embudo de Baermann modificado para aislar nematodos del suelo	29
EJERCICIO 26. Aislamiento de nematodos del suelo por el método combinado de tamiz y embudo	30
B. AISLAMIENTO DE LAS RAICES	31
EJERCICIO 27. Aislamiento de nematodos endoparásitos mediante el método de incubación	31
C. PREPARACIONES DE NEMATODOS	32
EJERCICIO 28. Preparaciones temporales y permanentes de nematodos	32
CAPITULO V. VIRUS FITOPATOGENOS	34
A. TRANSMISION MECANICA	34
EJERCICIO 29. Inoculación de plantas con el virus del mosaico del tabaco	34
EJERCICIO 30. Determinación de la infectividad del virus del mosaico del tabaco por el método de las lesiones locales	35
B. TRANSMISION POR INSECTOS.....	36
EJERCICIO 31. Transmisión del virus Y de la papa (PVY) por medio de insectos	36
CAPITULO VI. DISEMINACION DE LOS AGENTES PATOGENOS	37
EJERCICIO 32. Dispersión de bacterias y hongos por el salpique del agua	37
EJERCICIO 33. Efecto del agua y del viento en la diseminación de las conidias de <i>Cercospora coffeicola</i>	38
EJERCICIO 34. Expulsión de las ascosporas de <i>Giberella zeae</i>	39
CAPITULO VII. INOCULO EN EL SUELO	40
EJERCICIO 35. Inóculo potencial en el suelo	40
CAPITULO VIII. COMBATE DE LAS ENFERMEDADES POR MEDIOS QUIMICOS	41
EJERCICIO 36. Microorganismos patógenos en las semillas y tratamiento químico de las mismas	41
EJERCICIO 37. Combate del mal del talluelo por medios químicos	42
EJERCICIO 38. Estimación del residuo fungicida en el follaje	43
CAPITULO IX. PREPARACION Y DISPENSACION DE MEDIOS DE CULTIVO	44
A. MEDIOS DE CULTIVO	44
B. ESTERILIZACION	46
C. DISPENSACION	46
ANEXOS	47
TEXTOS IMPORTANTES EN FITOPATOLOGIA	49
FUENTES DE MATERIALES DE LABORATORIO	51

PREFACIO

Este manual fue elaborado especialmente para estudiantes de las Facultades de Agricultura y Ciencias de las Universidades Latinoamericanas.

Su propósito es ilustrar algunos conceptos básicos que se discuten en un curso general de Fitopatología, y familiarizar al estudiante con métodos y técnicas importantes utilizados en esta disciplina.

Los ejercicios de laboratorio que se incluyen fueron usados durante los tres últimos años en el curso trimestral de Fitopatología General dictado por el Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, en su Centro de Enseñanza e Investigación, ubicado en Turrialba, Costa Rica.

Parte de los ejercicios 7, 8, 13 al 22, 24 al 27, 29, 30, 32, 34 al 38, fueron traducidos del "Sourcebook of Laboratory Exercises in Plant Pathology", preparado por el "Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society". La casa editora W. H. Freeman and Co., autorizó el uso de dicho material.

El autor agradece al Ing. Antonio Salas L., su valiosa ayuda en la traducción de algunos ejercicios; a los Dres. Luis Carlos González, Benjamín H. Waite y Juan Díaz Bordenave, por sus gentilezas de leer el manuscrito y hacer sugerencias tendientes a mejorar el manual.

Esta obra ha podido publicarse gracias a un aporte brindado por la Fundación Kellogg, a través del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, instituciones a las cuales les manifiesta su reconocimiento.

En particular el autor agradece la colaboración de la Srta. Matilde de la Cruz, por su dedicación en la tarea editorial. Y finalmente a la Sra. Betty de Sanger, por su excelente colaboración en la preparación del manuscrito.

PRESENTACION DE LOS INFORMES DE LABORATORIO

Se recomienda leer los ejercicios con suficiente anticipación a la iniciación del trabajo, a fin de planearlos y realizarlos en forma eficiente.

Los informes de estos ejercicios se consideran el reflejo de la habilidad del estudiante para presentar e interpretar información científica. Los siguientes comentarios sugieren el estilo recomendado para presentar los informes:

1. Use papel rayado si escribe sus informes a mano.
Se prefieren los informes escritos a máquina.
2. Cada informe consta de las siguientes partes:
 - a. Título del ejercicio.
 - b. Propósito.
 - c. Presentación de los resultados, hasta donde sea posible en forma de cuadros.
 - d. Análisis e interpretación de los datos.
 - e. Conclusiones.
 - f. Literatura consultada.

EQUIPO ENTREGADO A CADA ESTUDIANTE

Estudiante:

Departamento

Microscopio No

- 1 canastilla para tubos de ensayo
- 20 portaobjetos
- 25 cubreobjetos
- 1 caja para portaobjetos
- 2 agujas de disección
- 2 asas
- 1 pinza
- 1 probeta de 100 ml.
- papel para limpiar lentes
- 6 pipetas
- 3 navajillas de afeitar
- 1 embudo
- 1 espátula
- 1 lámpara de alcohol
- 1 lápiz de cera
- colilla para marcar plantas.

CAPITULO I. BACTERIAS FITOPATOGENAS

A. AISLAMIENTO

EJERCICIO 1

AISLAMIENTO DE BACTERIAS FITOPATOGENAS DE MATERIAL VEGETAL ENFERMO

Objetivo:

Demostrar una de las técnicas comunes para aislar bacterias fitopatógenas en cultivo puro.

Materiales:

Pueden utilizarse especímenes tales como: tubérculos de papa o tallos de tomate afectados por *Pseudomonas solanacearum*; raíces de zanahoria atacadas por *Erwinia carotovora*. Agar papa dextrosa (APD); solución de hipoclorito de sodio al 5,25 por ciento (Clorox); pinzas; bisturíes; agujas de disección; platos Petri; agua esterilizada; botellas de vidrio de 4 onzas; tubos de ensayo; pipeta de 1 ml y asa.

Procedimiento:

Para preparar medios de cultivo, se usa por lo general en los trabajos de rutina, materiales naturales tales como papa, zanahoria, extracto de carne, etc. Prepare 1/2 litro de APD, llene 3 botellas, y distribuya el resto del APD en unos 30 tubos. El medio de las botellas se usará más tarde para los cultivos en platos, y el de los tubos para mantener las cepas aisladas.

Aislamiento de las bacterias:

El material cortado en trozos pequeños se esteriliza sumergiéndolo por 2 minutos en una solución de Clorox al 5 por ciento. Enjuague en agua esterilizada y coloque de 6 a 10 trocitos en un tubo de ensayo con agua destilada esterilizada, tápelo y manténgalo en reposo por espacio de 15 minutos, con el propósito de que las bacterias se difundan en el agua. Prepare una gradilla con 3 tubos de ensayo, cada uno con 9 ml de agua destilada estéril.

Con una pipeta estéril de 1 ml transfiera 1 ml de la suspensión de bacterias al primer tubo; agite y luego transfiera en serie 1 ml a cada uno de los tubos restantes para obtener finalmente diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000. Agregue por separado 0,5 ml de cada dilución a platos Petri. Caliente en baño maría el APD de las botellas hasta que se licúe; déjelo en reposo fuera del baño hasta que llegue a unos 41°C (a esta temperatura el recipiente puede pegarse a la mejilla sin causar daño); agregue aproximadamente 15 ml del medio a cada plato; agite suavemente para distribuir las bacterias en el medio. Debe tenerse cuidado al realizar este paso ya que si el medio está muy caliente, las bacterias mueren. Luego coloque los platos sobre una mesa limpia del laboratorio. Las colonias aparecen a los 2 ó 3 días; se presume que cada colonia proviene de una sola bacteria.

Tiempo necesario: Para preparar los medios y hacer los aislamientos, 3 a 4 horas; para completar las observaciones, 3 a 5 días.

REFERENCIAS

RIKER, A. J. y RIKER, REGINA, S. Introduction to research on plant diseases. St. Louis, Mo., Swift, 1936. 117 p.

B. TINCION

EJERCICIO 2

TINCION DE BACTERIAS

Objetivo:

Teñir y observar bacterias fitopatógenas.

Materiales y Procedimiento:

TINCION CON ROJO CONGO:

Prepare una solución acuosa de rojo congo al 2 por ciento.

Deposite una gota de la solución de rojo congo en un portaobjetos limpio y agregue una pequeña cantidad de la muestra que contenga las bacterias: material vegetal o colonias. Mezcle el material con el colorante y distribúyalo por toda la cara superior del portaobjetos, utilizando el borde de un portaobjetos o el asa.

Permita que la preparación se seque, sin calentarla.

Una vez seca la preparación, agréguele unas cuantas gotas de alcohol acidificado (3 gotas de HCl concentrado en 30 ml de alcohol etílico de 95 por ciento). Esto hace cambiar el color de la preparación de rojo a azul. Deje que el alcohol se evapore.

Observe la preparación al microscopio con el lente de inmersión.

Las bacterias aparecen incoloras en un fondo azul.

TINCION CON AZUL DE METILENO:

Fórmula para la solución colorante:

Azul de metileno	0,3 g
Alcohol etílico de 95 por ciento	30 ml

Disuelva el colorante en el alcohol y agregue 100 ml de agua destilada.

Haga una suspensión diluída de las bacterias y coloque una gota sobre un portaobjetos limpio.

Extienda la gota sobre el portaobjetos y cubra la cara superior, según se explicó en el método anterior.

Permita que la preparación se seque.

Fije las bacterias al vidrio, pasando la preparación rápidamente unas 5 veces sobre la llama de un mechero de alcohol. Asegúrese que la llama pase por el lado opuesto a la cara donde se hallan las bacterias.

Aplique una gota del colorante a la preparación y déjela reposar unos minutos; lave el exceso de colorante con agua destilada y permita que se seque.

Observe la preparación al microscopio con el lente de inmersión.

Tiempo necesario: 1 hora.

REFERENCIAS

BURKHOLDER, W. H. A bacterial leaf spot of geranium. *Phytopathology* 27:555-560. 1937.

EJERCICIO 3

TINCION DE GRAM

Objetivo:

Determinar la reacción gram negativa o positiva de bacterias fitopatógenas.

Materiales:

Solución A: Violeta genciana

Violeta genciana	0,5 g
alcohol etílico de 97 por ciento	20,0 ml
crisales de fenol	2,5 g
glicerina	80,0 ml
agua destilada	100,0 ml

Solución B: Solución de yodo

Yodo	1,0 g
yoduro de potasio	2,0 g
agua destilada	100,0 ml

Solución C: Safranina

Solución acuosa al 1 por ciento de safranina.

Procedimiento:

Se prepara y se fija la preparación en igual forma que en el caso de la tinción con azul de metileno; sin agregar ningún colorante. Manteniendo el portaobjetos caliente, agregue:

1. La solución A y mantenga el portaobjetos cubierto con esta solución por 1 minuto.
 2. Elimine el exceso al cabo de este tiempo; **no** lave en agua.
 3. Añada la solución B y mantenga el portaobjetos cubierto con esta solución por 1 minuto.
 4. Elimine el exceso al cabo de este tiempo; **no** lave en agua.
 5. Lave con alcohol etílico puro, agitando el portaobjetos todo el tiempo, hasta que no se desprenda más colorante. Esto se comprueba al colocar la preparación sobre un fondo blanco.
 6. Agregue la solución C de safranina y agite la preparación por 30 segundos.
 7. Lave con agua, seque el exceso con papel absorbente y por último a la llama.
- Las bacterias gram positivas aparecen azules y las gram negativas rojas.

Tiempo necesario: 2 horas.

REFERENCIAS

DOWSON, W. J. Plant diseases due to bacteria. 2nd ed. Cambridge, England, University Press, 1957. pp. 66-67.

EJERCICIO 4

TINCION DE FLAGELOS

Objetivo:

Teñir los flagelos de bacterias fitopatógenas.

Antecedentes:

La tinción de los flagelos es difícil ya que son órganos muy delgados (de más o menos 0,02 a 0,03 μ de diámetro) que están por debajo del límite de visión. De tal manera que para teñirlos y observarlos al microscopio es necesario usar productos llamados mordientes, cuya función es la de fijar y favorecer el depósito del colorante aumentando el tamaño de los flagelos.

Otro de los problemas es que los flagelos se desprenden con facilidad, a menos que los cultivos se manejen con cuidado.

Para prevenir esta dificultad se usan cultivos apropiados y portaobjetos especialmente tratados.

Método para preparar los portaobjetos:

Use portaobjetos nuevos, si es posible, y no los toque con los dedos. Lave los portaobjetos en una solución de dicromato de potasio, luego enjuáguelos en agua y por último en alcohol etílico de 95 por ciento. Después pase los portaobjetos por unos minutos sobre la llama del mechero de alcohol. Someta los portaobjetos al calor lentamente y quítelos del calor de la misma manera; dépositelos con pinzas en una caja cerrada.

Manejo de los cultivos:

Use cultivos jóvenes de 18 a 22 horas de edad, desarrollados en tubos con agar infusión de carne (ver ejercicio 6). Antes de proseguir, observe una preparación al microscopio a fin de asegurarse de que las bacterias estén en movimiento. Si se nota movimiento, suspenda una muestra de la colonia en 2 a 3 ml de agua destilada esterilizada y mantenga la suspensión en reposo por 10 minutos. Transfiera, con un asa, a un portaobjetos tratado en la forma descrita, una gota tomada de la parte superior de la suspensión (que es donde se encuentran los organismos más activos). Incline el portaobjetos con cuidado para que la gota corra hasta el otro extremo. Luego agregue otra gota de la suspensión y repita la operación. Por último coloque el portaobjetos inclinado para que se seque al aire.

Tinción:

Método de Bailey modificado por Fisher y Conn (1942).

Solución A Mordiente

Acido tánico (10 por ciento solución acuosa)	18 ml
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (6 por ciento solución acuosa)	6 ml

Solución B

Solución A	3,5 ml
Fucsina básica (0,5 por ciento en alcohol etílico)	0,5 ml
HCl concentrado	0,5 ml
Formalina	2,0 ml

Filtre la Solución A de modo que el filtrado caiga directamente sobre la preparación; permita que el líquido cubra la preparación por 3½ minutos. Incline la preparación y elimine el líquido que la cubre.

Agregue inmediatamente la Solución B, filtrándola y recogiéndola sobre la preparación, la cual debe mantenerse cubierta con la solución por espacio de 7 minutos.

Lave con agua destilada.

Antes de que la preparación se seque, cúbrala con una solución de Carbolfucsina de Ziehl, y colóquela sobre un calentador de metal, por 1 minuto. El calentador debe permanecer a una temperatura tal que gotas de agua depositadas en la superficie, apenas se noten produciendo vapor.

Lave en agua del grifo.

Seque al aire y examine la preparación al microscopio con el lente de inmersión.

CARBOLFUCSINA DE ZIEHL

Solución A:

Fucsina básica de 90 por ciento de colorante	0,3 g
Alcohol etílico de 95 por ciento	10,0 ml

Solución B:

Fenol	5,0 g
Agua destilada	95,0 ml

Mezcle las soluciones A y B

Este ejercicio es difícil de realizar y es muy corriente que se tenga que repetir varias veces.

Tiempo necesario: 2 días.

REFERENCIAS

DOWSON, W. J. Plant diseases due to bacteria. 2nd ed. Cambridge, England, University Press, 1957. 231 p.
SOCIETY OF AMERICAN BACTERIOLOGISTS. COMMITTEE ON BACTERIOLOGICAL TECHNIC. Manual of methods for pure culture study of bacteria. Geneva, N. Y., The Biotech Publications, 1946. (Leaflet IV, pp. 3-24).

C. TRANSFERENCIA Y SIEMBRA

EJERCICIO 5

TRANSFERENCIA Y SIEMBRA DE BACTERIAS FITOPATOGENAS

Objetivo:

Demostrar la forma de efectuar la transferencia y siembra de cultivos de bacterias.

Materiales y Procedimiento:

Los cultivos se mantienen en el laboratorio transfiriendo las colonias a un medio de cultivo estéril. Las transferencias se realizan por lo general con la ayuda de un asa. El asa consta de un mango largo que lleva en un extremo un alambre de platino, cromo o nicromo. La punta del alambre puede tener forma de aguja, de espátula, o puede estar doblada en forma de gancho o anillo. Caliente el alambre al rojo vivo sobre la llama de una lámpara de alcohol y pase sobre la llama una buena parte del mango del asa, para esterilizarlo. Destape el cultivo y sostenga el tapón de algodón con la mano derecha; no permita que el algodón haga contacto con ningún objeto. Con el asa recoja parte de la colonia, destape el tubo fresco y siembre las bacterias en el agar. Es conveniente calentar la boca de los tubos al destaparlos y al taparlos a fin de destruir cualquier organismo extraño (contaminante) que se haya depositado en la boca de los mismos. Cuando la transferencia se efectúe a platos Petri, se procede en forma similar, procurando abrir el plato con la mano izquierda apenas lo necesario para introducir el asa. Una vez efectuada la siembra, el plato debe incubarse invertido a fin de evitar, hasta donde sea posible, las contaminaciones.

Tiempo necesario: 10 minutos.

REFERENCIAS

RIKER, A. J. y RIKER, REGINA, S. Introduction to research on plant diseases. St. Louis, Mo., Swift, 1936. 117 p.

D. CULTIVO Y CARACTERIZACION

EJERCICIO 6

CARACTERIZACION DE BACTERIAS FITOPATOGENAS

Objetivo:

Tratar de diferenciar algunos géneros de bacterias fitopatógenas.

Materiales y Procedimiento:

Agar infusión de carne:

Hierva 250 ml de agua destilada en un recipiente apropiado. Cuando el agua comience a hervir, agregue 4 g de agar y agite la mezcla hasta que el agar se haya disuelto. Poco antes de retirar el líquido del calor, agregue 0,8 g de extracto de carne y disuélvalos bien. Lleve el volumen del líquido a 250 ml con agua. También ajuste el pH a 7,2 agregando soda 0,1 N.

Vacíe el medio en tubos de ensayo, procurando dispensar más o menos 5 ml en cada tubo. Tape los tubos con tapones de algodón y colóquelos en canastillas. Luego introdúzcalos en el autoclave y esterilícelos a 15 libras de presión por 20 minutos. Una vez fuera del autoclave y antes de que el medio se solidifique, verifique que el pH se mantenga alrededor de 7,2 y coloque los tubos inclinados de modo que el nivel del agar quede a unos 3 cm del tapón. Una vez que el agar se haya solidificado, con el asa tome una pequeña porción de la colonia en observación y siémbrela en el medio.

Agar glucosa infusión de carne:

Prepare 250 ml de este medio en la misma forma que preparó el anterior, pero al agregar el extracto de carne agregue también 2,5 g de glucosa.

Siembre en los tubos la bacteria en observación.

Cilindros de papa esterilizada:

Lave las papas cuidadosamente y trátelas con una solución de Clorox al 10 por ciento por espacio de 15 minutos, luego lávelas con agua destilada. Con un sacabocados de 1/2 pulgada de diámetro, obtenga cuantos cilindros sea posible de cada tubérculo; los cilindros deben medir 7 cm de largo. Luego parta cada cilindro en 2 diagonalmente, como aparece en la Figura 1.



Fig. 1. Forma en que deben partirse los cilindros de papa.

Cada mitad se coloca con la base hacia abajo en un tubo de ensayo. Agregue 1,5 ml de agua a cada tubo y tápelo con un tapón de algodón. Los tubos deben esterilizarse a 10 libras de presión por 15 minutos.

Siembre la bacteria en observación en la superficie inclinada de los cilindros de papa.

Producción de ácido y gas en salicina

Medio sintético

(NH ₄) H ₂ PO	1,0 g
KCl	0,2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
Salicina	10,0 g
Agua destilada	1000 ml

Agregue a este medio bromo cresol púrpura en la proporción de 2 ml de la solución preparada por la casa manufacturera por cada 100ml del medio.

Ajuste el pH a 7,0 agregando soda 0,1N. Dispense el medio en tubos de ensayo a los cuales se les ha incorporado un tubo de fermentación Durham. Esterilice el medio.

Siembre la bacteria en observación directamente en el medio líquido.

Producción de ácido y gas en lactosa

Igual al anterior pero sustituyendo la salicina por 10 g de lactosa.

Siembre la bacteria en observación directamente en el medio líquido.

Tiempo necesario: 8 días.

REFERENCIAS

- DOWSON, W. J. Plant diseases due to bacteria. 2nd ed. Cambridge, England, University Press, 1957. 231 p.
GORLENKO, M. V. Bacterial diseases of plants. Trans. from Russian by S. Nemchonok. 2nd ed. Jerusalem, Israel Program for Scientific Translations, 1965. 174 p.
STAPP, C. Bacterial plant pathogens. London, Oxford University Press, 1961. 292 p.

CARACTERISTICAS DE ALGUNOS GENEROS DE BACTERIAS FITOPATOGENAS GRAM NEGATIVAS *

Medio de Cultivo	<i>Erwinia o Pectobacterium</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Xanthomonas</i>
	Flagelos peritricos	Flagelos polares	Flagelo polar
Agar infusión de carne	Crecimiento blanco, sucio o gris pálido	Crecimiento blanco con fluorescencia verde	Crecimiento amarillo
Agar glucosa infusión de carne	Crecimiento blanco o gris brillante	Crecimiento blanco brillante Nunca gris	Crecimiento amarillo abundante y mucoso
Cilindros de papa esterilizada	Crecimiento cremoso a blanco sucio, más tarde amarillento	Crecimiento cremoso luego amarillo ligero o púrpura	Crecimiento amarillo abundante, mucoso, papa digerida
Salicina en medio sintético con bromo cresol púrpura	Producción rápida de ácido o ácido y gas	No produce ácido	No produce ácido
Lactosa en medio sintético con bromo cresol púrpura	Acido o ácido y gas o no produce ácido	No produce ácido	Acido solamente

* DOWSON, W. J. Plant diseases due to bacteria. 2nd ed. Cambridge, England, Cambridge University Press, 1957. 231 p.

E. INOCULACION

EJERCICIO 7*

INOCULACION DE PLANTAS DE TOMATE CON LA BACTERIA (*PSEUDOMONAS SOLANACEARUM*) CAUSANTE DE LA MARCHITEZ BACTERIANA

Objetivo:

Ilustrar los postulados de Koch.

Materiales:

Plantas suculentas de tomate con 5 a 6 hojas; gotero estéril; tubo de ensayo con 5 ml de agua esterilizada; cultivos virulentos de *Pseudomonas solanacearum* de 48 a 72 horas de edad; etiquetas; asa; aguja de disección; plato Petri.

Procedimiento:

Deposite 1 ó 2 ml de agua esterilizada en un plato Petri, con el asa esterilizada a la llama, transfiera suficientes bacterias al plato hasta que el agua se enturbie. El estudiante deberá observar al microscopio la motilidad de las bacterias, y además hará una estimación aproximada del número de bacterias, en 1 ml de la suspensión usada como inóculo. Con el gotero, deposite una gota de la suspensión de bacterias en la axila de la tercera hoja de la planta a inocular. Introduzca la aguja de disección varias veces dentro del tallo a través de la gota de la suspensión de bacterias. Una vez inoculadas las plantas, deben colocarse en el invernadero y regarse con frecuencia. Es importante para el desarrollo rápido de la enfermedad que las plantas estén expuestas a altas temperaturas 31-32°C en el día y más o menos 21°C en la noche.

Siete días después de la inoculación, las plantas comienzan a mostrar síntomas. Observe con cuidado los síntomas externos e internos de la enfermedad.

Aisle la bacteria nuevamente siguiendo el procedimiento que aparece en el ejercicio 1 y compare las colonias aisladas con las originales.

Tiempo necesario: 7 días.

REFERENCIAS

KELMAN, A. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*; a literature review and bibliography. North Carolina Agricultural Experiment Station. Technical Bulletin 99. 1953. 194 p.

KELMAN, A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium chloride medium. *Phytopathology* 44:693-695. 1954.

RIKER, E. J. y RIKER, REGINA, S. Introduction to research on plant diseases. St. Louis, Mo., Swift, 1936. 117 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 8*

IMPORTANCIA DE LAS HERIDAS EN LA PENETRACION Y EN EL ESTABLECIMIENTO DE LAS BACTERIAS FITOPATOGENAS

Objetivo:

Demostrar que ciertas bacterias fitopatógenas como *Erwinia carotovora*, requieren heridas para penetrar y establecerse en el hospedero.

Materiales:

Cultivos de 24 a 48 horas de edad de *E. carotovora*; zanahorias frescas; tubérculos de papa; cámaras húmedas; asa; toallas de papel y agua esterilizada.

Procedimiento:

Coloque una toalla de papel en el fondo de cada una de las cámaras húmedas. Lave bien los tubérculos o raíces y córtelas en pedazos grandes (papa en 2 partes, zanahoria en 2 ó 3 partes). Distribuya el material en las cámaras húmedas de modo que las superficies intactas y las de los cortes queden expuestas. Distribuya, tanto en las superficies intactas como en las de corte, varias gotas de una suspensión de bacterias preparada en la siguiente forma: deposite 1 ó 2 ml de agua esterilizada en un plato Petri y con el asa esterilizada a la llama, transfiera suficientes bacterias al plato hasta que el agua se enturbie. Procure mantener siempre húmedas las áreas inoculadas, agregándoles agua estéril con un gotero. Marque las cámaras y colóquelas sobre una mesa del laboratorio.

Tiempo necesario: 4 a 5 días.

REFERENCIAS

RIKER, A. J. y RIKER, REGINA, S. Introduction to research on plant diseases. St. Louis, Mo., Swift. 1936. 117 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

CAPITULO II. HONGOS FITOPATOGENOS

A. PREPARACION DEL MATERIAL PARA OBSERVARLO AL MICROSCOPIO Y AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATOGENOS

EJERCICIO 9

PREPARAR MATERIAL FUNGOSO FRESCO Y MATERIAL FUNGOSO SECO PARA OBSERVARLO AL MICROSCOPIO

Objetivo:

Preparar material fungoso para observarlo al microscopio.

Materiales y Procedimiento:

Material fresco:

Las estructuras fungosas pequeñas, pueden colocarse directamente sobre un portaobjetos en una gota de agua destilada. Para reducir las burbujas es conveniente utilizar en vez de agua destilada pura, agua destilada con una pequeña cantidad de detergente.

Material seco:

Cuando se trata de observar una muestra seca, se utiliza en vez de agua destilada pura, una solución diluida de KOH (2 a 10 por ciento). El objeto de usar esta solución es mojar e inchar las estructuras a fin de que vuelvan a su tamaño natural.

Otro medio adecuado para montar material seco es lactofenol. El material se coloca en una gota de lactofenol, se cubre con un cubreobjetos y se calienta sobre la llama de una lámpara de alcohol. Luego se le deja enfriar y se le observa al microscopio.

Solución de Lactofenol (Amann)

Fenol (cristales)	20 g
Acido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua	20 ml

Puede agregarse a esta solución, si se desea, una pequeña cantidad de colorante tal como azul de metileno.

Si el material es de color oscuro, como ocurre a menudo con las hojas secas, se hierven pequeñas porciones por unos segundos en KOH al 10 por ciento, para eliminar parte del pigmento oscuro; luego el material se monta en agua destilada para observarlo al microscopio.

Tiempo necesario: 1/2 hora.

REFERENCIAS

- AINSWORTH, G. C. y BISBY, G. R. A dictionary of the fungi. Kew, Surrey, The Imperial Mycological Institute, 1950. 431 p.
- ALEXOPOULOS, C. J. y BENEKE, E. S. Laboratory manual for introductory mycology. Minneapolis, Minn., Burgess, 1955. 177 p.

EJERCICIO 10

METODOS PARA LOGRAR PREPARACIONES PERMANENTES DE MATERIAL FUNGOSO

Objetivo:

Lograr preparaciones permanentes de material fungoso.

Materiales y Procedimiento:

MEDIO DE MONTAJE AMANN:

Las preparaciones permanentes se logran colocando sobre los portaobjetos una pequeña cantidad de medio de Amann, equivalente a una gota. Una vez depositado el material en el medio, se coloca el cubreobjetos, procurando que el líquido no se extienda más allá de los bordes de éste.

Luego los bordes del cubreobjetos se sellan con esmalte de uñas.

Medio de montaje Amann

Fenol (cristales)	20 g
Acido láctico	20 ml
Glicerina	40 ml
Agua destilada	20 ml

Puede agregarse al medio, una pequeña cantidad de colorante tal como azul de metileno.

MEDIO DE MONTAJE HOYER:

Con este medio se procede en igual forma que con el medio de Amann.

Medio de montaje Hoyer

Goma arábica	30 g
Hidrato de cloral	200 g
Glicerina	20 ml
Agua destilada	50 ml

La goma arábica debe permanecer en agua por 24 horas, luego se incorpora el hidrato de cloral y se permite que todo el material se disuelva. Una vez disuelto el material se añade la glicerina, y desde ese momento, el medio está listo para usarse.

REFERENCIAS

- AINSWORTH, G. C. y BISBY, G. R. A dictionary of the fungi. Kew, Surrey, The Imperial Mycological Institute, 1950. 431 p.
- ALEXOPOULOS, C. J. y BENEKE, E. S. Laboratory manual for introductory mycology. Minneapolis, Minn., Burgess, 1955. 177 p.

EJERCICIO 11

AISLAMIENTO DE HONGOS FITOPATOGENOS DE MATERIAL VEGETAL ENFERMO

Objetivo:

Demostrar la forma de aislar hongos fitopatógenos en cultivo puro.

Materiales:

Plantas de chile o pimiento, frijol, tabaco, u otras especies corrientes atacadas por *Rhizoctonia solani*; hojas y frutos de frijol atacadas por *Colletotrichum lindemuthianum*; hojas de maíz atacadas por *Helminthosporium turcicum*; solución de Clorox al 10 por ciento; pinzas; agar agua; bisturí; asa; tubos de ensayo con agar papa dextrosa (APD); platos Petri.

Procedimiento:

Sumerja durante 2 minutos, en la solución de Clorox al 10 por ciento, pedazos de tallo, hojas o frutos enfermos de 1 cm de largo, de chile, frijol, tabaco, maíz u otras especies corrientes. Con las pinzas esterilizadas a la llama, transfíeralos a platos Petri con agar agua colocando 3 pedazos en cada plato. Una vez que aparezcan las colonias, con la ayuda del asa transfiera una pequeña porción del borde de la colonia a tubos de ensayo con agar papa dextrosa.

Tiempo necesario: 5 días.

REFERENCIAS

RIKER, A. J. y RIKER, REGINA, S. Introduction to research on plant diseases. St. Louis, Mo., Swift, 1936. 117 p.

EJERCICIO 12

OBTENCION DE CULTIVOS MONOSPORICOS POR LOS METODOS DE DILUCION Y RAYADO

Objetivo:

Obtener cultivos monospóricos.

Materiales y Procedimiento:

1. METODO DE DILUCION

Haga una asa pequeña insertando un alambre fino de platino, cromo o nicromo, de más o menos 2 pulgadas de largo en el vástago de un fósforo de madera. Prepare un plato Petri con agar papa dextrosa (APD) o el medio adecuado para el hongo. Deposite 5 gotas de agua esterilizada en un plato Petri esterilizado.

Localice una lesión cubierta de esporas o una colonia con abundante esporulación y bajo el microscopio estereoscópico desprenda las esporas con la punta del asa mojada en una de las gotas de agua, y transfíralas a una de las gotas de agua en el plato Petri. Diluya la suspensión transfiriendo de gota a gota el contenido de una sola asa.

Examine las gotas de agua con el microscopio a bajo poder a fin de localizar una gota con una cantidad mediana de esporas en suspensión. Con el asa transfiera parte de la suspensión de la gota seleccionada al centro de otro plato Petri esterilizado. Disuelva y enfríe a más o menos 41°C (a esta temperatura el tubo puede pegarse a la mejilla sin causar daño) el agar agua contenido en un tubo de ensayo y vacíelo sobre la gota localizada en el centro del plato Petri, agite el plato dándole un movimiento de rotación para dispersar las esporas. Permita que el agar se solidifique y las esporas germinen. Observe el plato con el bajo poder del microscopio o el alto poder de un microscopio estereoscópico con luz reflejada y localice una espora que esté bien alejada del resto; una vez localizada, tome el asa esterilizada a la llama y levante la espora con un pedazo pequeño de agar y deposítela en el plato con APD u otro medio de cultivo preparado al principio, haga unas 8 transferencias e incube el plato. Una vez que aparezcan las colonias, siembre el hongo en tubos con APD o el medio de cultivo adecuado.

2. METODO DE RAYADO

Otro método para obtener cultivos monospóricos es el siguiente: Una vez que el agar agua contenido en los platos Petri se haya solidificado, tome un asa recta y doble la aguja a 1/2 cm de la punta haciendo un ángulo de 130 grados. Esterilice la aguja a la llama y recoja las esporas simplemente frotando la aguja con las estructuras del hongo. Luego trace rayas paralelas superficiales sobre el agar sin romperlo; éstas deben estar separadas aproximadamente 1/2 cm una de otra. Después raye de nuevo la superficie del agar con rayas perpendiculares a las primeras, procurando que dicha superficie no se rompa. Luego observe ésta bajo el microscopio estereoscópico y localice una espora que esté completamente aislada de las demás. Recójala con un pedazo pequeño de agar y proceda de aquí en adelante como en el método anterior.

Tiempo necesario: 3 días aproximadamente.

REFERENCIAS

- RAWLINS, T. E. *Phytopathological and botanical research methods*. New York, Wiley, 1933. 156 p.
RIKER, A. J. y RIKER, REGINA, S. *Introduction to research on plant diseases*. St. Louis, Swift, 1936. 117 p.

EJERCICIO 13*

AISLAMIENTO DEL SUELO DE *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI* Y OTRAS ESPECIES DEL MISMO GENERO

Objetivo:

Aislar del suelo hongos patógenos como *Phytophthora cinnamomi* y otras especies de *Phytophthora*.

Materiales:

Frutos de aguacate o palta (*Persea americana*); melones (*Cucumis melo*) verdes o sazones; sacabocados de 1/2 pulgada de diámetro; papel adhesivo "scotch tape"; agar harina de maíz; agar agua; platos Petri y macetas de barro.

Procedimiento:

Introduzca parcialmente los frutos de aguacate en el suelo contaminado con el hongo; humedezca bien el suelo. Esta operación puede realizarse en el campo o en macetas. Coloque una buena cantidad de suelo húmedo en los agujeros hechos en los melones con el sacabocados; cubra los agujeros con papel adhesivo y coloque los melones a temperatura ambiente por espacio de 5 a 10 días. Los frutos de aguacate también deben permanecer en el suelo de 5 a 10 días.

Al cabo del tiempo indicado siembre las áreas podridas de color café en platos Petri con agar harina de maíz o agar agua y examine los platos después de 4 a 8 días.

Tiempo necesario: 10 a 18 días.

REFERENCIAS

CAMPBELL, W. A method of isolating *Phytophthora cinnamomi* directly from soil. *Plant Disease Reporter* 33:134-135. 1949.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 14*

AISLAMIENTO DE ESPORAS PROCEDENTES DE HONGOS CON BASIDIOCARPOS GRANDES Y CARNOSOS

Objetivo:

Demostrar un método para aislar esporas individuales procedentes de hongos con basidiocarpos grandes y carnosos.

Materiales:

Basidiocarpos de hongos tales como: *Armillaria*, *Agaricus* o *Polyporus*; frasco de vidrio de 1 litro con boca ancha; algodón no absorbente; alambre delgado de 10 a 15 cm de largo; disco de papel filtro esterilizado que se adapte al fondo del recipiente; 6 platos Petri con agar agua y varios tubos de ensayo con agar papa dextrosa (APD).

Procedimiento:

Haga un gancho en el extremo del alambre; introduzca el alambre en el algodón de modo que éste cuelgue verticalmente, e inserte el basidiocarpo en el gancho de manera que las laminillas o los poros del hongo queden orientados hacia abajo (Figura 2). Ponga el disco de papel estéril en el fondo del frasco. Después de 24 horas saque el papel y córtelo en bandas, frote suavemente una de estas bandas de papel con las esporas sobre la superficie de un plato con agar agua. Repita la operación frotando el papel 2 ó 3 veces a lo largo de la superficie del agar del mismo plato; prepare una serie de platos en esta forma. Seleccione esporas individuales con la ayuda del microscopio y siémbrelas en tubos de ensayo con APD. Observe el crecimiento del hongo por espacio de 7 días.

Tiempo necesario: 7 días.



Fig. 2. Forma de sujetar el basidiocarpo en el interior del frasco.

REFERENCIAS

BULLER, A. H. R. Spore deposits in the number of spores. In *Researches on fungi*. New York, Longmans, 1909 — Vol. 1, pp. 79-88.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

B. ESPORULACION Y GERMINACION

EJERCICIO 15*

FORMACION DE OOSPORAS EN *PHYTOPHTHORA CINNAMOMI*

Objetivo:

Demostrar la forma de inducir la formación de oosporas en *Phytophthora cinnamomi*.

Materiales:

Cultivos de *P. cinnamomi* el agente causal de la pudrición radical del aguacate o palta (*Persea americana*), y otras plantas; raíces absorbentes de una planta de aguacate o palta; óxido de propileno; frasco de vidrio de 1 litro de capacidad; papel filtro; embudo; plato Petri.

Procedimiento:

Lave las raíces de aguacate y dépositelas en el fondo del frasco; agrégueles 2 a 3 ml de óxido de propileno, tape el frasco herméticamente y manténgalo tapado por 24 horas a fin de esterilizar las raíces. Macere las raíces y agregue una pequeña cantidad de agua. Filtre el macerado a través del papel filtro y siembre pedazos de micelio de *Phytophthora* en el filtrado colocado en el plato Petri. Examine los cultivos al cabo de 5 a 10 días.

P. cinnamomi procedente de otros hospederos ocasionalmente forma oosporas en el extracto de raíces de aguacate.

Tiempo necesario: 10 días.

REFERENCIAS

ZENTMYER, G. A. A substance stimulating sexual reproduction in *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology* 42:24. 1952.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 16*

METODO PARA INDUCIR LA RAPIDA ESPORULACION DE ALGUNOS HONGOS

Objetivo:

Obtener una rápida esporulación de algunos hongos en cultivo.

Materiales:

Varias especies de hongos en tubos de ensayo, por ejemplo, *Aspergillus niger* y *Penicillium expansum*; platos Petri con agar papa dextrosa (PDA), 2 para cada especie; agua destilada esterilizada; asa.

Procedimiento:

Transfiera al centro de la mitad de los platos Petri con APD, una pequeña porción de las colonias que se le han suministrado; estos cultivos servirán como testigo. Agregue 10 ml de agua destilada esterilizada al cultivo de cada hongo, raspe con cuidado la superficie de la colonia con el asa para desprender esporas y fragmentos del micelio, y derrame la suspensión fungosa en otros platos con APD. Permita que la suspensión se asiente y decante el exceso de líquido. Incube los cultivos a temperatura ambiente y examínelos periódicamente a fin de observar el crecimiento y la esporulación de los hongos.

Tiempo necesario: 5 a 7 días.

REFERENCIAS

EICHENMULLER, J. J. Comparison of two methods of inoculation on the sporulation of fungi (Abstr.). *Phytopathology* 42:7. 1952.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 17*

EFECTO ESTIMULANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS EN LA GERMINACION DE LAS ESPORAS

Objetivo:

Demostrar el efecto estimulante de productos naturales en la germinación de las esporas de ciertos hongos.

Materiales:

Cultivos de *Aspergillus niger*; jugo de naranja; agua destilada libre de metales pesados; cámara húmeda de 20 cm de diámetro; 4 portaobjetos; tubos de vidrio en forma de U para sostener los portaobjetos; papel filtro; tela de gasa y centrífuga.

Procedimiento:

Lave la cristalería y enjuáguela varias veces con agua destilada. Coloque 2 discos de papel filtro humedecido en el fondo de la cámara húmeda. Coloque el soporte de vidrio en forma de U en el fondo de la cámara húmeda, y sobre éste coloque 4 portaobjetos. Filtre el jugo de naranja y prepare una solución acuosa al 0,1 por ciento. Haga una suspensión de esporas de *A. niger* agregando 3 a 5 ml de agua destilada al cultivo y agítelo con una varilla de vidrio, para desprender las esporas. Filtre la suspensión de esporas a través de 2 a 3 capas de tela de gasa para remover las hifas. Divida la suspensión de esporas en 2 lotes, centrifugue ambos por 7 minutos y decante el líquido sobrenadante. Resuspenda un lote en agua destilada y el otro en la solución de jugo de naranja, de tal manera que den una concentración final aproximada de 50 a 100 esporas por campo del bajo poder del microscopio. Coloque separadamente 2 gotas de ambas suspensiones por cada portaobjetos. Observe la germinación de las esporas después de 12 a 20 horas de incubación a 25°C. Se pueden usar otros extractos de plantas y otros hongos.

Tiempo necesario: 24 horas.

REFERENCIAS

- McCALLAN, S. E. A. Studies on fungicides. II. Testing protective fungicides in the laboratory. New York (Cornell) Agricultural Experimental Station. Mem. 128. 1934. pp. 8-24.
- McCALLAN, S. E. A. y WILCOXON, F. An analysis of factors causing variation in spore germination tests of fungicides. I. Methods of obtaining spores. Contribution from Boyce Thompson Institute 11:5-20. 1939.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

C. PENETRACION, INFECCION Y PROCESOS POSTERIORES

EJERCICIO 18 *

IMPORTANCIA DE LAS HERIDAS EN LA PENETRACION, INFECCION Y ESTABLECIMIENTO DE CIERTOS HONGOS

Objetivo:

Demostrar que ciertos hongos como *Penicillium sp.* requieren heridas para penetrar y establecerse en el hospedero.

Materiales:

Naranjas con moho azul; cultivos patógenos de *Penicillium sp.*; naranjas sanas; cámaras húmedas.

Procedimiento:

Inocule naranjas sanas con *Penicillium sp.* transfiriendo una buena cantidad de la colonia: 1) a una porción intacta de la cáscara; 2) a una porción herida de la cáscara, procurando que las heridas no lleguen a los sacos de jugo, y 3) a heridas que se profundicen hasta los sacos de jugo. Repita las inoculaciones 1, 2 y 3, utilizando raspados de las partes mohosas de frutos enfermos. Deposite los frutos inoculados en las cámaras húmedas y obsérvelos al cabo de 4 a 5 días.

Tiempo necesario: 4 a 5 días.

REFERENCIAS

- FAWCETT, H. S. y BARGER, W. R. Relation of temperature to growth of *Penicillium italicum* and *P. digitatum* and to citrus fruit decay produced by these fungi. *Journal Agricultural Research* 35:925-931. 1927.
- ROISTACHER, C. N., et. al. Some factors in the control of blue-green mold decay of citrus fruit with ammonia. *Plant Disease Reporter* 42:1112-1122. 1958.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright: 1962, 1967.

EJERCICIO 19*

FORMACION DE APRESORIOS

Objetivo:

Mostrar la formación de apresorios, o discos adherentes que permiten al hongo anclarse al hospedero y penetrar directamente.

Materiales:

Cultivos de *Colletotrichum lindemuthianum* el organismo que causa la antracnosis del frijol; portaobjetos; platos Petri; papel filtro; tubos de vidrio en forma de U para sostener los portaobjetos.

Procedimiento:

Coloque 2 gotas de agua destilada en un portaobjetos. Deposite esporas del hongo en las gotas de agua. Ponga el papel filtro en el fondo de los platos Petri y humedezca el papel; coloque los tubos en forma de U en el fondo y deposite sobre cada tubo 2 portaobjetos preparados en la forma indicada, tape los platos e incúbelos a temperatura ambiente. Saque los portaobjetos de los platos y obsérvelos al microscopio a intervalos de 3 horas. Concluida la observación, vuelva a colocarlos en los platos en la posición original.

Tiempo necesario: 12 horas.

REFERENCIAS

DEY, P. K. Studies in the physiology of the appressorium of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Annals of Botany* 47:305-312. 1933.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 20 *

FORMACION DE APRESORIOS POR UN HONGO PARASITO DE LA RAIZ EN RESPUESTA A EXUDADOS RADICALES

Objetivo:

Demostrar que la actividad de penetración de un hongo parásito de la raíz, tal como *Rhizoctonia solani*, puede estimularse por exudados difusibles de la raíz.

Materiales:

Cultivos de *R. solani* en medio de harina de maíz y arena (estos cultivos deben ser patógenos a la lechuga o al frijol pero no a las plantitas de tomate); suelo libre del hongo pero sin esterilizar; 8 frascos de vidrio de boca ancha de 1/2 litro de capacidad; Erlenmeyer de 500 ml; celofán; plantitas de tomate, lechuga o frijol.

Procedimiento:

Prepare 3 Erlenmeyer con medio de harina de maíz arena (190 g de arena, 10 g de harina de maíz amarillo, 38 ml de agua destilada en frascos Erlenmeyer de 500 ml) y esterilice por 30 minutos a 20 libras de presión. Siembre el hongo en los Erlenmeyer e incúbelos por 2 semanas a 24°C agitándolos ocasionalmente para favorecer el crecimiento del hongo. Infeste el suelo libre de *Rhizoctonia* con el cultivo en harina de maíz y arena a razón de 5 g del cultivo en 100 g de suelo; mézclelo y coloque la mezcla en 8 frascos de vidrio de boca ancha a razón de 400 g/frasco. Prepare 16 bolsas de celofán de 5 x 6,5 cm; hierva en agua el celofán antes de hacer las bolsas para eliminar los materiales extraños. Coloque 4 plantitas de lechuga o frijol de aproximadamente 5 días de edad en cada bolsa de celofán; haga 8 de éstas. Lo mismo debe hacerse con las plantitas de tomate. Cierre las bolsas de celofán con cinta adhesiva "scotch tape". Entierre la base de las bolsas que tienen las plantitas en los frascos inoculados con el hongo a razón de 2 bolsas por frasco. Tape el frasco bien e incúbelo a 24°C. A intervalos de 3, 5 y 7 días, retire 2 bolsas cada vez, lávelas cuidadosamente con agua para eliminar las partículas de suelo, tíñalas con "cotton blue" en lactofenol y observe la superficie de la bolsa al microscopio. Las hifas del hongo se agregan en el celofán en forma opuesta a las raíces de las plantas susceptibles de lechuga o frijol.

Tiempo necesario: 4 semanas aproximadamente.

REFERENCIAS

- FLENTJE, N. T. The physiology of penetration and infection. In Holton, C. S. ed. Plant Pathology, problems and progress. Madison, University of Wisconsin Press, 1959. pp. 78-87.
- KERR, A. Some interactions between plant roots and pathogenic soil fungi. Australian Journal of Biological Sciences 9:45-52. 1956.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 21*

PENETRACION DIRECTA DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* EN FOLIOLOS DE TOMATE

Objetivo:

Mostrar que los tubos germinativos de los esporangios de *Phytophthora infestans* penetran en las hojas de tomate directamente.

Materiales:

Cultivos de *P. infestans* a 21°C, de 1 semana de edad, en agar frijol lima, o folíolos enfermos mostrando abundante esporulación; folíolos de tomate sanos; 4 platos Petri; agua destilada; solución "Carnoy" (1 parte de ácido acético y 2 partes de alcohol absoluto); solución de lactofenol; solución de lactofenol y 1 por ciento anilina azul 1:1; cámara húmeda.

Procedimiento:

Coloque 2 ó 3 folíolos de tomate con el envés hacia arriba en cada plato Petri con agua. Lave la superficie del cultivo de *P. infestans* o los folíolos enfermos con agua destilada (agua destilada en destilador de vidrio), deposite una gota de la suspensión de esporangios en cada folíolo sano y distribúyala sobre la superficie.

Incube en cámara húmeda a 21°C; a las 12, 24, 48 y 96 horas saque muestras de los folíolos y sumérgalas en la solución "Carnoy" por 2 días. Tiña con la solución de lactofenol anilina azul por 2 a 3 días; caliente luego hasta producir vapor y deje enfriar, enjuague en solución de lactofenol para eliminar el exceso de colorante; monte en solución de lactofenol para observar al microscopio.

Tiempo necesario: 10 a 12 días.

REFERENCIAS

FERRIS, VIRGINIA, R. y KENT, G. C. Penetration and infection following direct germination of the sporangia of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 44:110. 1954.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 22*

MACERACION DE TEJIDOS SUCULENTOS CAUSADA POR FILTRADOS DE *RHIZOPUS STOLONIFER*

Objetivo:

Mostrar que los filtrados de cultivos de *Rhizopus stolonifer* (*R. nigricans*) maceran tejidos succulentos de raíces de camote (*Ipomoea batatas*). Este ejercicio muestra además la importancia de las enzimas causantes de la pudrición blanda.

Materiales:

Cultivos de *R. stolonifer*; 500 g de raíz pelada de camote; 10 frascos Erlenmeyer de 250 ml; platos Petri; pinzas; bisturí y navajillas de afeitar.

Procedimiento:

Prepare un medio de cultivo de camote, cociendo 500 g de la raíz en 1000 ml de agua hasta que la raíz se suavice. Filtre y dispense 100 ml en cada uno de los 10 frascos Erlenmeyer. Siembre el hongo. Después de 5 días, filtre el cultivo a través de un filtro de porcelana a fin de separar las esporas y el micelio, y recoja el filtrado. Luego divídalo en 2 partes; hierva una de ellas en baño maría por espacio de 10 minutos. En platos Petri coloque unos 15 ml del filtrado e introduzca en el líquido tajadas muy delgadas de camote fresco de 100 μ de grueso aproximadamente. El testigo es el filtrado hervido. Examine las tajadas después de 3, 6 y 12 horas, levantándolas con una pinza. Observe los tejidos al microscopio.

Tiempo necesario: 1 semana.

REFERENCIAS

- SRIVASTAVA, D. N., ECHANDI, E. y WALKER, J. C. Pectolytic and cellulolytic enzymes produced by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology* 49:145-148. 1959.
- SR.VASTAVA, D. N. y WALKER, J. C. Mechanisms of infection of sweet potato roots by *Rhizopus stolonifer*. *Phytopathology* 49:400-406. 1959.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

D. RAZAS FISIOLÓGICAS

EJERCICIO 23

DETERMINACION DE RAZAS FISIOLÓGICAS EN UN HONGO FITOPATÓGENO

Objetivo:

Demostrar la existencia de razas fisiológicas en un hongo fitopatógeno. Se utiliza para este propósito *Colletotrichum lindemuthianum*, organismo que causa la antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris*).

Materiales:

Cultivos puros de *C. lindemuthianum* de 5 días de edad en medio de cultivo de frutos de frijol; tubos de ensayo de 15 cm de largo por 2 cm de diámetro; algodón absorbente; semillas germinadas de las siguientes variedades de frijol: "michelite, dark red kidney y Perry marrow", frascos de vidrio de boca ancha de 2 litros de capacidad; arena de cuarzo esterilizada; atomizador de mano De Vilbiss N° 15.

Procedimiento:

Deposite suficiente arena de cuarzo en el fondo de los frascos (una capa de 2 cm de profundidad es suficiente), humedézcala con agua esterilizada. Siembre las semillas en los frascos; procure sembrar unas 3 semillas de una misma variedad en cada frasco. Unos 3 días después de la siembra, desprenda la testa de las semillas y asperje las plantas con una suspensión de esporas del hongo desarrollado en frutos de frijol. Este medio se prepara colocando frutos verdes de frijol en tubos de ensayo de 15 cm de largo por 2 cm de diámetro, con un taco de algodón absorbente humedecido en el fondo del tubo. Los tubos se cierran con tapones de algodón y se esterilizan en el autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos.

Después de la inoculación los frascos deben mantenerse tapados por varios días a fin de crear un ambiente de alta humedad. Las plantas inoculadas deben mantenerse entre 15° y 22°C.

Tiempo necesario: 15 días.

REFERENCIAS

- GIESSEN, A. C. v.d., y STEENBERGEN, A. V. A new method of testing beans for anthracnose. *Euphytica* 6:90-93. 1957.
- GOTH, R. W. y ZAUMEYER, W. J. Reaction of bean varieties to four races of anthracnose. *Plant Disease Reporter* 49:815-818. 1965.
- MATHUR, R. S., BARNETT, H. L. y LILLY, V. G. Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology* 40:104-114. 1950.
- YERKES, W. D. y TELIZ, M. New races of *Colletotrichum lindemuthianum* in Mexico. *Phytopathology* 46:564-567. 1956.

CAPITULO III. TOXINAS

A. FORMACION DE FUNGITOXINAS

EJERCICIO 24*

PRODUCCION DE COMPUESTOS FUNGITOXICOS EN TEJIDOS DE ZANAHORIA

Objetivo:

Detectar un compuesto fungitóxico producido en raíces de zanahoria inoculadas con *Ceratocystis fimbriata*, hongo no patógeno a la zanahoria.

Este ejercicio ilustra uno de los muchos cambios histoquímicos que ocurren en los tejidos de las plantas heridas o atacadas por microorganismos.

Materiales:

Dos libras de zanahorias; 10 platos Petri; cultivos jóvenes de *Ceratocystis fimbriata*; 2 pipetas de 10 ml, 2 pipetas de 1 ml; agua estéril; micropipetas; 2 tubos de ensayo; un embudo Büchner de 9 cm; un quitasato de 500 ml; papel filtro Whatman N° 2; papel para cromatografía Whatman N° 1; licuadora.

Tanque para cromatografía; n-butanol, ácido acético y agua (4:1:1 v/v); atomizador de mano pequeño; lámpara de luz ultravioleta (con una longitud de onda de 257 m μ); secador de pelo.

Procedimiento:

Consiga zanahorias frescas y libres de daños visibles, tales como heridas. Lave las raíces con agua y jabón y esterilice la superficie sumergiéndolas por 1 minuto en etanol de 95 por ciento. Corte la raíz en tajadas longitudinales y colóquelas en platos Petri estériles.

Prepare una suspensión concentrada de esporas de *C. fimbriata* usando 15 ml de agua destilada esterilizada y un cultivo joven del hongo. Con la pipeta de 10 ml, cubra los cortes de las tajadas con la suspensión de esporas; deje un número igual de tajadas como testigo, a las cuales sólo se les agrega agua destilada esterilizada. Incube las tajadas por 6 a 7 días a 27°C. Luego retire una capa delgada de más o menos 1 mm de grueso de los cortes inoculados y los testigos (se requieren 20 a 30 g de material inoculado y la misma cantidad del testigo). Coloque el material separado en Erlenmeyers con 150 ml de alcohol de 95 por ciento. Hiérvalo por 5 minutos, déjelo enfriar y trítúrelo en una licuadora por 3 minutos, y filtre a través del papel filtro Whatman N° 2, usando el embudo Büchner. Evapore el alcohol al vacío a una concentración correspondiente a 2 g de tejido fresco por cada ml de extracto. Aplique 1 ml en alícuotas de 0,1 ml de cada extracto en el papel Whatman N° 1, utilizando para esto las micropipetas. Consulte con el profesor o el asistente una vez que haya llegado a este punto.

Desarrolle los cromatogramas usando butanol, ácido acético y agua (4:1:1 v/v) como solvente descendente; éste debe correr aproximadamente 50 cm. Una vez que el solvente haya llegado a unas 3 pulgadas del borde del papel, saque el papel del tanque y déjelo secar al aire. Luego póngalo bajo luz ultravioleta. El compuesto fungistático aparece en el cromatograma como una mancha fluorescente azul, con un valor R_f de 0,84; marque el borde de la mancha con un lápiz.

Tiempo necesario: 8 días.

REFERENCIAS

- CONDON, P. y KUC, J. Isolation of a fungitoxic compound from carrot tissue inoculated with *Ceratocystis fimbriata*. *Phytopathology* 50:267-270. 1960.
- CAROLUS, R. L. y ELLIS, J. E. Bitterness in carrots. *Amer. Vegetable Grower and Market Growers J.* 7:38-40. 1959.
- SOWDHEIMER, E. Possible identity of a fungitoxic compound from carrot roots. *Phytopathology* 51:71-72. 1961.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

CAPITULO IV. NEMATODOS FITOPATOGENOS

A. AISLAMIENTO DEL SUELO

EJERCICIO 25*

METODO DEL EMBUDO DE BAERMANN MODIFICADO PARA AISLAR NEMATODOS DEL SUELO

Objetivo:

Familiarizar al estudiante con uno de los métodos más comunes para extraer nematodos del suelo.

Materiales:

Suelo infestado de nematodos; 2 embudos de vidrio con tubos de goma o hule de 6 a 7 cm de largo aproximadamente; prensas; cedazo de material plástico; papel facial "Scotties"; soporte para los embudos; vidrio de "Syracuse"; microscopio estereoscópico; cuchara grande.

Procedimiento:

Mezcle bien el suelo. Aplique las prensas a los tubos de goma de los embudos, y llene los embudos de agua hasta 2 cm del borde. Ponga los cedazos sobre los embudos y coloque el papel facial sobre el cedazo. Distribuya el suelo sobre el papel facial lo más uniformemente posible; utilice 3 a 5 cucharadas de suelo por embudo. Doble las esquinas del papel y agregue agua hasta que la muestra de suelo quede sumergida. Descarte una pequeña cantidad de agua 5 minutos después de haber colocado el material en el embudo, para eliminar tierra y basuras. Deje los embudos en reposo por 24 horas. Luego tome pequeñas muestras del líquido de cada uno de los embudos, apretando la pinza y recogiendo el líquido en el vidrio de "Syracuse". Observe la muestra bajo el microscopio estereoscópico.

Recoja con una aguja fina hecha de caña de bambú de 5 a 10 nematodos y deposítelos en una gota de agua colocada sobre un portaobjetos limpio. Caliente la gota de agua pasando el portaobjetos varias veces sobre la llama de una lámpara de alcohol; este tratamiento relaja y mata los nematodos. Coloque un cubreobjetos y observe la preparación al microscopio.

Dibuje la porción anterior de varios nematodos, ilustrando diferentes tipos de cavidad bucal.

Tiempo necesario: 24 horas.

REFERENCIAS

- CAIRNS, E. J. Methods in nematology: A review. In Sasser, J. N. y Jenkins, W. R. eds. Nematology. Chapel Hill, University of North Carolina Press, 1960. pp 33-84.
THORNE, G. Principles of nematology. New York, McGraw-Hill, 1961. 553 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 26*

AISLAMIENTO DE NEMATODOS DEL SUELO POR EL METODO COMBINADO DE TAMIZ Y EMBUDO

Objetivo:

Mostrar una técnica simple para aislar nematodos del suelo.

Materiales:

Suelo infestado con nematodos; serie de 3 tamices: malla 30, malla 200 y malla 325; 3 ó 4 vasos de precipitación "beakers" de 250 ml; agua del grifo; embudos con tubos de goma o hule de 6 a 7 cm de largo aproximadamente; 2 cubetas o palanganas; frasco lavador; vidrios de "Syracuse".

Procedimiento:

Deposite 1/2 libra de suelo infestado con nematodos en una cubeta y agregue 10 litros de agua; agite la mezcla por 2 minutos, luego déjela reposar por 30 minutos, y después cuele lentamente el líquido sobrenadante a través de los tamices colocados en serie del siguiente modo: mallas 30, 200 y 325. Descarte el material retenido en el tamiz de malla 30 y ponga en los vasos de precipitación "beakers" el material retenido en los otros 2 tamices, desprendiéndolo con la ayuda del chorro de agua del frasco lavador, aplicado por debajo del tamiz. Transfiera el material a cada uno de los embudos preparados según se describió en el ejercicio N° 25. Descarte una pequeña cantidad de agua 5 minutos después de haber colocado el material en el embudo, para eliminar tierra y basuras. Al cabo de 12 a 24 horas se recogen las muestras, apretando la pinza obturadora, colocada en la manguera de hule del embudo; estas muestras se reúnen en el vidrio de "Syracuse" y se examinan directamente bajo el microscopio estereoscópico.

Los nematodos más grandes se recobran en el tamiz de malla 200 mientras que las formas más pequeñas se retienen en el tamiz de malla 325. Trate de identificar los nematodos que encontró siguiendo el procedimiento indicado en el ejercicio 28.

Tiempo necesario: 24 horas.

REFERENCIAS

- CHRISTIE, J. R. y PERRY, V. G. Removing nematodes from the soil. Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 18:106-108. 1951.
- THORNE, G. Principles of nematology. New York, McGraw-Hill, 1961. 553 p.
- SOUTHEY, J. F. ed. Plant nematology. Great Britain, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Tech. Bul. N° 7, 1959. 175 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

B. AISLAMIENTO DE LAS RAICES

EJERCICIO 27*

AISLAMIENTO DE NEMATODOS ENDOPARASITOS MEDIANTE EL METODO DE INCUBACION

Objetivo:

Demostrar una técnica simple para aislar nematodos endoparásitos de los tejidos de plantas atacadas.

Materiales:

Raíces de plantas atacadas por nematodos (*Pratylenchus*, el método es aplicable a otros géneros); frascos de vidrio o bolsas de polietileno; vidrios de "Syracuse"; bandas de hule o goma.

Procedimiento:

Lave las raíces atacadas para eliminar la tierra, colóquelas en los frascos o bolsas y agrégueles una pequeña cantidad de agua; tape los frascos o cierre las bolsas con una banda de hule o goma; coloque los recipientes a temperatura ambiente por 24 horas. Los nematodos salen de las raíces y permanecen en el agua. Tome una pequeña muestra del agua en el vidrio de "Syracuse" y examine el líquido bajo el microscopio estereoscópico. Trate de identificar algunas de las formas observadas siguiendo el procedimiento descrito en el ejercicio 28.

Tiempo necesario: 2 a 3 días.

REFERENCIAS

- YOUNG, T. W. An incubation method for collecting migratory endoparasitic nematodes. *Plant Disease Reporter*. 38:794. 1954.
- THORNE, G. *Principles of nematology*. New York, McGraw-Hill, 1961. 553 p.
- SOUTHEY, J. F. ed. *Plant nematology*. Great Britain, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *Tech. Bul. N° 7*, 1959. 175 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

C. PREPARACIONES DE NEMATODOS

EJERCICIO 28

PREPARACIONES TEMPORALES Y PERMANENTES DE NEMATODOS

Objetivo:

Demostrar la forma de efectuar preparaciones temporales y permanentes de nematodos.

Materiales y Procedimiento:

PREPARACIONES TEMPORALES:

Las preparaciones para uso inmediato se hacen colocando los nematodos en una gota de agua destilada.

Pueden hacerse preparaciones útiles por varias semanas o meses sustituyendo el agua destilada por una solución de formaldehído al 5 por ciento.

El procedimiento a seguir para efectuar estas preparaciones es el siguiente:

1. Coloque una gota de agua destilada o de formaldehído al 5 por ciento en el centro de un portaobjetos.
2. Localice un nematodo en el vidrio de "Syracuse" con la ayuda del microscopio de disección, utilizando un aumento de 15 a 45X.
3. Levante el nematodo cuidadosamente hasta la superficie del agua con la ayuda de una aguja de bambú; mientras realiza esta operación, mantenga el nematodo bajo observación con el microscopio.
4. Cuando el nematodo se encuentra justo bajo la superficie del agua, levántelo rápidamente para sacarlo del agua.
5. Coloque el nematodo en la gota de agua o de solución de formaldehído.
6. Observe la preparación bajo el microscopio de disección para asegurarse de que el nematodo fue depositado en el portaobjetos.
7. Con la ayuda de unas pinzas coloque un cubreobjetos sobre el líquido.
8. Si los nematodos se mueven en el agua, caliente el portaobjetos por 5 a 6 segundos sobre la llama de una lámpara de alcohol. Esto los mata y los relaja.
9. Elimine el exceso de agua o solución de formaldehído con la ayuda de papel absorbente. La preparación está lista para observarse al microscopio.
10. La preparación en solución de formaldehído se sella con una mezcla de partes iguales de parafina y vaselina. Esta mezcla se calienta y una vez líquida, se aplica con un pincel fino a los bordes del cubreobjetos. También puede sellarse con esmalte de uñas.

Preparación de la aguja de bambú para recoger los nematodos:

Tome una astilla de bambú seco de 15 cm de largo y 3 mm de ancho aproximadamente, afine uno de los extremos con una navajilla bajo el microscopio, de modo que se obtenga una punta lo más aguda posible. Esta aguja se puede usar directamente o se puede cortar y colocar en un mango de metal.

PREPARACIONES PERMANENTES:

Transfiera los nematodos de la solución de formaldehído al 5 por ciento a un vidrio de reloj o vidrio de "Syracuse" con una solución que contenga 1,5 por ciento de glicerina y 10 por ciento de alcohol etílico. Permita que los nematodos permanezcan en esta solución por espacio de 1 semana. Luego inicie el proceso de evaporación lenta del agua.

El vidrio de reloj o vidrio de "Syracuse", que contiene los nematodos, se coloca en un desecador con cloruro de calcio anhidro. Este absorbe el vapor de agua lentamente dejando los nematodos en última instancia en glicerina concentrada. Permita que el proceso de evaporación del agua se efectúe con lentitud; para esto se requiere de 3 a 4 semanas.

Montaje de los nematodos:

Deposite una gota de glicerina pura en el centro de un portaobjetos corriente o en un portaobjetos de aluminio especial para este tipo de preparaciones. Transfiera a la gota nematodos de aproximadamente el mismo diámetro. Coloque 3 varillitas de vidrio de varios milímetros de largo obtenidas de algodón de vidrio. Las varillitas de vidrio deben ser de un diámetro mayor que el de los nematodos, a fin de que sirvan de soporte al cubreobjetos y los nematodos no se deterioren cuando se ejerza presión sobre el cubreobjetos. Para facilitar esta operación mantenga en reserva una buena cantidad de varillitas de vidrio en glicerina pura. Arregle los nematodos en la gota de glicerina, y las varillitas de vidrio en forma tal que sirvan de orientación para encontrar los nematodos cuando se observe la preparación al microscopio. Caliente un cubreobjetos y colóquelo sobre la gota de glicerina, la cual debe ser de un tamaño tal que no se acumule líquido en los bordes del cubreobjetos. Selle la preparación con zut* coloreado.

REFERENCIAS

- GOODEY, J. B. Laboratory methods for work with plant and soil nematodes. 2nd. ed. Great Britain, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Tech. Bul. N° 2, 1957. 47 p.
- THORNE, G. Principles of nematology. New York, McGraw-Hill, 1961. 553 p.
- SOUTHEY, J. F. ed. Plant nematology. Great Britain, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Tech. Bul. N° 7, 1959. 175 p.

* Zut es un sellador especial que se obtiene en Bennet, 65-West First South Street, Salt Lake City 10, Utah, U.S.A.

CAPITULO V. VIRUS FITOPATOGENOS

A. TRANSMISION MECANICA

EJERCICIO 29*

INOCULACION DE PLANTAS CON EL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO

Objetivo:

Demostrar la naturaleza infecciosa y la transmisión mecánica del virus del mosaico del tabaco.

Materiales:

Hojas de tabaco atacadas por mosaico del tabaco o tabaco elaborado extraído de cigarros. Plantas de tabaco, chile o pimiento, tomate y frijol (Pinto), a las cuales se les ha eliminado la yema terminal; pipeta de 1 ml; vasos de precipitación "beakers" de 100 ml; solución de K_2HPO_4 al 1 por ciento; carborundo malla 400 ó 600; mortero y pistilo; tela de gasa.

Procedimiento:

Triture 10 g de material infectado con mosaico del tabaco en 25 ml de solución al 1 por ciento de K_2HPO_4 . Cuele el material a través de tela de gasa. Espolvoree carborundo sobre las hojas de las plantas a inocular y frótelas suavemente con un algodón empapado en el inóculo, o empape la yema del dedo pulgar en el inóculo y frote las hojas con cuidado. Lávese las manos con agua y jabón para eliminar el virus.

Coloque las plantas inoculadas en un invernadero a 26 °C aproximadamente, donde reciban bastante luz. Obsérvelas a los 5, 10 y 15 días de la inoculación.

Tiempo necesario: 15 días aproximadamente.

REFERENCIAS

BAWDEN, F. C. Plant viruses and virus diseases. 4th ed. New York, Ronald Press, 1964. 361 p.
LUCAS, G. B. Diseases of tobacco. New York, Scarecrow Press, 1958. 498 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 30*

DETERMINACION DE LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS DEL MOSAICO DEL TABACO POR EL METODO DE LAS LESIONES LOCALES

Objetivo:

Determinar la infectividad relativa de varias diluciones de un virus, mediante el método de las lesiones locales.

Materiales:

Hojas de plantas afectadas por el mosaico del tabaco; 4 plantas jóvenes de *Nicotiana glutinosa* o de la variedad H-425; morteros y pistilos; carborundo malla 400 a 600; frasco volumétrico calibrado en ml. Pipetas esterilizadas de 1 y 10 ml; tubos de ensayo esterilizados; algodón y solución de K_2HPO_4 al 1 por ciento.

Procedimiento:

Prepare varias diluciones de mosaico del tabaco en solución al 1 por ciento de K_2HPO_4 . Calcule las diluciones en base a la savia obtenida de las hojas; haga diluciones de $1:10^2$ a $1:10^8$. Espolvoree las hojas con carborundo e inocule las plantas frotando las hojas suavemente con un algodón empapado en el inóculo. Inocule primero con las diluciones más altas. Para cada dilución use un algodón nuevo. Después de la inoculación, lave las hojas cuidadosamente con agua a fin de eliminar el exceso de inóculo y el carborundo. Inocule la mitad izquierda de cada hoja con una dilución constante del virus ($1:10^3$), y la mitad derecha con la dilución bajo estudio.

Los resultados de este ejercicio deben presentarse en forma de curva: logaritmo de la dilución vs. número de lesiones locales por hoja.

Tiempo necesario: 1 semana.

REFERENCIAS

BAWDEN, F. C. Plant viruses and virus diseases. 4th ed. New York, Ronald Press, 1964. 361 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

B. TRANSMISION POR INSECTOS

EJERCICIO 31

TRANSMISION DEL VIRUS Y DE LA PAPA (PVY) POR MEDIO DE INSECTOS

Objetivo:

Demostrar la transmisión de un virus por insectos.

Materiales:

Áfidos (*Myzus persicae*); platos Petri; discos de 9 cm de diámetro de papel filtro; pincel fino; plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) con virus y plantas sanas, muy pequeñas, de tabaco.

Procedimiento:

Recoja 10 áfidos de plantas colonizadas y transfíeralos a un plato Petri con un papel filtro humedecido en el fondo. Los áfidos se transfieren uno a uno, levantándolos cuidadosamente con el pincel. Mantenga los áfidos en el plato Petri por espacio de 1 hora (período de ayuno). Tome un áfido del plato Petri con el pincel y deposítelo en una planta de tabaco atacada por la necrosis de las venas del tabaco; obsérvelo hasta que comience a chupar, déjelo chupar por 20 a 30 segundos; levántelo con el pincel y deposítelo sobre una planta de tabaco sana. Tenga cuidado de no tocar la hoja sana con el pincel ni con las manos. Conviene poner sobre las hojas sanas un pedazo de papel muy pequeño, y sobre éste depositar los áfidos. Repita la operación con 4 áfidos más. Después de 15 minutos, aplique insecticida para eliminar los áfidos y deposite las plantas en el invernadero.

Este ejercicio también puede hacerse utilizando plantas de pepino con Virus del Mosaico del Pepino, y plantas de pepino inoculadas en las hojas cotiledonales.

Tiempo necesario: de 2 a 3 semanas.

REFERENCIAS

BAWDEN, F. C. Plant viruses and virus diseases. 4th ed. New York, Ronald Press, 1964. 361 p.

CAPITULO VI. DISEMINACION DE LOS AGENTES PATOGENOS

EJERCICIO 32*

DISPERSION DE BACTERIAS Y HONGOS POR EL SALPIQUE DEL AGUA

Objetivo:

Demostrar la importancia del salpique del agua en la dispersión de bacterias y esporas de hongos fitopatógenos.

Materiales:

Cultivos de bacterias y hongos en esporulación, tales como: *Erwinia carotovora* (causante de la pudrición blanda); *Xanthomonas phaseoli* (causante del tizón bacteriano común del frijol); *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp.; pipeta o gotero; platos Petri con agar papa dextrosa (APD); platos Petri vacíos; colorante eosina; papel blanco de envolver 2 x 2 m.

Procedimiento:

Coloque el papel blanco sobre una mesa o en el suelo y deposite sobre el papel un plato Petri invertido. Sobre el plato Petri coloque una gota de una suspensión concentrada de bacterias o esporas de uno o más de los organismos mencionados antes. Entre 50 y 100 cm de distancia de éste coloque varios platos Petri descubiertos, que contengan APD. Deje caer gotas de agua con el gotero o la pipeta desde una altura de 2 a 3 m sobre la suspensión de bacterias o esporas o ambas. Luego tape los platos y espere que aparezcan las colonias.

Deposite una gota de eosina en un plato Petri invertido y colóquelo exactamente en la posición que ocupaba el plato con la suspensión de bacterias o esporas y deje caer gotas de agua con el gotero o la pipeta sobre la gota del colorante.

Las gotas de agua dispersan el inóculo, y éste a su vez cae sobre los platos con APD; una vez que aparezcan las colonias se notará el patrón de distribución del inóculo. El salpique de la eosina sobre el papel blanco mostrará un patrón de distribución similar al del inóculo.

En este ejercicio pueden utilizarse plantas susceptibles en vez de los platos Petri.

Tiempo necesario: de 2 a 6 días.

REFERENCIAS

GREGORY, P. H., GUTHRIE, E. G. y BUNCE, MAUREEN. Experiments on splash dispersal of fungus spores. *J. Gen. Microbiology* 20:328-354. 1959.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 33

EFFECTO DEL AGUA Y DEL VIENTO EN LA DISEMINACION DE LAS CONIDIAS DE *CERCOSPORA COFFEICOLA*

Objetivo:

Demostrar la eficacia del agua en comparación con el viento en la diseminación de las esporas de *Cercospora coffeicola*.

Materiales:

Hojas de café con lesiones jóvenes de chasparria causada por *Cercospora coffeicola*. Las lesiones deben estar cubiertas de esporas; abanico eléctrico; gotero y microscopio estereoscópico.

Procedimiento:

Seleccione una lesión con abundante cantidad de esporas, obsérvela al microscopio y sujétela de modo que pueda observar las conidias continuamente. Coloque el abanico en forma tal que lance la corriente de aire a la superficie de la hoja, y observe las conidias. Desconecte el abanico y deposite una gota de agua sobre la lesión y observe el comportamiento de las conidias. Lance nuevamente la corriente de aire a la superficie de la hoja y continúe observando las conidias.

Tiempo necesario: de 20 a 30 minutos.

REFERENCIAS

ECHANDI, E. La chasparria de los cafetos causada por el hongo *Cercospora coffeicola* Berk y Cooke. Turrialba 9:54-67. 1959.

EJERCICIO 34*

EXPULSION DE LAS ASCOSPORAS DE *GIBERELLA ZEA*

Objetivo:

Demostrar que las ascosporas de *Giberella zea*, el agente que causa la pudrición del tallo y de la mazorca de maíz, son arrojadas al aire desde los peritecios maduros del hongo.

Materiales:

Peritecios frescos y maduros de *G. zea*, en tejidos de plantas de maíz; platos Petri con agar papa dextrosa (APD); cinta adhesiva "scotch tape".

Procedimiento:

Corte pedazos de tejidos de maíz que contengan los peritecios del hongo. Invierta los platos con APD y pegue los pedazos de tejido de maíz al interior de la tapa del plato, de manera que los peritecios permanezcan orientados verticalmente. Coloque el fondo del plato sobre la tapa y permita que el plato permanezca invertido. Coloque los platos sobre la mesa del laboratorio y obsérvelos a intervalos de 12 ó 24 horas.

Tiempo necesario: de 4 a 6 días.

REFERENCIAS

INGOLD, C. T. *Dispersal in fungi*. Oxford, Clarendon Press, 1953. 197 p.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1982, 1987.

CAPITULO VII. INOCULO EN EL SUELO

EJERCICIO 35*

INOCULO POTENCIAL EN EL SUELO

Objetivo:

Aislar *Rhizoctonia solani* de desechos de plantas enfermas que han permanecido en el suelo, a fin de demostrar que un parásito puede permanecer por un tiempo más o menos largo en fragmentos de plantas en descomposición.

Materiales:

Muestras tomadas al azar de los primeros centímetros del suelo de un campo en el cual se ha cultivado frijol, y que estuvo fuertemente atacado por el mal del talluelo. Muestras similares, pero provenientes de un terreno en que el cultivo estuvo sano. Criba de malla 60; platos Petri con agar agua al 2 por ciento, (el pH del agar agua debe ajustarse a 4,8 — 5,0) tubos de ensayo con agar papa dextrosa (APD); papel filtro de 15 cm de diámetro, agujas de disección, pinzas y asa.

Procedimiento:

Suspenda separados, 100 g de suelo procedente de uno y otro campo, en 2,5 litros de agua del grifo. Cuele la suspensión a través de la criba. Resuspenda el material que quedó en la criba en 1 litro de agua y repita la operación de 5 a 8 veces. Recoja las partículas gruesas en un recipiente de vidrio que contenga 50 ml de agua, tómelas con una pinza y colóquelas en el papel filtro; tápelas doblando el papel y permita que se sequen a la temperatura ambiente. Transfiera 100 partículas tomadas al azar a 20 platos Petri (5 por plato). Incube al ambiente por 2 a 3 días. Transfiera el hongo a tubos de ensayo con APD.

Tiempo necesario: Para separar las partículas, de 2 a 3 horas. Para el resto, de 2 a 3 días.

REFERENCIAS

BOOSALIS, M. G. y SCHAREN, A. L. Methods for microscopic detection of *Aphanomyces euteiches* and *Rhizoctonia solani* associated with plant debris. *Phytopathology* 49:192-198. 1959.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

CAPITULO VIII. COMBATE DE LAS ENFERMEDADES POR MEDIOS QUIMICOS

EJERCICIO 36*

MICROORGANISMOS PATOGENOS EN LAS SEMILLAS Y TRATAMIENTO QUIMICO DE LAS MISMAS

Objetivo:

Demostrar la presencia de organismos patógenos en las semillas y determinar el efecto de ciertos productos químicos usados comunmente en la protección de las mismas.

Materiales:

Una docena o más de platos Petri; Agar jugo V-8, agar nutritivo y agar papa dextrosa (APD); 30 g de semillas de frijol, maíz, arroz o sorgo. Si desea aislar los microorganismos en cultivo puro y efectuar inoculaciones, se requiere además de lo especificado, tubos de ensayo con agar nutritivo y APD; macetas con suelo o arena y semillas para obtener las plantas que serán inoculadas.

Procedimiento:

1. Utilice aproximadamente 5 platos Petri con agar jugo V-8, por tratamiento. Tome 100 semillas por tratamiento y coloque de 10 a 20 por plato, de acuerdo con el tamaño; las semillas deben quedar bien distribuídas. Una vez colocada la etiqueta con la fecha y el tratamiento, invierta los platos (excepto aquellós que tienen semillas grandes) e incúbelos por 2 semanas.

Haga recuentos a intervalos cortos; tomando en cuenta el número de semillas que presentan hongos o bacterias, o ambos. Para su identificación las colonias de bacterias deben sembrarse en platos con agar nutritivo y los hongos en platos con APD.

2. Trate las semillas con bicloruro de mercurio, sumergiéndolas en una solución 1:1000 de 1 a 5 minutos, e inmediatamente después enjuáguelas en agua esterilizada. Luego trate las semillas con Arasan, Phygon XL y otros fungicidas utilizados para proteger las semillas. Cada fungicida constituye un tratamiento. Coloque las semillas en un frasco, agregue suficiente polvo fungicida para cubrirlas y agítelas por 1 minuto; extienda luego las semillas en un papel, tómelas con unas pinzas y siémbrelas en los platos como se indicó al principio.

Tiempo necesario: La preparación del material requiere unas pocas horas, pero el tiempo de incubación es de 2 semanas.

REFERENCIAS

- GARDNER, M. W. y KENDRICK, J. B. Bacterial spot of tomato. *Journal of Agricultural Research* 21:123-156. 1921.
- HOGBORG, W. A. F., WARNER, GLADYS M. y PHILLIPS, AGNES N. Use of 2-4-D as inhibitor of germination in routine examinations of beans for seed-borne infections. *Science* 111:91. 1950.
- KILPATRICK, R. A. Fungi associated with flowers, pods and seeds of soybeans. *Phytopathology* 47:131-135. 1957.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 37*

COMBATE DEL MAL DEL TALLUELO POR MEDIOS QUIMICOS

Objetivo:

Demostrar la eficacia del tratamiento del suelo y de la semilla en el combate del mal del talluelo "Damping-off".

Materiales:

Un cultivo de *Rhizoctonia solani* patógeno al frijol; semillas de frijol; suelo cernido; PCNB (Terrasan o Terraclor, polvo mojable que contiene 75 por ciento de Pentacloronitrobenceno); agar papa dextrosa (APD); platos Petri; licuadora; 3 cajas de madera.

Procedimiento:

Siembre el hongo en 50 platos Petri con APD. Después de 8 días triture las colonias en una licuadora y mezcle el micelio triturado con 48 libras de suelo cernido.

Divida el suelo inoculado en 3 lotes de 16 libras cada uno. Coloque 2 lotes en 2 de las cajas de madera. Marque 6 surcos en cada caja y siembre 15 semillas de frijol en cada surco. Trate la semilla a sembrar en la primera caja con PCNB (Pentacloronitrobenceno) a razón de 0,8 g/100 g de semillas; la semilla para la segunda caja permanecerá sin tratar, como testigo.

Extienda el tercer lote de suelo sobre un papel y pese suficiente PCNB hasta obtener 100 partes de material activo por cada millón de partes de suelo; esto corresponde aproximadamente a una concentración de 220 Kg/Hect. (primeros 15 cm de suelo). Agregue 100 ml de agua al fungicida, disuélvalo y mézclelo uniformemente con el suelo. Luego siembre las semillas como se indicó antes.

Los tres tratamientos son:

1. Semilla protegida químicamente, suelo sin tratar con fungicida.
2. Semilla sin proteger, suelo sin tratar con fungicida; testigo.
3. Semilla sin proteger, suelo tratado con fungicida.

Tiempo necesario: De 14 a 21 días.

REFERENCIAS

LEUKEL, R. W. Treating seeds to prevent diseases. In U.S. Department of Agriculture. Yearbook of agriculture 1953. Washington, D.C., 1954. pp. 134-145.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1962, 1967.

EJERCICIO 38*

ESTIMACION DEL RESIDUO FUNGICIDA EN EL FOLLAJE

Objetivo:

Demostrar el uso y la aplicación de fungicidas, y familiarizar al estudiante con un método bioanalítico por medio del cual se puede determinar el poder residual de los fungicidas, el efecto de la superficie de la hoja, y el efecto de las condiciones climáticas en el lavado de los fungicidas.

Materiales:

Agar papa dextrosa (APD); 12 plantas de frijol y 12 de café; platos Petri; cultivos de *Myrothecium roridum*; fungicidas (ver procedimiento); atomizadoras; probetas de 10, 100 y 1000 ml; sacabocados de 13 a 15 mm de diámetro; pipetas de 5 ml; abanico eléctrico.

Procedimiento:

Prepare 600 ml de APD y déjelo enfriar hasta que el recipiente pueda ponerse en contacto con la mejilla sin causar daño (el APD debe estar en forma líquida). Prepare una suspensión de esporas de *M. roridum* que contenga más o menos 15.000 esporas/ml. Agregue asépticamente 10 ml de esta suspensión al APD líquido y agítelo hasta que las esporas se hayan difundido en el medio. Prepare 40 platos utilizando 15 ml de la suspensión por plato. Permita que el medio se solidifique.

PREPARACION DE LOS FUNGICIDAS:

1. Caldo bordelés 5-5-50: Prepare una solución madre de CaO al 12,5 por ciento y otra de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 12,5 por ciento. Deposite en un frasco 50 ml de una solución diluida de sulfato cúprico (10 ml de la solución madre en 40 ml de agua) y agregue lentamente, con agitación, 50 ml de solución de cal hidratada diluida (10 ml de la solución madre en 40 ml de agua). Esto producirá una mezcla azul cielo, en la cual no debe formarse ningún precipitado.

2. Ferbam: Fermate (76 por ciento de dimetil-ditiocarbamato de hierro), 2,5 g/litro de agua; aproximadamente 2 libras/100 galones de agua, que es la concentración que se usa comercialmente. Agregue agua al fungicida hasta que todo se haya disuelto.

3. Zineb: Ditano Z-78 (65 por ciento de etileno-bis-ditiocarbamato de zinc). Para su preparación siga el mismo procedimiento descrito para el Ferbam.

APLICACION DE LOS FUNGICIDAS AL FOLLAJE:

Mediante un atomizador limpio cubra las hojas de 3 plantas con cada fungicida y deje 3 plantas como testigo. El fungicida debe aplicarse hasta que comience a gotear de las hojas. Una vez atomizadas las plantas, colóquelas cerca del abanico eléctrico para que se sequen.

LLUVIA ARTIFICIAL:

Coloque las plantas asperjadas bajo un atomizador fino para que reciban agua en forma de lluvia; esponga las plantas a este tratamiento por 30 minutos.

PRUEBA DEL RESIDUO FUNGICIDA:

Desprenda las hojas de las plantas, coloque las hojas secas con el envés hacia abajo en una toalla de papel y con el sacabocados, corte 8 discos; tenga especial cuidado en que los discos sean uniformes. El sacabocados debe lavarse y secarse al cortar discos de diferentes tratamientos. Tome los discos con unas pinzas y bajo condiciones asépticas colóquelos sobre el agar con la suspensión de esporas con el haz hacia abajo. En cada plato coloque 4 discos correspondientes al mismo tratamiento. Los discos deben quedar a 2 cm de separación aproximadamente. **No mueva el disco una vez depositado en el agar.**

Efectúe la operación en condiciones asépticas. Incluya, como testigo, hojas sin atomizar. Después de 48 horas mida el diámetro de las zonas de inhibición y presente los datos en un cuadro.

Tiempo necesario: 10 días.

REFERENCIAS

- LEBEN, C. y KEITT, G. W. Laboratory and greenhouse studies of antimycine preparation as protectant fungicides. *Phytopathology* 39:529-540. 1949.
——— y KEITT, G. W. A bioassay for treamethylthiuramdisulfide. *Phytopathology* 40:950-954. 1950.

*Parte de este ejercicio se tradujo del "SOURCEBOOK OF LABORATORY EXERCISES IN PLANT PATHOLOGY" del Sourcebook Committee of the American Phytopathological Society. W. H. Freeman and Company. Copyright 1932, 1967.

CAPITULO IX. PREPARACION Y DISPENSACION DE MEDIOS DE CULTIVO

A. MEDIOS DE CULTIVO

Muchos hongos y bacterias fitopatógenas pueden cultivarse en medios de cultivo artificiales, sólidos o líquidos. La mayoría de los hongos crecen en medios de cultivo de alto contenido de carbohidratos, con un pH que fluctúa entre 5 y 6, mientras que las bacterias crecen mejor a un pH próximo a 7. No existe un medio ideal para el cultivo de hongos y bacterias ya que las exigencias de las diferentes especies varían considerablemente. Los medios de cultivo se clasifican de acuerdo a su composición en dos grandes grupos: **medios naturales**, compuestos de infusiones de productos naturales, cuya composición exacta no se conoce y **medios sintéticos**, que contienen ingredientes de composición química conocida y por lo tanto pueden duplicarse con cierto grado de precisión. El procedimiento para la preparación de algunos medios de cultivo aparece a continuación:

Agar papa dextrosa (APD)

Papas peladas y partidas	200 g
Dextrosa (glucosa)	20 g
Agar	17 g
Agua destilada hasta completar	1000 ml

Cocine las papas peladas y partidas en 500 ml de agua por 1 hora. Simultáneamente en otro recipiente en baño maría, disuelva el agar en 500 ml de agua. Cuele el extracto de papas a través de varias capas de tela de gasa, mezcle ambos líquidos, agregue la dextrosa y agite la mezcla. Restaure el volumen a 1000 ml con agua. Dispense el medio en recipientes apropiados y esterilice a 15 libras de presión por 20 minutos.

Papa dextrosa (PD)

Igual al agar papa dextrosa pero sin el agar.

Agar nutritivo

Extracto de carne de res	3 g
Peptona	10 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta completar	1000 ml

Disuelva el agar en 800 ml de agua destilada utilizando un baño maría. Agregue los otros ingredientes y ajuste el volumen del líquido a 1000 ml. Dispense el medio en recipientes apropiados y esterilice en el autoclave a 15 libras de presión por espacio de 20 minutos.

Agar jugo V-8

Jugo V-8	200 ml
Carbonato de calcio	3 g
Agar	20 g
Agua destilada	800 ml

Agregue 200 ml de jugo V-8 a 800 ml de agua tibia, agregue el carbonato de calcio y el agar agitando la mezcla. Caliente en baño maría hasta disolver el agar; una vez que el agar se haya

disuelto, lleve el volumen a 1000 ml con agua destilada. Dispense el medio en recipientes adecuados y esterilice en el autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Agar agua

Agar	20 g
Agua destilada hasta completar	1000 ml

Disuelva el agar en 800 ml de agua utilizando un baño maría; y una vez disuelto, lleve el volumen con agua a 1000 ml. Dispense el medio en recipientes apropiados y esterilice en el autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos.

Agar frijol lima

Frijol lima molido	100 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta completar	1000 ml

Remoje en agua los frijoles lima (*Phaseolus limensis*) por 30 minutos. Hiérvalos por 30 minutos en baño maría con suficiente agua; filtre a través de tela de gasa; coloque el líquido nuevamente en baño maría, agregue el agar y agite el líquido hasta que el agar se disuelva, restaure el volumen del líquido a 1000 ml con agua destilada. Dispense el medio en recipientes adecuados y esterilice en el autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos.

Agar harina de maíz

Harina de maíz	20 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g
Agua destilada hasta completar	1000 ml

Caliente 500 ml de agua a 70°C y agregue la harina de maíz manteniendo la temperatura alrededor de 60°C por 1 hora. Filtre a través de tela de gasa. Simultáneamente disuelva el agar en 500 ml de agua en baño maría y una vez disuelto mézclelo con el filtrado de harina de maíz. Agregue la dextrosa y lleve el volumen a 1000 ml con agua destilada. Dispense el medio en recipientes apropiados y esterilice en el autoclave a 15 libras de presión por espacio de 20 minutos.

Agar Czapek (Conn, 1921)

Fosfato de potasio (K_2HPO_4)	1,0 g
Nitrato de sodio ($NaNO_3$)	2,0 g
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,5 g
Cloruro de potasio (KCl)	0,5 g
Sulfato ferroso ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,01 g
Sacarosa	30,0 g
Agar	15,0 g
Agua destilada	1000,0 ml

Disuelva el agar en 500 ml de agua, en baño maría. Disuelva los otros ingredientes en 500 ml de agua, y mezcle ambas soluciones. Agregue la sacarosa después de que los otros ingredientes se hayan disuelto. Ajuste el pH a 7,0. Dispense el medio en recipientes adecuados y esterilice en el autoclave a 15 libras de presión por 20 minutos.

B. ESTERILIZACION

Esterilización en el autoclave:

El autoclave consiste de una cámara cerrada de doble forro que se utiliza para la esterilización con vapor de agua a presión. El vapor puede introducirse directamente o producirse en una cámara especial colocada por lo general bajo el cilindro. Para poner el autoclave a funcionar, se sustituye el aire en el cilindro por vapor de agua a presión. La mayoría de los medios de cultivo se esterilizan a 15 libras de presión por pulgada cuadrada, por espacio de 20 minutos a una temperatura 120°C. Los recipientes grandes deben esterilizarse por más de 20 minutos.

Esterilización de la cristalería:

La cristalería se esteriliza por medio de aire caliente. Para hacerlo se usa por lo general un horno que funciona a 160-180°C por espacio de 1 hora. En estos hornos corrientemente se esterilizan tubos de ensayo, platos Petri, pipetas, morteros y otros. Medios líquidos nunca se esterilizan por este procedimiento.

C. DISPENSACION

Dispensación del medio de cultivo en platos Petri:

Una vez que el medio de cultivo y los platos Petri se hayan esterilizado, se procede a dispensar el medio en los platos. Utilice para la operación una cámara de transferencias o en su defecto, humedezca la superficie de una mesa con un desinfectante líquido y procure que en el recinto no haya corrientes de aire. Coloque los platos en la mesa, encienda una lámpara de alcohol y proceda de la manera siguiente:

1. Tome el recipiente que contiene el medio, destápelo con la mano izquierda sin tocar la boca del recipiente. Pase la boca del recipiente sobre la llama de una lámpara de alcohol.
2. Con la mano izquierda levante un lado de la tapa del plato solamente lo necesario para insertar la boca del recipiente y dispense de 10 a 12 ml del líquido.
3. Coloque la tapa del plato en su sitio y tape el recipiente que contiene el agar. Agite el plato con un movimiento de rotación a fin de que el medio se distribuya uniformemente.
4. Permita que el medio se solidifique antes de usarlo.

Dispensación del medio de cultivo en tubos de ensayo:

Antes de esterilizar el medio de cultivo, éste se coloca en un embudo sujeto a un soporte vertical. El embudo desemboca en un tubo de hule o goma de 6 a 7 cm de largo aproximadamente, que lleva en el extremo un tubo de vidrio en forma de gotero; para regular el paso del líquido, se ajusta una pinza en el tubo de goma. Cuando se dispensa agar, el equipo debe mojarse primero con agua caliente a fin de evitar obstrucciones. Por lo general se dispensan alrededor de 5 ml del medio por tubo de ensayo. Evite que la boca de los tubos se moje con el medio de cultivo porque esto favorece las contaminaciones y además los tapones se pegan a los tubos.

Los tapones de algodón deben quedar ajustados de tal modo que los tubos puedan ser levantados tirando de ellos, sin que se destapen. Luego se acomodan los tubos en canastillas de alambre y se introducen al autoclave para su esterilización. Una vez esterilizados y con el agar aun líquido, se colocan inclinados en una mesa del laboratorio de modo que el nivel del agar quede a unos 3 cm del tapón. Para este propósito pueden utilizarse varillas de madera de 1,5 cm de grueso por el largo necesario para acomodar los tubos. Una vez que el agar se solidifique, los tubos deben guardarse en un cuarto fresco, protegidos del polvo y las contaminaciones hasta que se vayan a usar.

A N E X O S

TEXTOS IMPORTANTES EN FITOPATOLOGIA

- ALEXOPOULOS, C. J. Introductory mycology. New York, Wiley, 1952. 482 p.
———. Laboratory manual for introductory mycology. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1955. 177 p.
- ANDERSON, H. W. Diseases of fruit crops. New York, McGraw-Hill, 1956. 501 p.
- ARTHUR, J. C. The plant rusts (Uredinales). New York, Wiley, 1929. 446 p.
- BARNETT, H. L. Illustrated genera of imperfect fungi. 2nd ed. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1960. 225 p.
- BAWDEN, F. C. Plant viruses and virus diseases. 4th ed. New York, Ronald Press, 1964. 361 p.
- BAZAN DE SEGURA, CONSUELO. Enfermedades de cultivos tropicales y sub-tropicales. Lima, José D. Segura M., 1965. 439 p.
- BESSEY, E. A. Morphology and taxonomy of the fungi. Philadelphia, Pa., Blakiston, 1950. 791 p.
- BOYCE, J. S. Forest pathology. 3rd ed. New York, McGraw-Hill, 1961. 572 p.
- BRANDES, G. A., ed. Compendium of plant diseases (with 125 colored illustrations). Philadelphia, Pa., Rohm and Haas Co., 1959. 264 p.
- BUTLER, E. J. y JONES, J. G. Plant pathology. London, McMillan, 1949. 979 p.
- CHESTER, K. S. The nature and prevention of plant diseases. 2nd ed. Philadelphia, Pa., Blakiston, 1947. 525 p.
- CHRISTENSEN, C. M. Molds and man; an introduction to the fungi. Minneapolis, Minn., University of Minnesota Press, 1951. 244 p.
———. Common fleshy fungi. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1961. 246 p.
- CHRISTIE, J. R. Plant nematodes, their bionomics and control. Gainesville, Fla., University of Florida, Agr. Exp. Sta., 1959. 256 p.
- CHUPP, C., y SHERF, A. F. Vegetable diseases and their control. New York, Ronald Press, 1960. 693 p.
- COCHRANE, V. W. Physiology of fungi. New York, Wiley, 1958. 524 p.
- COOK, M. T. Enfermedades de las plantas económicas de las Antillas. Traducido directamente del manuscrito original por José I. Otero. Río Piedras, P.R., Universidad de Puerto Rico, 1939. 530 p.
- CORBETT, M. K. y SISLER, H. D., eds. Plant virology. Gainesville, University of Florida Press, 1964. 527 p.
- CUMMINS, G. B. Illustrated genera of rust fungi. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1959. 131 p.
- DICKSON, J. G. Diseases of field crops. 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1956. 517 p.
- DOWSON, W. J. Plant diseases due to bacteria. 2nd ed. Cambridge, England, Cambridge University Press, 1957. 231 p.
- ELLIOT, C. E. Manual of bacterial plant pathogens. 2nd ed. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co., 1951. 186 p.
- FERGUS, C. L. Illustrated genera of wood decay fungi. Minneapolis, Minn., Burgess, 1960. 132 p.
- FERNANDEZ-VALIELA, M. V. Introducción a la Fitopatología. Buenos Aires, República Argentina, Talleres Gráficos "Gadala", 1952. 872 p.
- FINCHAM, J. R. S. y DAY, P. R. Fungal genetics. Philadelphia, F. A. Davis, Co., 1963. 300 p.
- FULTON, J. P., et al. Plant pathology laboratory manual. 2nd ed. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1960. 95 p.
- GARCES, C. Control de las enfermedades de las plantas. Medellín, Colombia, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional, 1954. 381 p.
- GARRETT, S. D. Biology of root-infecting fungi. London, Cambridge University Press, 1960. 293 p.
———. Root disease fungi. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co., 1944. 177 p.
- GRAY, W. D. The relation of fungi to human affairs. New York, Henry Holt and Co., 1959. 510 p.
- GORLENKO, M. V. Bacterial diseases of plants. Trans. from Russian by S. Nemchonok. 2nd ed. Jerusalem. Israel Program for Scientific Translations, 1965. 174 p.
- HEALD, F. D. Introduction to plant pathology. New York, McGraw-Hill Book Co., 1937. 579 p.

- HOLTON, C. S., ed. *Plant pathology: problems and progress*. Madison, Wisc., The University of Wisconsin Press, 1959. 588 p.
- HORSFALL, J. G. *Fungicides and their action*. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co., 1945. 239 p.
- . *Principles of fungicidal action*. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co., 1956. 279 p.
- . y DIMOND, A. E., eds. *Plant pathology, an advanced treatise*. I. The diseased plant. New York, Academic Press, 1959. 674 p.
- . y DIMOND, A. E., eds. *Plant pathology, an advanced treatise*. II. The pathogen. New York, Academic Press, 1960. 715 p.
- . y DIMOND, A. E., eds. *Plant pathology and advanced treatise*. III. The diseased population, epidemics and control. New York, Academic Press, 1960. 675 p.
- JOHNSON, L. F., et al. *Methods for studying soil microflora-plant disease relationships*. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1959. 178 p.
- LARGE, E. C. *The advance of the fungi*. New York, Holt, 1940. 488 p.
- LEACH, J. G. *Insect transmission of plant diseases*. New York, McGraw-Hill, 1940. 615 p.
- LILLY, V. G., y BARNETT, H. C. *Physiology of the fungi*. New York, McGraw-Hill, 1951. 464 p.
- LUCAS, G. B. *Diseases of tobacco*. New York, The Scarecrow Press, 1958. 498 p.
- ORDISH, G. *Untaken harvest*. London, Constable and Co., 1952. 171 p.
- PIRONE, P. P., DODGE, B. O. y RICKETT, H. W. *Diseases and pests of ornamental plants*. New York, The Ronald Press Co., 1960. 775 p.
- PLANT DISEASES—the yearbook of agriculture. United States Dept. of Agr., Washington, D. C., 1953. 940 p.
- RAWLINS, T. E., y TAKAHASHI, W. N. *Technics of plant histochemistry and virology*. Milbrae, Calif., National Press, 1952. 125 p.
- RIKER, A. J., y RIKER, REGINA, S. *Introduction to research on plant diseases*. St. Louis, Mo., Swift, 1936. 117 p.
- RUBIN, B. A. y ARTSIKHOVSKAYA, Y. V. *Biochemistry and physiology of plant immunity*. New York, The MacMillan Co., 1963. 358 p.
- SASSER, J. N. y JENKINS, W. R., eds. *Nematology, fundamentals and recent advances*. Chapel Hill, University of North Carolina Press, 1960. 480 p.
- SHARVELLE, E. G. *The nature and uses of modern fungicides*. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co., 1961. 308 p.
- SMITH, K. M. *Recent advances in plant viruses*. 2nd ed. London, Churchill Ltd. 1951. 300 p.
- . *Plant viruses*. Methuen Monographs. New York, Wiley, 1960. 209 p.
- SPRAGUE, R. *Diseases of cereals and grasses in North America*. New York, Ronald Press, 1951. 538 p.
- STAKMAN, E. C. y HARRAR, J. G. *Principles of plant pathology*. New York, Ronald Press, 1957. 581 p.
- STANLEY, W. M. y VALENS, E. G. *Viruses and the nature of life*. New York, Dutton, 1961. 224 p.
- STAPP, C. *Bacterial plant pathogens*. London, Oxford University Press, 1961. 292 p.
- STEVENS, N. E. y STEVENS, R. B. *Disease in plants; an introduction to agricultural phytopathology*. Waltham, Mass., Chronica Botanica Co., 1952. 219 p.
- THORNE, G. *Principles of nematology*. New York, McGraw-Hill, 1961. 553 p.
- VAN DER PLANK, J. E. *Plant diseases: epidemics and control*. New York, Academic Press, 1963. 349 p.
- WAKSMAN, S. *Microbial antagonisms and antibiotic substances*. New York, Commonwealth Fund, 1945. 350 p.
- WALKER, J. C. *Diseases of vegetable crops*. New York, McGraw-Hill, 1952. 529 p.
- . *Plant pathology*. 2nd ed. New York, McGraw-Hill, 1957. 707 p.
- WESTCOTT, CYNTHIA. *Plant disease handbook*. New York, D. Van Nostrand Co., 1950. 746 p.
- WOLF, F. A. y WOLF, F. T. *The fungi*. New York, Wiley, 1947. 2 V.

FUENTES DE MATERIALES DE LABORATORIO

A. UTENSILIOS DE LABORATORIO:

Arthur H. Thomas Co.
West Washington Square,
Philadelphia, Pa., U. S. A.

Fisher Scientific Co. Limited
St. Louis, 285OS. Jefferson Ave.
St. Louis, Mo. 63118., U. S. A.

Carolina Biological Supply Co.,
Elon College, North Carolina
U. S. A.

General Biological Supply House
(Turtox), 761-763 East 69th Place
Chicago, Illinois, U. S. A.

Standard Scientific Supply Corporation,
34 W. 4th. St.
New York 12, N. Y., U. S. A.

B. MEDIOS DE CULTIVO

Difco Laboratories, Inc.
Detroit 1, Michigan, U. S. A.

C. CULTIVOS

American Type Culture Collection
12301 Parklawn Drive
Rockville, Maryland 20852, U.S.A.

D. PREPARACIONES FIJAS

Triarch Botanical Products
(Geo. H. Conant),
Ripon, Wisconsin, U. S. A.

Carolina Biological Supply Co.
Elan College
North Carolina, U. S. A.

Este libro se terminó de imprimir en los Talleres Gráficos Cecil, S. A., en Lima, Perú, el ocho de setiembre de mil novecientos sesenta y siete.

LIBRERIA
BIBLIOTECA
BOLOGNA



PROGRAMA DE TEXTOS Y MATERIALES DE ENSEÑANZA

La carencia de textos y materiales adecuados a las necesidades actuales de la enseñanza, es uno de los principales obstáculos que enfrentan las Facultades de Agronomía de América Latina, en el desarrollo de sus programas educativos.

El IICA inició el Programa de Textos y Materiales de Enseñanza en 1958, con el auspicio de la Fundación Kellogg. Su finalidad principal es la de ayudar a los profesores de las Facultades de Agronomía Latinoamericanas, para que conviertan en libros sus textos provisionales, sus resúmenes de curso, sus apuntes o sus ejercicios de laboratorio. Auspicia además, la traducción al español de obras fundamentales escritas en otros idiomas en aquellos campos de estudio en que no existan buenos textos en castellano.

Este Programa cuenta con una donación de la Fundación Kellogg para ayudar a los autores en la preparación de sus obras y con un fondo rotatorio para la publicación de libros.

LIBROS EN VENTA

—Extensión Agrícola. Principios y Técnicas, por H. Frías, J. Ramsay y L. R. Beltrán	US\$ 3.50
—Manual de Fisiología Vegetal, por L. Müller	2.50
—Producción de Hortalizas, por E. Cásseres pasta dura rústica	4.00 2.90
—Reproducción y Genética Animal, por J. de Alba	5.50
—Sociología y Desarrollo Rural, por A. M. Arce	2.00
—Sociología Rural para los Programas de Acción, por O. Leonard y R. A. Clifford	2.00

LIBROS EN PROMOCION *

—Administración Rural, por J. A. Hopkins	2.00
—Cacao, por D. H. Urquhart	2.00
—Fisiología de la Lactancia, por V. R. Smith	2.00

* NOTA: Estos libros no tienen descuentos debido a que su precio de promoción está por debajo de sus costos.

PROXIMAS PUBLICACIONES

- Fundamentos Botánicos de los Cultivos Tropicales, por J. León (en prensa)
- Administración Rural, por S. Pérez, N. Amaral, E. Delgado y otros
- Ecología de los Cultivos, por F. Hardy
- Equipo para Procesamiento de Productos Agrícolas, por C. W. Hall
- Estadística y Diseños Experimentales, por S. Justesen y R. Umaña
- Manual de Análisis Químico de Suelos, por E. Bornemisza y J. Saiz del Río
- Manual de Anatomía y Morfología Vegetal, por L. Müller
- Manual de Pasturas, por A. T. Semple
- Manual de Secado y Almacenamiento de Granos, por N. C. Ives
- Nutrición Animal. Manual de Procedimientos Analíticos, por J. V. Bateman
- Metodología de la Enseñanza, por W. Mc Keachie
- Suelos Tropicales, por F. Hardy

LUGARES DE DISTRIBUCION

BOLIVIA: Librería Distribuidora Los Amigos del Libro, Casilla 450, Cochabamba, Bolivia.
BRASIL: IICA, Caixa Postal 74-ZC-01 Largo do Machado, Río de Janeiro, Brasil.
COLOMBIA: IICA-CIRA, Apartado Aéreo 14592, Bogotá, Colombia; Asociación Colombiana de Ingenieros Agrónomos, Casilla 5528, Bogotá, Colombia; Facultad de Agronomía e Instituto Forestal, Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 568, Medellín, Colombia; Facultad de Agronomía del Valle, Universidad Nacional de Colombia, Apartado Aéreo 31, Palmira (Valle), Colombia.
COSTA RICA: Oficina de Distribución de Publicaciones, Centro de Enseñanza e Investigación, San José, Costa Rica; Librería Universal, San José, Costa Rica; Librería Lehmann, San José, Costa Rica.
CHILE: IICA, Casilla 31, Santiago, Chile.
ECUADOR: Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
GUATEMALA: IICA-ZONA NORTE, Apartado 1815, Guatemala, Guatemala.
MEXICO: IICA, Londres 40, Tercer piso, México D. F., México.
PANAMA: Universidad de Panamá, Cooperativa de Libros, Apartado 3277, Panamá, Rep. de Panamá.
PERU: IICA-ZONA ANDINA, Apartado 478, Lima, Perú; Librería Studium, Camaná 939, Lima, Perú.
URUGUAY: IICA-ZONA SUR, Casilla de Correos 1217, Montevideo, Uruguay.