



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



**TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE HONGOS
FITOPATÓGENOS**

AUTORES:

Blanco Jhoanna
García Luismar
Gómez Betzaida
Hernández Jefferson

TUTOR ESPECIALISTA

Legna Rojas

BÁRBULA, JUNIO 2016



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



CONSTANCIA DE ENTREGA

La presente es con la finalidad de hacer constar que el trabajo Monográfico titulado:

**TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE HONGOS
FITOPATÓGENOS**

Presentado por los bachilleres:

Blanco Jhoanna C.I: 22.518.514
García Luismar C.I: 22.404859
Gómez Betzaida C.I: 22.740.570
Hernández Jefferson C.I: 20.292.628

Fue leído el trabajo monográfico y se considera que cumple con los parámetros metodológicos exigido para su aprobación. Sin más a que hacer referencia, se firma a los 5 días del mes de mayo del año 2015.

**Prof. Legna Rojas
C.I: 16.801887**

Firma



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMEDICAS Y TECNOLOGICAS
T.S.U. EN HISTOTECNOLOGIA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



CONSTANCIA DE APROBACIÓN

Los suscritos miembros del jurado designados para examinar el Trabajo Monográfico titulado:

**TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE HONGOS
FITOPATÓGENOS**

Presentado por los bachilleres:

Blanco Jhoanna C.I: 22.518.514
García Luismar C.I: 22.404859
Gómez Betzaida C.I: 22.740.570
Hernández Jefferson C.I: 20.292.628

Hacemos constar que hemos examinado y aprobado el mismo, y que aunque no nos hacemos responsables de su contenido, lo encontramos correcto en su calidad y forma de presentación.

Fecha: _____

Profesor(a)

Profesor(a)



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



**TÉCNICAS PARA EL DIAGNÓSTICO Y ESTUDIO DE HONGOS
FITOPATÓGENOS**

AUTORES:

Blanco Jhoanna
García Luismar
Gómez Betzaida
Hernández Jefferson

TUTOR:

Legna Rojas

AÑO: 2016

RESUMEN

Los hongos se conocen como organismos eucarióticos, tanto unicelulares como pluricelulares, se reproducen mediante esporas, viven sobre materias orgánicas en descomposición o parásitos de vegetales o animales. Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo que altera su morfología, y pueden afectar de manera negativa la salud del ser humano al ser consumida, estos tipos de hongos son llamados Fitopatógenos. La presente investigación tiene como objetivo general describir los diferentes tipos de hongos fitopatógenos mediante técnicas específicas y por consiguiente como objetivos específicos, indagar sobre las técnicas empleadas para estos organismos, diferenciar las especies de hongos fitopatógenos que afectan a la salud de las plantas y del ser humano y por último reconocer las fuentes de contaminación por la presencia de estos. Este informe monográfico fue realizado de manera documental, con un diseño bibliográfico. Basados en la recolección de información se llega a la conclusión de que al identificar el tipo de hongo que ha afectado a la planta se debe recurrir al estudio de la morfología y característica de este, para poder proporcionar un diagnóstico preciso y contrarrestar los efectos negativos causados tanto en la salud del ser humano como en la de la planta, solucionando el problema desde su origen, es decir, durante la cosecha.

Palabras clave: Hongos, fitopatógenos, diagnóstico



**UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BIOMÉDICAS Y TECNOLÓGICAS
T.S.U EN HISTOTECNOLOGÍA
TRABAJO MONOGRÁFICO**



**TECHNIQUES FOR THE DIAGNOSIS AND STUDY IN THE
PHYTOPATHOGENIC FUNGI**

AUTHORS:

Blanco Jhoanna
García Luismar
Gómez Betzaida
Hernández Jefferson

ADVISOR:

Legna Rojas

YEAR: 2015

ABSTRACT

Fungis are eukaryotic organisms, both known as multicellular unicellular the reproduce by spores, live on decaying organic or parasites of vegetable and animal materials. All plants are attacked by some sort of fungus that alters their morphology, and some adversely affect human health when being consumed, these types of fungi are called Phytopathogenic s. This research has the general objective to describe the different types of plant pathogenics fungis using specific techniques and therefore specific objectives, inquire about the techniques used for these organisms, differentiate species of plant pathogenics fungis that affect the health of the plant and human being, and finally recognize the sources of contamination by the presence of these. This case report was made documentary way, with a bibliographical design. Based on data collection its concluded that to identify the type of fungus that has affected the plant one must resort to the study of the morphology and characteristics, in order to provide an accurate diagnosis and counteract caused negative effects both human health and the plant, solving the problem at its source, that is to say during harvest.

Keywords: Fungi, plant pathogens, diagnosis

INDICE

CONSTANCIA DE ENTREGA.....	ii
CONSTANCIA DE APROBACION.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
INTRODUCCIÓN.....	7
DESARROLLO.....	10
ANTECEDENTES.....	12
SINTOMAS EN PLANTAS.....	13
TECNICAS.....	14
AFECCIONES EN HUMANOS.....	19
CONCLUSIÓN.....	24
RECOMENDACIONES.....	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

INTRODUCCION

Los hongos son organismos eucariontes unicelulares o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos con poca luz y se clasifican en el reino fungi, tienen una gran diversidad en cuanto a su tamaño y forma; sin embargo, son divididos generalmente en dos grupos: los mohos y las levaduras. Los hongos son responsables de numerosas enfermedades y pueden crecer en cualquier superficie, la ciencia que se encarga de estudiarlos es la micología. Estos organismos presentan aproximadamente ocho mil especies, se reconocen cuando causan enfermedades en las plantas mediante desequilibrios en el metabolismo celular de estas, esto ocurre debido a secreciones de enzimas, toxinas y otras sustancias.¹

Existen una gran diversidad de hongos, un ejemplo de ello son aquellos que causan enfermedades en las plantas a los cuales se les denomina “fitopatógeno” provenientes de phyton: “planta” y pathos: “dolencia”. Es importante mencionar que muchos hongos aparte de ser causantes de enfermedades en plantas, son capaces de producir micotoxinas, es decir, compuestos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos que pueden generar efectos nocivos sobre la salud humana y animal. El correcto diagnóstico provee una cantidad considerable de información básica para seleccionar métodos acordes al organismo en cuestión; para ello es fundamental la observación de la estructura somática y reproductiva del hongo de manera específica, los métodos de diagnóstico pueden variar.^{2,3}

Ahora bien, el daño ocasionado por la infección de hongos fitopatógenos no repercute solo en pérdidas económicas para las industrias sino también en la disminución de la producción biológica, esto significa que en presencia de estos organismos la planta hospedante presentará alteración en su crecimiento y desarrollo, lo que determinará la reducción de su producción. En este sentido, resulta indispensable lograr identificar al agente causal de la patología, de lo

contrario cualquier estrategia de control podría ser infructuosa o eventualmente agravar el estado sanitario del cultivo. ²

Con el paso de los años, se han recopilado una serie de datos que destacan la problemática que representan los hongos fitopatógenos para la salud de los seres humanos, como en el caso ocurrido durante los años de 1845 y 1846 en los cuales un hongo denominado *Pytophthora infestans* fue el causante de una enfermedad en el cultivo de papa, llamada Tizón tardío, que provocó una epidemia devastadora en el norte de Europa provocando una terrible hambruna que causo la muerte de aproximadamente 25.000 personas y la inmigración de más de un millón y medio de irlandeses a Estados Unidos. ²

Otras enfermedades que afectan a la salud de la planta y aún siguen siendo reportadas por las numerosas pérdidas económicas son el mal producido por la *Sclerotinia sclerotiorum* en raíces y bulbos, la Roya común del maíz producida por *Puccinia sorgh* y la Roya del café ocasionada por *Hemileia vastatrix*. Cabe recalcar que no es posible hacer un diagnóstico de todas las enfermedades con base a la observación directa del tejido infectado, debido a que muchos hongos fitopatógeno no producen los cuerpos fructíferos requeridos por la taxonomía, sino en condiciones determinadas de temperatura y humedad tal como sucede en las cenicillas y las Royas. ⁴

En la actualidad, el medio ambiente se encuentra perturbado por la presencia de estos hongos, algunos de los factores que han generado tales condiciones lo constituyen el exceso de humedad y el uso incorrecto de fungicidas e insecticidas. Por lo que, las plantas se encuentran expuestas constantemente al posible riesgo de contaminación de forma indiscriminada, pues la ausencia de legislaciones coherentes con la problemática permite esta exposición descontrolada. Es por ello que se puede afirmar que el delicado equilibrio del medio ambiente que rodea y da soporte tanto a la salud de la planta como a la del ser humano ha sido sustancialmente alterado, por lo que se han añadido nuevos factores de riesgo para la salud de actuales y futuras generaciones. ⁴

Tomando en cuenta las diversas afectaciones económicas y sanitarias que generan estos hongos, se hace necesaria la investigación de diferentes técnicas que conduzcan a una identificación precisa de ellos. Por consiguiente, se plantea como objetivo general, describir los diferentes tipos de hongos fitopatógenos mediante técnicas específicas, y como objetivos específicos, indagar sobre los diferentes tipos de técnicas de diagnóstico, diferenciar las especies de hongos que afectan la salud de las plantas y del ser humano, y reconocer las fuentes de contaminación por presencia de hongos Fitopatógenos.

Desde el punto de vista teórico, la presente investigación brinda la información necesaria para adquirir el previo conocimiento de las diferentes técnicas de diagnóstico para la determinación de hongos fitopatógenos, esto permitirá inspeccionar infecciones o invasiones producidas en plantas. Estas diferentes técnicas de diagnóstico, son de importancia en centros de investigación agrícola o instalaciones en donde cultiven plantas destinadas al comercio industrial, permitiendo la identificación de enfermedades en los cultivos vegetales. De igual manera es de gran ayuda para el consumidor, debido a que muchas de las enfermedades en plantas producidas por estos hongos son vistas macroscópicamente en el vegetal, esto permitirá una alerta al comprador, previniéndolo de enfermedades pertinentes que pueden repercutir en la salud del mismo. Es posible recalcar, que esta investigación puede ser usada como manual de estudio para investigadores biólogos, así como al estudiante histólogo que desee especializarse en la rama de la histopatología vegetal.

La modalidad del presente trabajo monográfico es de tipo documental, con un diseño bibliográfico, debido a que se basa en la recolección de fuentes de información de carácter documental para el sustento de la problemática antes expuesta, permitiendo una previa investigación para el logro del fin planteado, el conocimiento de las diferentes técnicas para el diagnóstico de hongos fitopatógenos.⁵

DESARROLLO

Reseña Histórica

Desde el inicio de los tiempos los hongos han estado presentes en la vida del hombre por lo que han ido evolucionando conjuntamente, al principio fueron tomados como alimentos y con el avance de la ciencia y la curiosidad humana llegaron a ser empleados como cura de enfermedades. En la historia de la humanidad, las enfermedades de las plantas tuvieron impacto en muchas regiones. En Europa, debido a la escasez de alimentos en el siglo XIX, tubérculos de batata se perdieron tras una enfermedad hoy conocida como tizón. (El Tizón; Hongo de pequeño tamaño que vive parásito en el trigo y otros cereales, cuyo micelio invade preferentemente los ovarios de estas plantas y forma esporangios en los que se producen millones de esporas de color negrozco). En Irlanda, donde la alimentación se basaba prácticamente en la batata, cerca de dos millones de personas murieron de hambre. ⁶

Hábitos alimentarios de una población entera fueron afectados por enfermedades de las plantas. En Sri Lanka, se producía café para exportación cuando en 1869 una enfermedad conocida como "herrumbre del café", causado por el hongo *Hemileia vastatrix* devastó las plantaciones de café. Inglaterra, que importaba café de Sri Lanka en aquel entonces, procuró otra bebida, y entonces substituyó el café por el té, bebida más popular entre los ingleses hoy. ⁷

Así pues, la muerte de muchas personas en la Edad Media fue causada por una enfermedad denominada ergotismo, ya que el hongo *Claviceps purpurea*, que produce toxinas infectaba el grano de centeno. "El pan hecho con el centeno contaminado causaba hormigueo en los miembros, elevación de temperatura corporal, problemas mentales, aborto, gangrena, alucinaciones y muerte".

También es relevante acotar que las enfermedades en plantas pueden ocasionar cambios en el paisaje, un ejemplo sería el de los olmos (árboles de América del Norte e Europa) que fueron diezmados por la enfermedad holandesa del olmo. “En la ciudad canadiense de Montreal, por ejemplo, casi todos los 35.000 olmos fueron exterminados por esta enfermedad. El agente de esta enfermedad es el hongo *Ophiostoma Ulmi*, transmitido por besosares. Se cree que este hongo llegó a América del Norte en pedazos de maderas importadas del Reino Unido”²

En Brasil, enfermedades de plantas fueron responsables de causar grandes pérdidas económicas en la Amazonía. Los árboles que producen goma, fueron plantados en gran escala en Pará para producir goma, para hacer neumáticos para coches. La enfermedad, “el mal de las hojas” causada por el hongo *Microcyclus Ulei* diezmó las plantaciones. Así como también en el sur de Asia, donde no existía esta enfermedad, las plantaciones aumentaron, lo que hizo que actualmente sean los mayores productores de goma del mundo.⁸

Antecedentes de la Investigación

Según, Trigos A, Ramírez K, Salinas A. (2008) quienes presentaron un trabajo que lleva por título: “Presencia de hongos fitopatógeno en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria” el cual fue publicado en el año 2008 en la Revista virtual Mexicana de Micología. Este artículo cuya investigación fue de tipo De Campo y Cuasi-Experimental demostró la existencia de gran diversidad de hongos que pueden proliferar en frutos y hortalizas expuestas en el medio ambiente o en cultivos agrícolas y que son capaces de generar diferentes cantidades de micotoxinas perjudiciales para la salud humana y animal. En dicha investigación se utilizaron 28 muestras mensuales durante un año para la observación y demostración del experimento realizado en territorio mexicano tomando como referencia gran cantidad de material bibliográfico no solo del continente americano, sino también de trabajos de campos anteriores realizados en diferentes partes del mundo. Finalmente el artículo hizo referencia a las

diferencias de las medidas de seguridad que son menos infectivas en los países menos desarrollados en comparación con el continente europeo y los estados unidos, el artículo proporciona información valiosa sobre el grado de patogenicidad de los hongos fitopatógeno identificados.⁷

Así como también, (2011) la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas el cual lleva por título “Estimación histopatológica del grado de infección inducido por *Stagonospora nodorum* (berk.) *castellani* & *germano* en plántulas de trigo (*triticum aestivum*)”, el mismo fue publicado en el año 2011. OBJETIVO GENERAL El tipo de investigación fue Documental. Entre tanto, el diseño fue bibliográfico, y de un nivel descriptivo, llegando a concluir que el grado de daño inducido por *Stagonospora nodorum* al establecerse en las hojas de la plántula de trigo varía según el genotipo de la planta ya que existen variaciones genéticas que resisten a la infección del hongo y en algunos casos no presentar ninguna resistencia. Esta investigación se empleó como antecedente debido a que *Stagonospora nodorum* es un hongo fitopatógeno que afecta a la planta de trigo en todas las etapas de su desarrollo, desde la semilla que es el foco de diseminación, hasta la plántula y finalmente la planta en su madurez dando como consecuencia una pérdida parcial o total de plantación si no se toman las debidas precauciones.⁸

Hongos Fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son aquellos que causan enfermedades en las plantas, como ya se mencionó, son organismos unicelulares o pluricelulares. Los pluricelulares las células se agrupan en filamentos llamados fías que en su conjunto reciben el nombre de micelio. Anteriormente los hongos pertenecían al reino Plantae, pero por carecer de clorofila y tener una composición química diferente en la pared celular, se clasificaron en reinos diferentes. Su nutrición es heterótrofa, en comparación a las plantas ellos no producen su propio alimento. ⁸

Características morfológicas

Los hongos son relacionados con la descomposición de la materia orgánica, siendo sinónimo de mohosidad y putrefacción. Su tamaño varía desde los más desarrollados que crecen sobre la materia en descomposición tejiendo una red de fibras en el suelo, hasta las levaduras unicelulares que solo pueden ser observadas al microscopio. La respiración celular en estos organismos sucede en las mitocondrias presentes en el citoplasma y las células tienen una disposición elaborada del sistema interno de membranas, crecen en condiciones aeróbicas y obtienen energía por oxidación de la materia orgánica. ⁸

Reproducción de los Hongos Fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos se reproducen por esporas, estas son diseminadas por el viento, el cual las transporta a grandes distancias, la lluvia, el agua de escurrimientos y los insectos son agentes importantes en su diseminación. Muchos de estos hongos pasan gran parte de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped y otra parte en el suelo, en los residuos vegetales que allí se encuentran, en la mayoría de los casos, los cuerpos reproductores del hongo se forman en la superficie de los tejidos de la planta huésped, esto las dispersa de manera rápida y eficiente. ⁶

Las esporas de los hongos se forman en estructuras conocidas como conidióforos, esporangios, ascocarpos, basidios, etc., las cuales son empleadas para la correcta identificación de estos organismos; tales estructuras pueden observarse directamente sobre la superficie del órgano vegetal afectado o dentro de los tejidos, incluso intercelularmente, la mayoría de los hongos fitopatógenos tienen estructuras poco notables; por lo general, el micelio se extiende dentro de los tejidos del hospedante, y no es posible observarlo a simple vista. A la superficie, solo afloran las estructuras reproductivas y estas son microscópicas o difícilmente visibles a simple vista, sin embargo muchos de ellos pueden cultivarse en medios

sintéticos adecuados para cada especie, lo que es de gran ayuda para su diagnóstico.⁶

Ciclo de Vida

La gran diversidad de los hongos, así como su importancia fitopatológica, justifican una revisión de sus principales subdivisiones taxonómicas. Dentro de estos hongos hay tres clases cuyo lugar en la sistemática no presenta mucha controversia; para empezar tenemos los Ficomycetes, en esta clase de hongos fitopatógeno destaca la amplitud de ciclos de vida, la especie más estudiada en esta clase es *Phytophthora infestans*, la cual causa el tizón tardío de la papa, se caracteriza por lesiones necróticas en las hojas, tallos y tubérculos; estas lesiones pueden permanecer localizadas o volverse extensivas; los Ascomycetes, esta clase contiene miles de especies, incluyendo saprofitos, parásitos facultativos y parásitos obligados.⁷

Entre las especies fitopatógenas se encuentran diversos grados de complejidad en cuanto a ciclos de vida, dependiendo de las estructuras de cada especie y la relación que tenga con su o sus hospedantes, un ejemplo de esto es la especie *Mycosphaerella musicola*, que causa la sigatoka del banano y otras musáceas; y los Basidiomicetes, allí se encuentran las especies más diversas y más evolucionadas de los hongos. Existen cuatro órdenes de importancia fitopatológica: Ustilaginales, Uredinales, Agaricales y Polyporales.⁷

Sintomatología ocasionada por Hongos Fitopatógenos

Phytophthora infestans, causante del Tizón tardío del cultivo de papa. inicialmente aparecen pequeñas lesiones verde pálido a verde oscuro. Bajo condiciones favorables para su desarrollo estas lesiones crecen rápidamente, se tornan marrones a negras, y se transforman en lesiones necróticas que pueden matar

totalmente el tejido foliar, e incluso terminar matando a la planta. Se puede observar también un halo clorótico alrededor de la lesiones. Ante condiciones de alta humedad aparece un moho blanquecino en los bordes de las lesiones. ⁹

Sclerotinia sclerotiorum, causante de podredumbre blanca. Las lesiones del tallo se producen al nivel del suelo o cerca de las axilas foliares y son ligeramente hundidas, ovaladas o alargadas, extendiéndose hacia arriba por el tallo. De aspecto húmedo al principio, las lesiones acuosas se vuelven de color marrón, blanco en el centro, anillado o localizado. Los tallos afectados llegan a estar cubiertos por una capa de micelio blanco. La médula central se destruye y el vacío se llena con un micelio blanco que posteriormente se transforma en esclerócios duros negros, de 0.5 a 1.0 cm de largo. ¹⁰

Los ápices de suelen marchitarse y el tallo se parte o se quiebra al nivel del suelo. Los tubérculos cercanos a la superficie del suelo se arrugan, se oscurecen superficialmente y se tornan acuosos. Posteriormente, las cavidades se llenan con un micelio blanco y esclerocios. Cuando los esclerocios germinan, forman capas miceliales o pequeños apotecios en forma truncada desde los cuales las esporas se transportan por el viento a infectan las hojas y los tallos de muchos cultivos y malezas dicotiledóneas ¹⁰

Puccinia sorghi, causante de la roya del maíz. Presenta en grano lechoso, como pequeñas puntuaciones amarillas y en grano pastoso, se presentan pústulas, en fajas, rodeadas de zonas necróticas. *Hemileia vastatrix*, causante de la roya del café. El micelio con los uredinios poseen un aspecto amarilloso-anaranjado y polvoriento y aparece en el envés de las hojas como puntos de más o menos 0,1 mm de diámetro. Las lesiones recientes aparecen como moteados cloróticos o sitios amarillos pálidos con apenas unos cuantos milímetros de diámetro, en cambio, las lesiones que llevan mucho más tiempo poseen lesiones de un tamaño que llega a centímetros de diámetro. ⁹

Técnicas para la Detección de Hongos

Una de las técnicas más empleadas es la de cultivación de hongos fitopatógenos en medio sintético, este método es en general sencillo, y solo para algunas especies puede llegar a ser muy laborioso. Esto depende de los requerimientos nutricionales de cada especie en particular, así como de sus exigencias en cuanto a los otros factores que intervienen en su desarrollo. La base de este sistema de identificación de hongos fitopatógenos son los medios de cultivo. No obstante, es importante recalcar que ciertos hongos, tales como los causantes de royas, mildius y cenicillas no han podido ser cultivados con éxito en un medio nutritivo, estos son llamados parásitos obligados. ¹⁰

Otro método empleado es el aislamiento de hongos patógenos el cual se basa principalmente en la selección de tejidos adecuados, estos deben ser previamente lavados y cortados justamente en la zona donde se evidencie la lesión, luego se desinfecta con hipoclorito de sodio al 0.5% por 30 a 120 segundos, seguidamente se enjuagan con agua estéril y se colocan sobre la superficie de medio sólido de papa-dextrosa-agar (PDA) previamente acidificado para reducir el crecimiento de bacterias, y esperar que crezca el hongo. Se pueden incluir variación referente al tipo de desinfectante, como por ejemplo emplear el etanol al 70% o cloruro de mercurio al 0.1%), también se puede eliminar el desinfectante con papel toalla estéril en vez de agua estéril, el aislamiento de tejidos internos sin desinfección, uso de antibióticos en lugar de acidificación para inhibir el crecimiento de bacterias, todo esto puede variar con el fin de adecuar el procedimiento a situaciones particulares. ¹⁰

Una vez haya ocurrido el crecimiento del hongo es indispensable pasarlo a un nuevo medio de cultivo para que este crezca en cultivo puro (también llamado cultivo axénico, esto es, sin otros organismos), el crecimiento del hongo conlleva a la producción de esporas que permitirán su identificación; es importante recalcar que muchos hongos esporulan fácilmente en los medios de cultivo normales, sin embargo existen algunos que no, para ello se deben incluir en métodos especiales como la exposición de luz blanca corriente o ultravioleta cercano, el cultivo en

conjunto con otros hongos, el practicar incisiones en las colonias, o el uso de medios especiales de cultivo. Los hongos llamados *Mycelia sterilia*, no llegan a producir esporas es por ello que se reconocen por las características del micelio.⁹ Estas técnicas de aislamiento son muy numerosas y para poder aplicarla depende estrictamente del hongo a estudiar y sobre todo la experiencia del profesional a realizarla.⁶

Tinciones Especiales para Hongos

PAS (Reacción Del Ácido Peryódico- Reactivo De Schiff). Permite la determinación del glucógeno de las mucinas, de los mucopolisacáridos neutros así como de los filamentos y esporas micelianos. El ácido periódico transforma los glicoles en aldehído. El reactivo de Schiff, desteñado por el ácido sulfúrico, reacciona con los aldehídos libres formando un producto de condensación de color rojo, contra teñido con la hematoxilina. Como material de partida se emplean cortes de tejido fijado en formalina e incluido en parafina o bien extensiones celulares. Cortes parafínicos de 3-5 μm de espesor.

Composición:

- ✓ Fucsina básica < 1%
- ✓ Ácido clorhídrico < 10%
- ✓ Metabisulfito de sodio < 1%

El reactivo de Schiff contiene fucsina básica, que en solución ácida y en presencia de SO_2 da lugar a una forma no coloreada (ácido N-sulfónico). Este reactivo reacciona con los grupos aldehído libres formando un compuesto insoluble de color púrpura. Esta técnica se utiliza sobre cortes obtenidos de tejido incluido en parafina o de tejido congelado. Como resultado se obtienen carbohidratos en color púrpura.

Procedimiento:

1. Desparafinar e hidratar los cortes con agua del grifo durante 10 min
2. Aclarar con agua destilada
3. Oxidar con ácido periódico al 0,5% durante 15 min
4. Aclarar con agua corriente durante 10 min
5. Teñir con el reactivo Q Path reactivo de Schiff durante 15 min

Protocolo para la tinción PAS:

6. Aclarar con agua corriente durante 10 min
7. Sumergir en la solución de Q Path hematoxilina de Harris durante 4 min
8. Aclarar con agua corriente durante 10 min
9. Deshidratar, aclarar
10. Montar las láminas con la gama Q Path Coverquick.

Las sustancias PAS-positivas tiñen en rojo y el núcleo en azul. El portaobjetos de extracción de diastasa (α -amilasa) no tendrá ninguna tinción PAS visible de glicógeno, al compararlo con el portaobjetos de control positivo de glicógeno no digerido.

Tinción De Gomori-Grocott (Metenamina De Plata). La reacción tintorial está basada en que presencia de ácido crómico, los grupos hidroxilo de los polisacáridos de la pared celular de los hongos son oxidados a aldehídos; estos a su vez, reducen el complejo nitrato-plata metenamina produciendo la coloración café a negra, debido de la plata reducida en los lugares de localización de los aldehídos. Con esta técnica los hongos se tiñen de color negro al igual que una bacterias; la mucina adquiere un color gris oscuro; las partes internas del micelio, rosa oro; el fondo aparece de color verde claro.

Reactivos:

✓ Solución de ácido bórico:

3,09g de ácido bórico

250 cc de agua destilada

✓ Solución de tetraborato sódico

4,77g de tetraborato sódico

250 cc de agua destilada

✓ Solución buffer borato (se debe comprobar que el pH sea 8,2)

42,5cc de metanamina (hexametilentetranamina) 3%

2,5 cc de nitrato de plata 5%

12 cc de buffer borato (pH 8,2)

Procedimiento.

Debe evitarse, durante todo el proceso, el uso de instrumentos metálicos, ya que la plata precipitaría sobre ellos.

- ✓ Desparafinar e hidratar.
- ✓ Añadir ácido peryódico 0,5%, 12 minutos.
- ✓ Lavar con agua destilada.
- ✓ Sumergir los cortes en la solución de plata metanamina, 1 hora mínimo a 60 °C; a partir de este tiempo comprobar regularmente al microscopio.
- ✓ Lavar con agua destilada.
- ✓ Añadir cloruro de oro, 1 minuto.
- ✓ Lavar con agua destilada.
- ✓ Añadir tiosulfato sódico 3%, 1-2 minutos.
- ✓ Lavar con agua corriente.
- ✓ Tinción de contraste (rojo nuclear, hematoxilina, verde luz...), 1 minuto.

- ✓ Deshidratar, aclarar, montar.

Resultados.

- ✓ Reticulina, membranas basales, hongos, mucinas, glucógeno: negro.
- ✓ Fondo: según tinción de contraste.
- ✓ Núcleos: marrón oscuro a negro

Hongos Fitopatógenos en Humanos

En cuanto a las enfermedades producidas en el ser humano, la mayoría de las aproximadamente 100.000 especies de hongos conocidas son saprófitas; sólo 8.000 pueden causar enfermedades en una o más especies vegetales y tan sólo 100 son patógenas de humanos o animales. Centrándonos en los hongos fitopatógenos, el desarrollo de la enfermedad es el resultado de su interacción con las plantas, según una secuencia de etapas denominadas patogénesis. Algunas de estas etapas, cruciales para el establecimiento de tal patogénesis son: la unión a la superficie de la planta, germinación sobre dicha superficie y formación de estructuras de infección, penetración en el huésped y colonización de los tejidos del huésped. ¹¹

Mecanismos de Patogénesis

Generalmente se acepta que la producción de enfermedades en plantas por hongos fitopatógenos se debe a la acción individual o combinada de cuatro mecanismos de patogénesis. El primero de ellos es la síntesis y liberación de enzimas degradativas de la pared celular, tales como poligalacturonasas, pectato-liasas, hemicelulasas y celulasas, que en ocasiones son liberadas de forma secuencial. Estas enzimas ocasionan la degradación de sustancias pépticas que unen las paredes celulares en los tejidos parenquimáticos y causan ensanchamiento y degradación de la pared celular y muerte de las células. ⁹

Un segundo mecanismo consiste en la producción de toxinas por parte del hongo, productos no enzimáticos de bajo peso molecular que interfieren en el metabolismo de la planta o que afectan a la estructura normal del protoplasma. Las toxinas pueden pertenecer a dos categorías diferentes: toxinas huésped-específicas, que son aquéllas que muestran la misma especificidad que el patógeno que las produce, y toxinas huésped-no específicas, cuando la gama de plantas sobre las cuales pueden ocasionar fitotoxicidad no está relacionada con las plantas susceptibles al patógeno, causando síntomas inespecíficos. ¹²

El tercer mecanismo de patogénesis consiste en la producción y liberación de compuestos hormonales, antihormonales y de otro tipo que producen una interferencia en el control normal del crecimiento y desarrollo. Así, se ha observado que en muchos de los síntomas que resultan de la patogénesis provocada por hongos (enanismo, elongación, proliferación celular, etc.) son parecidos a los que se asocian con desarreglos hormonales. El último de los mecanismos es la interferencia mecánica que provoca el crecimiento del hongo en el movimiento normal del agua, nutrientes y metabolitos. ^{12,13}

Fuentes de Contaminación

En cuanto al manejo y control de las fuentes de contaminación que dan paso a la presencia de hongos fitopatógenos, es importante pensar en el control de enfermedades no sólo desde un punto de vista curativo, cuando el daño ya ha sido causado en nuestro cultivo, sino que también desde un punto de vista preventivo, antes de que podamos detectar la presencia del patógeno en las plantas. Así es fundamental considerar en las distintas etapas de desarrollo, siembra o trasplante, crecimiento del cultivo, cosecha y post-cosecha, medidas de manejo que permitan reducir las probabilidades de aparición de cualquier patología que pueda disminuir tanto la cantidad como la calidad del producto cosechado ¹³

El control de enfermedades no debe estar basado únicamente en la aplicación de productos químicos, sino que estos deben ser un complemento de otras medidas posibles de utilizar. Esto es lo que se denomina manejo integrado de enfermedades, que considera el empleo de otros métodos de control como inspecciones reguladoras, control biológico, control físico y control cultural (Lehmann-Danzinger, 2004; Agrios, 1997).¹⁴

Desde este punto de vista debemos tener presentes medidas que reduzcan las posibles fuentes de infección como eliminación de restos de la cosecha anterior y de malezas aledañas, utilización de semilla y plántulas sanas. Eviten condiciones apropiadas para el desarrollo de la enfermedad realizando una fertilización balanceada, y utilizando densidades de siembra y plantación que permitan una adecuada aireación. Cualquier variación del medio ambiente desde las condiciones ideales para el desarrollo del cultivo, puede dar lugar a condiciones de estrés que permitan el desarrollo de enfermedades, dentro de esto, la higiene constituye un componente fundamental dentro el manejo de las condiciones medio ambientales.^{15,16}

Disminuir las posibilidades de diseminación del organismo causal de la enfermedad como desinfección de herramientas, manos, zapatos y estructura del invernadero, al igual que control de insectos transmisores de la enfermedad. Complementariamente a lo anterior se puede recurrir a la aplicación de productos químicos específicos para algunas enfermedades. Sin embargo en este punto es importante alternar fungicidas de distinto grupo químico, sobre todo por el riesgo de desarrollo de resistencia por parte del patógeno. En el caso de cultivos hidropónicos o sin suelo cuando se definen medidas de control se deben tener presentes las posibles formas de llegada de la enfermedad a nuestro cultivo.¹⁷

Entre las más comunes se pueden resaltar; agua o solución nutritiva contaminada, sustrato contaminado, viento, herramientas o equipo de poda, recolección, limpieza o labores en general, contaminado semillas y plántulas contaminadas.¹⁸

CONCLUSIONES

El desafío de la fitopatología hoy en día es el control de las enfermedades de plantas de forma racional y sostenible; Desde el pasado hasta el presente, las enfermedades de las plantas son la causa de falta de alimentos, pérdidas económicas significativas, cambios en el paisaje y daños en la salud humana debido a la ingesta de estos alimentos contaminados. La búsqueda de plantas cada vez más sanas es el objetivo, sin embargo, estas acciones causan daños a los productores rurales, por el uso cada vez más exagerado de agrotóxicos. “El ideal sería disminuir al máximo el uso de agrotóxicos. Por ejemplo, en lugar de utilizar un agrotóxico para el control de un hongo fitopatógeno, el uso de una variedad resistente de planta evitaría el control químico. Métodos de control alternativos como la aplicación de inductores de resistencia de plantas también pueden ser utilizados”.

Los agentes causales comunes de enfermedades de plantas son hongos, bacterias, virus, fitoplasmas, micoplasmas, protozoarios y nematoides. Los hongos fitopatógenos, en especial, son responsables de la mayor parte de las enfermedades de las plantas conocidas. Por estos motivos, se consideran los microorganismos más estudiados a manera de conseguir como detener su reproducción y los daños que ocasionan.

En la presente investigación se evidenció que es de principal importancia el comprobar la existencia de hongos fitopatógenos en muestras provenientes de plantas comerciales de cultivación agrícola; un eficaz diagnóstico de estas fitopatologías ayudaran a evitar contaminación de las especies vegetales, y por consiguiente también evitar pérdidas económicas a los productores o a las compañías agricultoras que de no haber sido detectadas las posibles fitopatologías, hubiesen dañado un mayor volumen de toda la producción vegetal en su crecimiento, y posteriormente se convertirían producto de desecho o producto no apto para el comercio o consumo humano.

RECOMENDACIONES

El propósito de este trabajo es que sirva de guía a otros investigadores interesados en los hongos fitopatógenos. De acuerdo con esto los autores del presente trabajo monográfico recopilan las siguientes recomendaciones:

- ✓ Se debe indagar a fondo sobre las técnicas específicas según el tipo de hongo fitopatógeno que esté presente en la planta.
- ✓ Estudiar con más detalle los tipos de hongos fitopatógenos existentes sus consecuencias sobre las plantas comerciales y la manera de detener el avance y reproducción de estos hongos fitopatógenos para disminuir las pérdidas.
- ✓ Trabajar en ambientes óptimos donde se pueda desarrollar y evaluar el desarrollo del hongo fitopatógeno.
- ✓ Se debe propagar más información sobre estos hongos y sus efectos en las plantas, animales y personas ya que estos pueden conducir a enfermedades en quienes los consuman.
- ✓ Desarrollar nuevas técnicas para combatir estos hongos.
- ✓ Se deben desarrollar investigaciones más detalladas acerca de estos hongos y las posibles soluciones que se pueden desarrollar sin necesidad de recurrir a químicos para que estos no dañen el material genético ni morfológico de las plantas.
- ✓ Es de interés saber que al momento de manejar las técnicas de diagnóstico conocer las normas de bioseguridad y luego así poder realizar el estudio que mejor se preste en cada caso de las posibles fitopatologías que puedan presentarse. De igual manera a la hora de comenzar a realizar el medio de cultivo, es indispensable saber la ubicación en la planta donde se tomara la muestra histológica, de esta forma se genera un medio de cultivo adecuado

para conocer cuáles son los posibles hongos que pueden estar afectando a la planta.

REFERENCIAS

1. Boa E. Los hogos silvestres comestibles. 1era ed: Roma 2014
2. Alban A, Quíjia Ch. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos de eucalipto (*Eucalyptus globulus*), rosa (*Rosa sp.*) y durazno (*Prunus persica*). Academia.edu. 2015 feb 5.
3. García V. Introducción a la microbiología [monograph on the Internet]. Costa Rica: EUNED; 2004 [cited 2015 Mar 24]. Available from: https://books.google.co.ve/books?id=K_ETVnqnMZIC&pg=PA104&dq=Durante+los+a%C3%B1os+de+1845+y+1846,+un+hongo+denominado+Pytopht+hora+infestans,+causante+de+una+enfermedad+en+el+cultivo+de+papa,+llamada+Tiz%C3%B3n+tardio&hl=es&sa=X&ei=5g8SVYuTI8mPsQSOgolw&ved=0CBwQ6AEwAA#v=onepage&q=Durante%20los%20a%C3%B1os%20de%201845%20y%201846%2C%20un%20hongo%20denominado%20Pytophthora%20infestans%2C%20causante%20de%20una%20enfermedad%20en%20el%20cultivo%20de%20papa%2C%20llamada%20Tiz%C3%B3n%20tardio&f=false
4. Sosa C, Perdomo F, Brathwaite Ch, Salazar J. Manual de técnicas para el diagnóstico de las enfermedades de las plantas [monograph on the Internet]. México: 1º; 1996 [cited 2015 Mar 10]. Available from: https://books.google.co.ve/books?id=EuMNAQAIAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
5. Pallela S, Martins F. Metodología de la Investigación Cuantitativa. 3era. Caracas: Fondo Editorial de la Universidad Pedagógica Experimental Libertador (FEDUPEL); 2010.
6. Arauz L. Fitopatología: Un enfoque agroecológico. 1era ed. San José, Costa Rica: Universidad de Costa Rica; 1998.
7. Trigos A, Ramírez K, Salinas A. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria.
8. Ticiane R. enfermedades de las plantas que afectan nuestra vida. La gran sabana. 2011 Nov 21.

9. González L. C. Introducción a la fitopatología. 3era. Acosta V. R, editos San Jose, Costa Rica: 1975
10. Universidad de matanzas “Camilo Cienfuegos”. Técnicas para el diagnóstico y determinación de viabilidad genética de fitopatógenos.
11. H C Finch, Ph D, A N Finch, M A. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. América Latina 2da. México: Trillas; 1990.
12. Consejería de innovación, ciencia y empresa. Agroalimentación. Programa de divulgación científica de Andalucía.
13. Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Jour. [serial on the internet]. 2009 [cited 2015 Mar 10]. [About 6 p.]. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext
14. Sandoval Claudio. Manual integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Talca Chile: 2004.
15. Izco S Jesus, Barrero R Eva, Brugués D Montserrat, Costa T Manuel, Devesa A Juan, Fernandez G Federeco, Gallardo G Tomas, Llimona P Xavier, Salvo T Enrique, Talavera L Salvador, Valdes C Benito. Botánica. 1era. España: Mc GRAW-HILL- RICANA DE ESPAÑA; 1998.
16. Tello Mercedes, Gutierrez Ingunza Ericson Leon, Béjar Castillo Vilma, Galarza Manyari Carlos Alberto, Ramos Muñoz Willy César, Ortega Loayza Alex G. Criptococosis. Rev Méd Risaralda 2013; 19(2) : 147-153
17. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang Z, Janbon G, Idnurm A, Bahn YS. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the etiologic agents of cryptococcosis. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014 Jul 1;4(7):a019760.
doi: 10.1101/cshperspect.a019760.
18. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. Clin Microbiol Rev 2011;24:247-80.
19. Denning DW, Kibbler C, Barnes R. British Society for Medical Mycology proposed standards of care for invasive fungal infections. Lancet Infect Dis 2003;3:230-40.