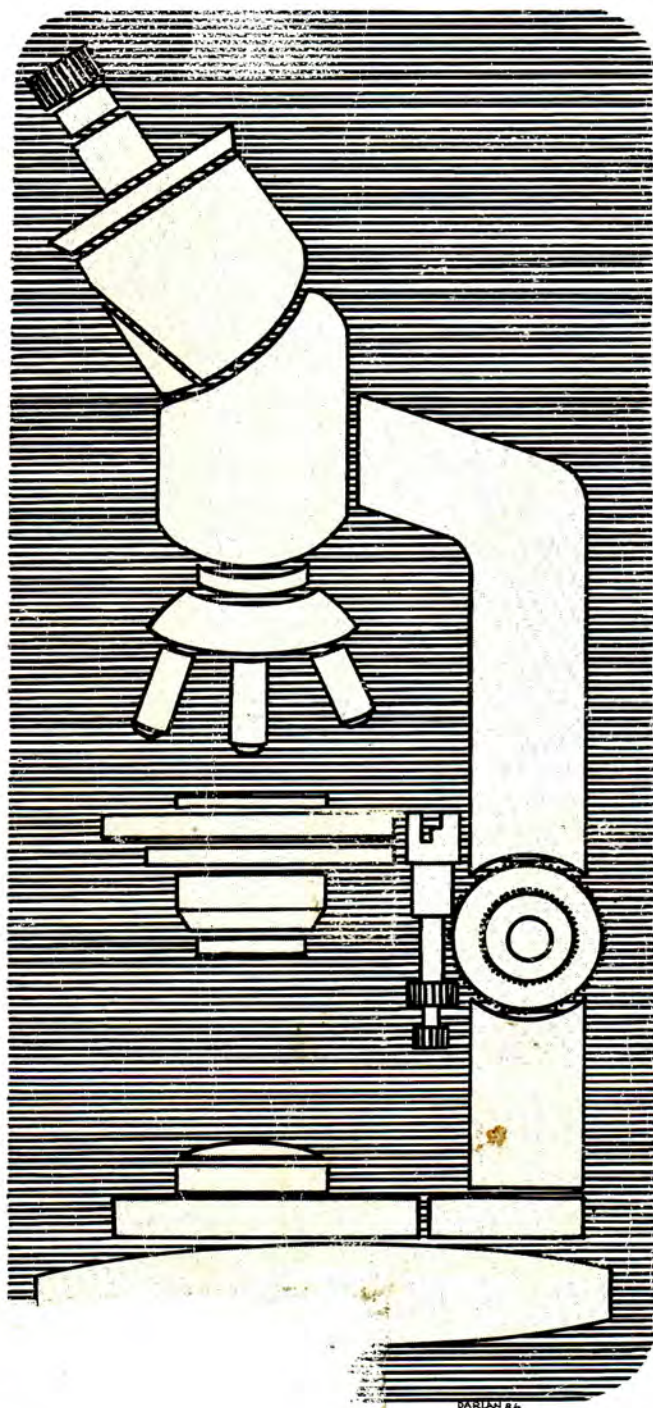




PRACTICAS DE LABORATORIO DE FITOPATOLOGIA

Jairo Castaño Z.

MIPH-EAP/AID

DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL

0130 (13)
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
EL ZAMORANO



BIBLIOTECA
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

PRACTICAS DE LABORATORIO DE FITOPATOLOGIA

Jairo Castaño Z.



Proyecto AID/Honduras No. 522-0222
Publicación MIPH-EAP No. 95

©1986

205975

DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL



AGRADECIMIENTO

El autor desea expresar un reconocimiento de gratitud al Dr. Keith L. Andrews, Jefe del Departamento de Protección Vegetal y del Proyecto Manejo Integrado de Plagas en Honduras (MIPH), por su apoyo constante para hacer de esta guía una realidad. A la Agencia para el Desarrollo Internacional (AID), a través del Proyecto MIPH, por la financiación de esta obra. Al Lic. Héctor Barletta, por la revisión, corrección y edición de la publicación; al Prof. Darlan Matute y al Sr. Oscar Ortiz, por el dibujo artístico de la portada y de las figuras de la guía, respectivamente.

CONTENIDO

	Páginas
Introducción	
Práctica No. 1 ✓	
Microscopio Compuesto	5-9
Práctica No. 2 ✓	
Empleo del Hemacitómetro	10-11
Práctica No. 3 ✓	
Preparación de Medios de Cultivo y Esterilización	12-13
Práctica No. 4 ✓	
Asepsia en el Laboratorio	14
Práctica No. 5 ✓	
Diagnóstico de Enfermedades	15-20
Práctica No. 6 ✓	
Aislamiento de Hongos Fitopatógenos de Material Vegetal Enfermo	21
Práctica No. 7	
Inoculación de Hongos Fitopatógenos	22
Práctica No. 8	
Efecto de las Condiciones Ambientales Sobre el Crecimiento y Esporulación de Hongos.	23
Práctica No. 9	
Aislamiento de Bacterias Fitopatógenas de Material Vegetal Enfermo.	24
Práctica No. 10	
Inoculación de Bacterias Fitopatógenas	25
Práctica No. 11	
Tinción y Reacción de Gram de Bacterias Fitopatógenas	26
Práctica No. 12 ✓	
Presencia de Bacterias en Diferentes Ambientes.	27-28
Práctica No. 13	
Inoculación de Virus Fitopatógenos	29
Práctica No. 14	
Extracción y Fijación de Nemátodos.	30-31
Práctica No. 15	
Detección de Microorganismos en Semillas y Tratamiento Químico de Semillas.	32
Práctica No. 16	
Estimación del Poder Residual de Fungicidas en el Follaje.	33
Apéndice 1.	
Composición de Medios de Cultivo y Soluciones para el Crecimiento, Montaje y Conservación de Hongos.	34
Apéndice 2.	
Composición de Medios de Cultivos y Soluciones para el Aislamiento y Tinción de Bacterias.	43
Referencias Selectas	45

INTRODUCCION

Esta guía contiene 16 prácticas fundamentales que indican al estudiante los métodos y técnicas de laboratorio más importantes de la Fitopatología. Inicialmente se trata de familiarizar al estudiante con la utilización correcta del microscopio compuesto y el micrómetro ocular, instrumentos que son importantes para observar y medir estructuras de diversos microorganismos. Luego se describe el uso apropiado del hemacitómetro, que permite determinar la concentración de esporas en trabajos rutinarios de inoculaciones. Seguidamente se indica la forma de preparar y esterilizar medios de cultivo, como también las normas básicas de asepsia que se deben seguir en el laboratorio. También se hace énfasis en las pautas recomendables para diagnosticar enfermedades de plantas. Con estas bases, el estudiante puede aprender algunos métodos prácticos contenidos en esta guía, aislar e inocular hongos y bacterias fitopatógenas, demostrar el efecto de las condiciones ambientales sobre el crecimiento y esporulación de hongos, y presenciar bacterias en diferentes ambientes. Dada la gran importancia que tiene la transmisión mecánica de virus, se describe un método simple de inoculación mecánica de virus fitopatógenos. Asimismo, se explican varios métodos de extracción y fijación de nemátodos. Debido a la importancia económica que reviste la patología de semillas, se ha incluido una práctica que describe los métodos más comunes para detectar microorganismos en semillas y el efecto del tratamiento químico de las mismas. Finalmente, teniendo en cuenta que los fungicidas difieren entre sí en su acción para controlar enfermedades de plantas, se desarrolla una práctica para demostrar el poder residual de fungicidas en el follaje.

El autor ha creído de gran utilidad añadir dos apéndices acerca de la composición de medios de cultivo y soluciones, para el aislamiento y montaje de hongos y bacterias. La guía se complementa con una lista de referencias selectas, en las cuales el autor se basó. Se espera que el contenido de esta obra constituya una verdadera fuente de información y consulta.

Jairo Castaño Z.
Fitopatólogo
Ph.D.

PRACTICA No. 1

Microscopio Compuesto

Objetivo

Mostrar los componentes básicos del microscopio compuesto y enseñar su uso apropiado, cuidados y manera de medir estructuras microscópicas.

Materiales

Microscopio compuesto binocular; micrómetros ocular y objetivo; agua; esporas de *Helminthosporium turcicum*; portaobjetos y cubreobjetos.

Procedimiento

Antes de hacer uso del microscopio compuesto se debe reconocer sus componentes y sus funciones. El microscopio es un instrumento científico delicadamente ajustado, que se debe manejar con mucho cuidado.

Los componentes de un microscopio compuesto son de dos tipos: mecánicos y ópticos. Los componentes mecánicos se presentan en un prototipo moderno de microscopio de investigación binocular con iluminador incorporado en la base (Figura 1).

I Componentes

1) Partes mecánicas

Comprende un pie pesado que sostiene el miembro o brazo inclinado del cual pende a su vez el cuerpo del tubo. El tubo puede elevarse o bajarse mediante el tornillo micrométrico (enfoque fino) para precisar más el enfoque. Ambos están gobernados por cabezas de tornillo macrométrico (enfoque grosero) que funciona gracias a un dispositivo con piñón y cremallera y mediante el tornillo micrométrico (enfoque fino) para precisar más el enfoque. Ambos están gobernados por cabezas de tornillo estriadas. Los microscopios modernos se fabrican en tubos de 160 mm de longitud, lo cual puede aumentarse elevando el tubo deslizable que generalmente está graduado para lograr ma-

yor aumento. En el extremo inferior del tubo hay un portaobjetos (revólver) que lleva los lentes de aumento u objetivos. El brazo sostiene también la platina, sobre la que se colocan los portaobjetos para examinar; éstos se mantienen en posición fija mediante unos sujetadores. Hay también platinas mecánicas que permiten el movimiento de los objetos y constituyen un lujo para usos ordinarios, pero una necesidad para trabajos de importancia; no faltan en aparatos de precio elevado. La parte inferior del brazo o apéndice sostiene el espejo.

2) Partes ópticas

Consta de los objetivos, los oculares, el espejo y el condensador. Los objetivos son tubos pequeños que contienen una combinación de lentes. Los de uso corriente tienen una distancia focal de 16 mm (pequeño aumento). En bacteriología, citología y otras investigaciones que requieren aumentos altos, se emplea una lente de inmersión en aceite, de 2 mm. Para los objetivos de 16 y 4 mm (de inmersión) se coloca en el cubreobjetos una gota de aceite de cedro (practicamente del mismo índice de refracción que el vidrio) y se enfoca el objetivo dentro de ella. Con esto se incrementa la iluminación.

La distancia entre el objetivo y el portaobjetos se llama distancia de enfoque. En los microscopios modernos, una vez que se ha enfocado el objeto de poco aumento, queda casi enfocado cuando se cambia (girando el revólver), por el objetivo de gran aumento, no haciendo falta mas de una vuelta al tornillo micrométrico para enfocar exactamente el objeto.

El poder de resolución de un lente, o su potencia para perfilar detalles, depende de lo que se denomina apertura numérica (AN). Esta es constante para cualquier lente y, cuanto más grande sea, mayor es su poder de resolución, aunque la distancia de enfoque disminuya. Se obtiene buena resolución con un objetivo de 16 mm y AN de 0.28, con un objetivo de 4 mm y AN de 0.7 y un objetivo

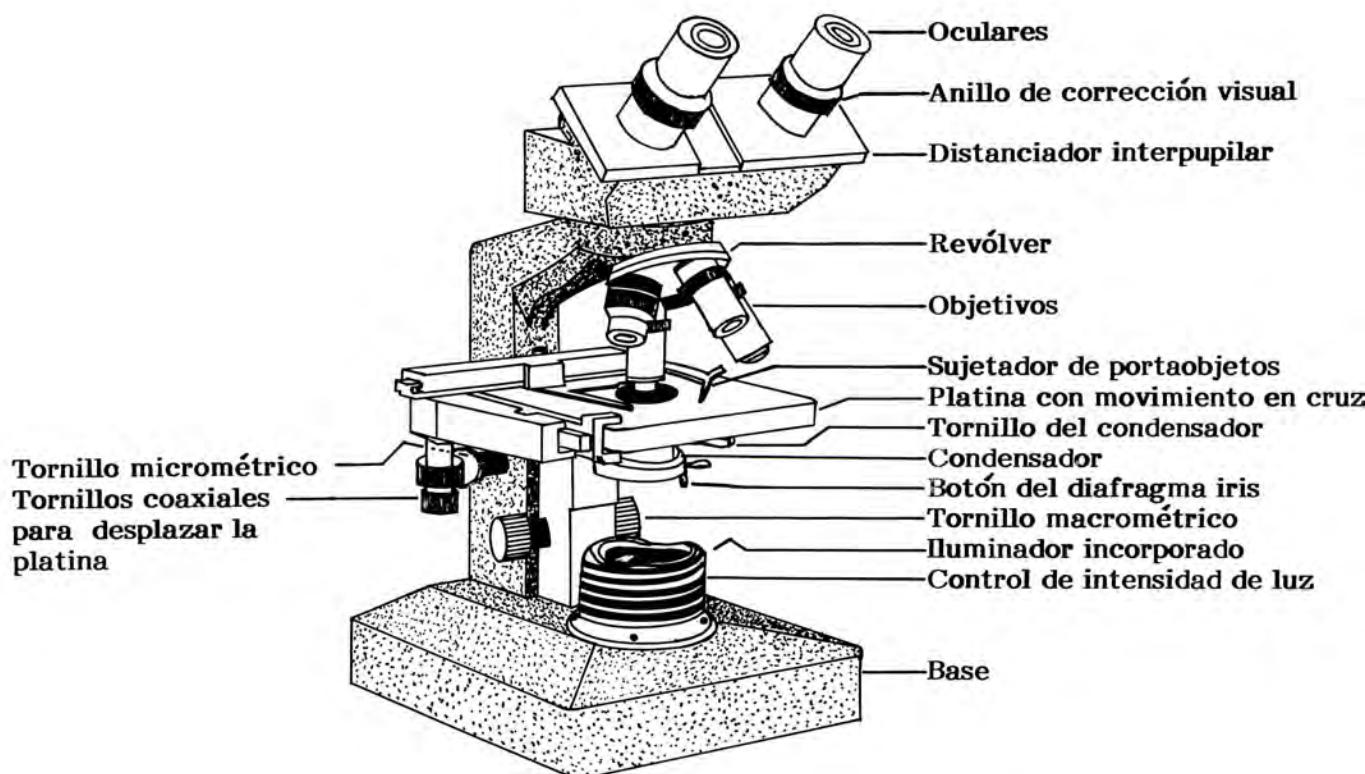


FIGURA 1: Componentes básicos del microscopio compuesto.

de inmersión de 2 mm con AN de 1.25 a 1.28. Los fabricantes siempre señalan la AN de los objetivos. Debe tener en cuenta que los lentes tienen una superficie curva y, cuando al observar con lentes de gran potencia se enfoca el objeto en el centro del campo, es únicamente ésta parte la que queda exactamente enfocada. La igualdad de enfoque en todo el campo solo es posible con objetivos de poco aumento.

El aumento de las imágenes producido por los objetivos se incrementa todavía más con los oculares, que encajan en la parte superior del tubo. El aumento que producen estos lentes está marcado sobre ellas. En cada instrumento los fabricantes colocan usualmente una tabla de los aumentos que se consiguen con las diversas combinaciones entre objetivos y oculares. El espejo es cóncavo por un lado, para usarlo cuando no se coloca condensador. El condensador está situado debajo de la platina o en una subplatina, y se enfoca mediante un dispositivo de enfoque espiral o mediante una cremallera y piñón. La iluminación aumenta cuando se emplea objetivos de gran poder de resolución. Es esencial el centrado perfecto. La cantidad de luz que pasa a través de un objetivo puede modificarse mediante el diafragma iris, colocado en la base del condensador.

Aumento. El aumento aproximado se deduce de la fórmula:

$$m = \frac{1}{f} \times e \quad \text{en donde,}$$

m = aumento

l = Longitud del cuerpo del tubo (generalmente, 160 mm).

e = aumento del ocular.

f = distancia focal del objetivo.

Como guía aproximada puede suponerse que:

El objetivo de 16 mm aumenta 10 veces

El objetivo de 4 mm aumenta 40 veces

El objetivo de 2 mm aumenta 80 veces (inmersión)

Estos aumentos deben multiplicarse por el aumento del ocular. Se tiene aún mayor aumento

elevando el tubo deslizante, que puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$M2 = \frac{m1 \times l}{160}$$

En donde:

$M2$ = aumento final

$m1$ = aumento con el tubo de 160 mm

l = longitud total del tubo en mm

160 = longitud del tubo en mm, que sirvió para calcular $m1$, es decir, longitud del tubo sin extender el tubo deslizante.

II. Uso y cuidado.

1. Levante siempre el instrumento por el brazo,
2. **No permita que algún líquido se ponga en contacto con los lentes o platina y guárdelos siempre libres de polvo; no toque el instrumento con los dedos húmedos.**
3. Cuide que los portaobjetos y cubreobjetos estén limpios y secos.
4. Examine siempre el objeto de la siguiente forma:
 - a. A simple vista si es posible; en otro caso, con una lente de mano.
 - b. Con el objetivo de 16 mm.
 - c. Con el objetivo de 4 mm.
5. **Nunca use objetivos de gran aumento sin que el objeto esté recubierto por el cubreobjetos.**
6. Ilumine con el espejo plano si está colocado el condensador, y el cóncavo si no emplea este último.
7. **Enfoque:** con pequeño aumento, traiga el objeto claramente a la vista mediante el tornillo

macrométrico (enfoque grosero), y luego enfoque con precisión mediante el tornillo micrométrico (enfoque fino).

Para usar grandes aumentos, observe primero con el objetivo de pequeño aumento si el objeto está en el centro del campo; luego, si el microscopio carece de revólver, con la cabeza al lado del microscopio, baje lentamente el tubo (provisto ya con el objetivo de gran aumento) mediante el tornillo macrométrico hasta que el objetivo esté próximo al portaobjetos; después, suba cuidadosamente el tubo empleando el tornillo micrométrico. Mediante este método es más difícil que se rompa el portaobjetos o que se dañe el objetivo.

Si se dispone de revólver, coloque en la posición adecuada el objetivo de gran aumento sin tocar el tornillo macrométrico. Con una vuelta, poco más o menos, del tornillo micrométrico, se trae el objeto a su enfoque preciso.

8. Si emplea el condensador, debe enfocar cuidadosamente. Este es el caso corriente con el condensador Abbe y tipos similares, en los que el lente superior del condensador está casi en contacto con la superficie inferior del portaobjetos.
9. Use el microscopio con los dos ojos abiertos y adquiera la costumbre de emplear indistintamente los dos ojos para mirar.
10. Tenga la libreta de notas a la derecha del instrumento.
11. Estudie el objeto cuidadosamente antes de comenzar a dibujarlo.
12. **Después de usar el objetivo de inmersión, limpie cuidadosamente el aceite de cedro del objetivo y del portaobjetos, con xilol aplicado a un paño suave y limpio o a papel secante con una gamuza suave.**
13. Limpie la superficie externa de los lentes, si están empolvadas, con una gamuza limpia y suave. **Nunca desarme un objetivo.** El

polvo que no se quita con un paño puede desaparecer limpiando los lentes con un paño suave mojado en alcohol. Para localizar las motitas de polvo visibles por el microscopio, gire el ocular. Si las motitas giran también, es obvio que están allí. Mueva la preparación y si las motas se mueven, también están en el cubreobjetos. En otro caso están en el condensador, en el espejo o en el objetivo.

14. **Guarde siempre el microscopio cubierto, cuando no lo use; deje los oculares en el microscopio para evitar que el polvo entre por los tubos y de allí a la parte interna de los objetivos. El polvo es el peor enemigo de los instrumentos ópticos.**

III. Medición de Estructuras al Microscopio

La unidad de medida en microscopía es 0.001 mm ($\equiv$ 1 micra) y se conoce con el nombre de micra (μ). Para medir objetos que se observan en el campo visual de un microscopio, se emplea el micrómetro ocular, el cual consiste en una placa de cristal con una escala grabada, que se incrusta sobre el diafragma del campo del ocular, de tal manera que la escala queda enfocada por hallarse en el plano de la imagen real intermedia.

Debido a que los aumentos varían de un microscopio a otro, las escalas de los micrómetros oculares no representan medidas convencionales, sino simples unidades. Para determinar la distancia lineal que representa cada unidad o sea el valor micrométrico, debe efectuar calibraciones para cada aumento de un microscopio. Emplee para tal fin un micrómetro objetivo, que es similar a un portaobjetos y tiene grabada una escala que representa medidas exactas y convencionales. Generalmente se emplea un micrómetro objetivo cuya escala comprende 100 o 200 divisiones de 0.01 mm. Colocando el micrómetro objetivo sobre la platina del microscopio, y enfocando con el objetivo con el cual tratamos de medir, se busca determinar, superponiendo las imágenes de ambas graduaciones, cuántas divisiones del micrómetro objetivo son cubiertas por una o varias del micrómetro ocular. Establecido este dato, se determina la fórmula

Práctica No. 2

Empleo del Hemacitómetro

Objetivo

Familiarizar al estudiante con los componentes del hemacitómetro y la determinación de concentraciones de esporas grandes y pequeñas en trabajos rutinarios de inoculaciones.

Materiales

Hemacitómetro; pipetas de 1 ml de capacidad; suspensión de esporas de *Helminthosporium turcicum* y *Colletotrichum lindemuthianum*.

Procedimiento

El hemacitómetro es una pieza de vidrio en forma de **H** en el centro con dos cámaras de conteo. El fondo de cada una de las cámaras tiene un rayado de 9 mm dividido en 9 cuadrados principales de 1 mm por cada lado. El mm del centro está dividido en 25 grupos de 16 cuadrados pequeños; cada grupo está separado por líneas triples (figura 2). Las superficie reticular se encuentra a 0.1 mm debajo del cubreobjetos, por lo tanto, el volumen del líquido sobre 1 mm² es 0.1 mm³.

Coloque el entreobjetos limpio sobre la cámara de conteo de tal manera que llegue a estar en contacto con los altoprelieves de la cámara. Con la ayuda de una pipeta deposite una gota de la suspensión de esporas en el margen del cubreobjetos. La gota se deslizará rápidamente entre el cubreobjetos y el área reticular del portaobjetos. Permita que se asienten las esporas durante 1 o 2 minutos y observe la distribución de las esporas. Estas deben estar uniformemente distribuidas por todos los cuadrados de la cámara. Se puede emplear Tween 80 (0.02%) o cualquiera otro dispersante para mejorar la distribución de las esporas.

Generalmente las esporas pequeñas se cuentan en el mm² central, el cual está compuesto de 25 grupos de 16 cuadrados pequeños. Cada uno de estos grupos mide 0.04 mm². Cuente el número

de esporas en los 4 grupos de las esquinas y el central. Sume el total de esporas en los 5 grupos y calcule en número de esporas/ml de la siguiente manera:

$$0.2 \text{ mm} \times 0.2 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.004 \text{ mm}^3$$

$$X = \frac{E}{5} \times \frac{1}{0.004}$$

$$X = E \times 50 \text{ en donde, } X = \text{No. de esporas/mm}^3$$

$$E = \text{Esporas en los 5 cuadrados de } 0.04 \text{ mm}^2$$

$$1 \text{ ml (cc)} = 1000 \text{ mm}^3$$

$$X = E \times 50 \times 1000$$

$$X = E \times 50000 \text{ en donde, } X = \text{No. de esporas/ml}$$

$$E = \text{Esporas en los 5 cuadrados de } 0.04 \text{ mm}^2$$

Las esporas grandes se cuentan en 5 cuadrados principales de 1 mm de lado: los cuatro de las esquinas y el central. Cada cuadrado mide 1 mm². Cuente el número de esporas en los 4 cuadrados de las esquinas y el central. Sume el total de esporas en los 5 cuadrados y calcule el número de esporas/ml de la siguiente forma:

$$1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 0.1 \text{ mm} = 0.1 \text{ mm}^3$$

$$X = \frac{E}{5} \times \frac{1}{0.1}$$

$$X = E \times 2 \text{ en donde, } X = \text{No. de esporas/mm}^3$$

$$E = \text{Esporas en los 5 cuadrados de } 1 \text{ mm}^2$$

$$1 \text{ ml (cc)} = 1000 \text{ mm}^3$$

$$X = E \times 2 \times 1000$$

$$X = E \times 2000 \text{ en donde, } X = \text{No. de esporas/ml}$$

$$E = \text{Esporas en los 5 cuadrados de } 1 \text{ mm}^2$$

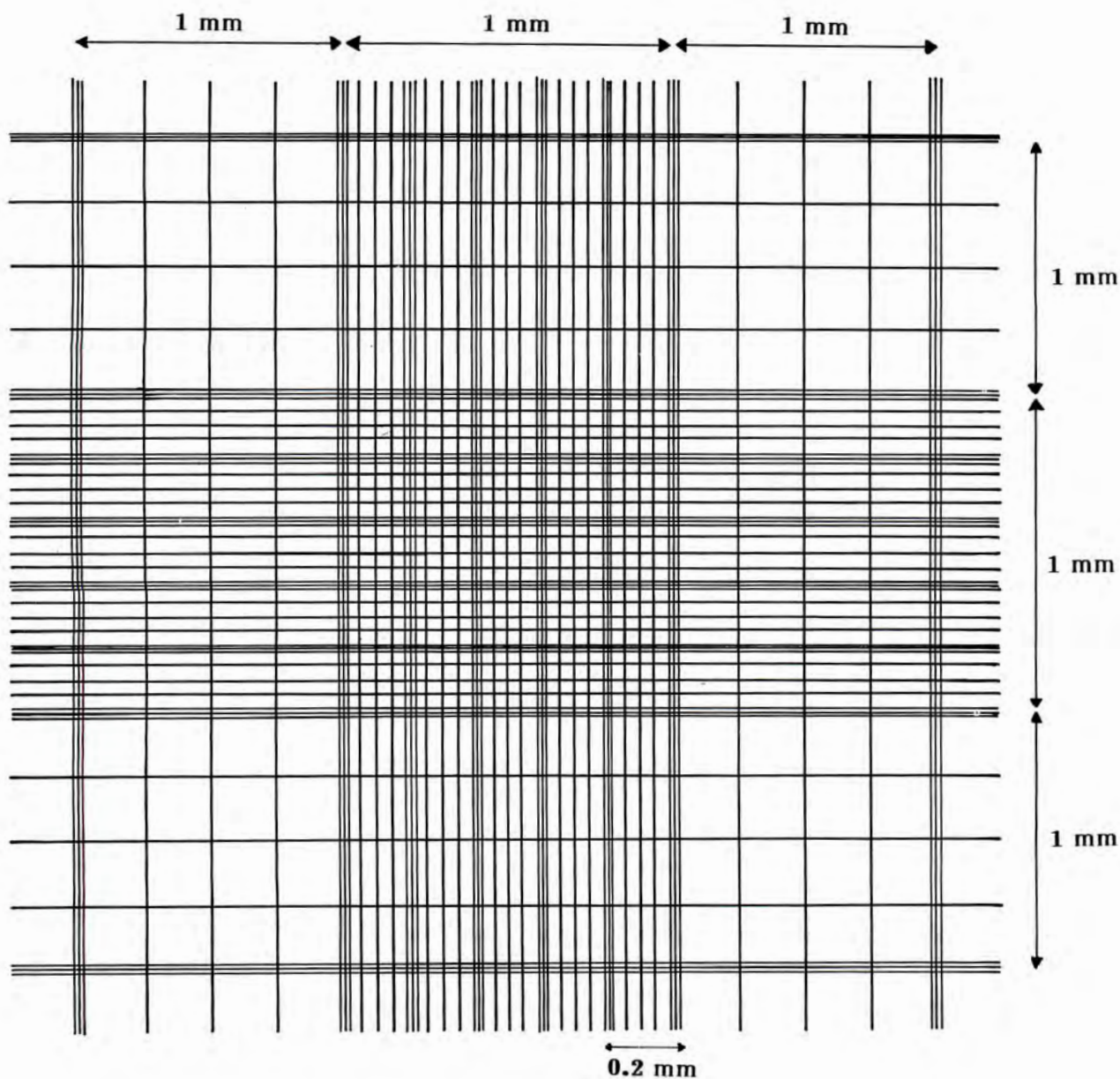


FIGURA 2: Rayado "Neubauer" del hemacitómetro, American Optical Co., de 0.1 mm de profundidad, mostrando las dimensiones de cada división: Cuadrados principales de 1 mm por lado y cuadrados secundarios de 0.2 mm por lado.

Práctica No. 3

Preparación de Medios de Cultivo y Esterilización

Objetivo

Permitir al estudiante tener un conocimiento adecuado acerca de la preparación y esterilización de diversos medios de cultivo para hongos y bacterias.

Materiales

De acuerdo al medio de cultivo a preparar, consulte los apéndices 1 o 2; autoclave; agua.

Procedimiento

Cuando los hongos y bacterias están creciendo bajo condiciones de laboratorio, es una práctica común obtenerlos en cultivo puro en sustancias nutritivas o mezclas, llamadas normalmente, medios de cultivo (Apendices 1 y 2). Los medios de cultivo se clasifican en tres grupos:

1. Medios Naturales
2. Medios Semisintéticos
3. Medios Sintéticos

1. Medios Naturales

Compuestos en parte por materiales de composición desconocida como partes esterilizadas de plantas y animales, vainas de frijol, papas, semillas, frutas, etc. Los medios naturales son especialmente útiles para cultivar hongos cuyos requerimientos nutricionales son desconocidos o no son importantes. Estos medios son fáciles de preparar pero tienen la desventaja de que su composición es desconocida en su mayor parte.

2. Medios Semisintéticos

Compuestos en parte por materiales de composición conocida y por materiales de compo-

sición desconocida, por ejemplo, los que contienen agar y dextrosa. Muchos medios incluyen derivados de fuentes naturales como peptona, caseína hidrolizada, extracto de levadura, etc. Estos medios son muy empleados como cultivos sólidos y líquidos en una gran variedad de estudios morfológicos.

3. Medios Sintéticos

Los medios puramente sintéticos son deseables cuando se realizan estudios fisiológicos. Todos sus constituyentes son de una composición conocida.

Todos los medios empleados en el cultivo de hongos se deben esterilizar antes de emplearlos y normalmente se les agrega una sustancia solidificante como el agar, el cual es derivado de una alga.

Cuando se está preparando un medio es útil tener presente lo siguiente:

1. Los hongos generalmente crecen mejor en un medio rico en carbohidratos, pero el mantenimiento en éstos durante largo tiempo, puede reducir la esporulación.
2. Los hongos generalmente prefieren una reacción ligeramente ácida, pH 6.0-6.5. Las bacterias prefieren a menudo pH 7.0.
3. Los carbohidratos y proteínas en soluciones ácidas y alcalinas son descompuestos por el calor; por lo tanto, no deben ser esterilizados demasiado, o alternatively, adicionarlos por separado.
4. El agar es lento para disolverse completamente (1-2 horas). Es útil disolver el agar en la mitad del volumen de agua, los nu-

trientes en la otra mitad y por último mezclarlos. En algunos laboratorios, el agar es conservado en forma de solución estandar para adicionarlo al medio.

5. El agar no solidifica satisfactoriamente en soluciones muy ácidas o soluciones alcalinas.
6. La peptona puede ser omitida generalmente de medios para el cultivo de hongos.
7. El agua corriente es a menudo preferible al agua destilada, puesto que contiene trazas de elementos útiles. Sin embargo, en algunas áreas éste tipo de agua puede ser ligeramente tóxica. Especies de ***Phytophthora*** son particularmente sensibles a éstas aguas y es preferible emplear el agua destilada.

Esterilización mediante vapor en el autoclave es el método convencional para esterilizar la mayoría de los medios de cultivo, pero no puede ser empleado con compuestos sensibles al calor. La esterilización en el autoclave puede producir cambios químicos indeseables en sustratos naturales, tornándolos inefectivos como medio de cultivo. Sin embargo, generalmente puede ser empleada para esterilizar todos los medios y sustratos utilizados para el crecimiento de hongos. Tales materiales se deben esterilizar durante 15 – 20 minutos a 6.8 kg de presión. No es necesario disolver los ingredientes antes de la esterilización, a menos que se desee preparar por medio de tubos de ensayo, ya que se disolverán durante el autoclavado. Para reducir la condensación de agua en las cajas de Petri es recomendable enfriar el medio (aproximadamente 45°C) antes de verterlo en las cajas.

Cuando se autoclave los medios no se deben llenar demasiado los frascos porque el medio hervirá y se regará. Un método conveniente para evitar esto es echar medio hasta la mitad de la capacidad del frasco. Medio litro de medio servirá para preparar unas 20 cajas Petri.

Operación del Estilizador marca Market Forge modelo STM-E Tipo E

1. Esté seguro de que la válvula de drenaje esté cerrada. Vierta unos 5 litros de agua corriente dentro de la cámara del esterilizador.
2. Cierre la puerta de la cámara.
3. Determine el seleccionador de escape apropiadamente. Todos los instrumentos y paquetes, a excepción de soluciones, deben ser esterilizados en el seleccionador de instrumentos (Fast Exhaust). Las soluciones requieren un escape lento. Coloque el seleccionador en líquidos (Slow Exhaust).
4. Ponga el reloj a funcionar por un período de 15 minutos. La esterilización no se llevará a efecto a períodos inferiores de 15 minutos de exposición. El ciclo de esterilización se iniciará automáticamente cuando se obtiene la presión (15 lbs/pulgada = 6.8 Kg/6.5 cm²) y temperatura (121°C) apropiada. Cuando el ciclo de exposición se completa, el esterilizador se apagará automáticamente y la válvula de escape se abrirá automáticamente.
5. Abra la cámara solamente cuando la presión de la misma baje a "0". Cuando abra la cámara, permita por unos segundos que el vapor escape de la cámara antes de proceder a abrirla completamente.
6. Remueva los materiales. Si se trata de líquidos, páselos directamente a la cámara de aislamientos.
7. Drene el agua de la cámara, lávela ligeramente y límpiela.
8. Seque bien el interior de la cámara.
9. Deje abierta la puerta de la cámara durante la noche.

Práctica No. 4

Asepsia en el Laboratorio

Objetivo

Demostrar la importancia de la asepsia para eliminar o reducir contaminaciones de medios de cultivo por microorganismos.

Materials

Cámara de aislamiento; lámpara de alcohol, cultivo de ***Alternaria porri***, 12 cajas de Petri esterilizadas; 12 cajas de Petri lavadas pero no esterilizadas; 500 ml de PDA.

Procedimiento

Transfiera **A. porri** en medio de cultivo de acuerdo a los siguientes tratamientos: 1) Siembre

4 cajas esterilizadas con PDA sobre una mesa en el laboratorio, 2) Siembre 4 cajas esterilizadas sobre una mesa del laboratorio y cerca de la llama de una lámpara de alcohol; 3) Siembre cuatro cajas esterilizadas con PDA en la cámara de aislamiento, 4) Siembre 4 cajas sin esterilizar con PDA sobre una mesa del laboratorio; 5) Siembre 4 cajas sin esterilizar sobre una mesa del laboratorio y cerca de la llama de una lámpara de alcohol, y 6) Siembre 4 cajas sin esterilizar con PDA en la cámara de aislamientos.

Incube las cajas a 28°C. Después de 48 horas empiece a observar el desarrollo de las colonias de **A. porri** y la presencia de contaminantes de acuerdo al tratamiento. Discuta los resultados.

APUNTES

This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

Práctica No. 5

Diagnóstico de Enfermedades

Objetivo

Mostrar las pautas a seguir en el diagnóstico de enfermedades de origen biótico o abiótico.

Materiales

Plantas o muestras de tejidos mostrando síntomas de enfermedades.

Procedimiento

Para el diagnóstico de una enfermedad debe determinar si ésta es causada por un microorganismo o por factores ambientales. En casos en que los síntomas de la enfermedad son causados por un agente biótico o por un factor ambiental, es necesario realizar un examen detallado de tales síntomas y un estudio de las características de éstos.

Una secuencia útil para iniciar el diagnóstico de la gran mayoría de las enfermedades de las plantas que no se pueden diagnosticar solo por sintomatología, consiste en seguir la siguiente clave:

A₁ Manchas y Chancros

- B₁ Señales de patógenos visibles al microscopio estereoscópico.
 - C₁ Señales de hongos: Realice preparaciones microscópicas de las estructuras, con tinción cuando sea apropiado I
 - C₂ Señales de bacterias (exudado o manchas húmedas): Realice preparaciones microscópicas para observar flujo bacterial en campo oscuro, luego efectúe tinción de Gram II

B₂ Ausencia de señales de patógenos.

- C₁ Incube la muestra en cámara húmeda y luego regrese a A₁ III
- C₂ Mosaicos, moteados u otros síntomas virales posibles.
- C₃ Descoloraciones y otros síntomas de malnutrición.

A₂ Marchitez

- B₁ Sistema radical afectado.
 - C₁ Presencia de nemátodos o sus síntomas.
 - C₂ Pudrición radical, tratar como A₁
- B₂ Sistema vascular descolorado.
 - C₁ Prueba de flujo bacterial en agua, luego efectúe tinción de Gram II
 - C₂ Ausencia de flujo; hacer cortes para observar hongos I

A₃ Pudriciones

- B₁ Tallo o raíz, tratar como A₁
- B₂ Organos de reserva (tubérculos, raíces)
 - C₁ Realice preparaciones microscópicas y observe para hongos, con tinción cuando sea indicado I
 - C₂ Observe preparaciones en campo oscuro para observar bacterias; luego realice la tinción de Gram II
 - C₃ Inocule tejidos sanos con los afectados cuando la pudrición es avanzada; luego observe como en C₁ y C₂ IV

La determinación de si el microorganismo bajo observación es un **hongo**, se inicia mediante la observación al microscopio de la morfología del micelio y estructuras fructificantes. El hongo se puede identificar mediante comparación consultando libros especializados de taxonomía de hongos. Si las características del hongo corresponden a las que se encuentran en la literatura, en muchos casos el diagnóstico se puede considerar completo. Si el hongo es desconocido, se debe continuar el estudio de la etiología de la enfermedad. En muchas ocasiones no hay micelio ni esporas presentes en la planta enferma, dificultándose la identificación del agente causal. Con muchos hongos, la esporulación se puede inducir sobre el tejido enfermo si se coloca éste en cámara húmeda. Si de esta manera no se logra inducir esporulación, se debe proceder al aislamiento del hongo en medios de cultivo apropiados (Apéndice 1) y bajo diversos rangos de temperatura.

El diagnóstico de una enfermedad de origen **bacterial** y su identificación está basado en los síntomas de la enfermedad, en la presencia constante de grandes cantidades de células bacteriales en el tejido infectado y en la ausencia de otros microorganismos.

Las bacterias son microorganismos muy pequeños (en promedio $0.6 - 3.5 \times 0.5 - 1.0 \mu$) y pueden ser observados bajo el microscopio compuesto. Debe tener mucho cuidado para excluir la posibilidad de que la bacteria bajo estudio sea saprofítica. Para descartar esta posibilidad se debe realizar la tinción de Gram. Sin embargo, la forma más fácil y segura para saber si la bacteria bajo estudio es patógena consiste en aislarla y multiplicarla en medios especiales de cultivo (Apéndice 2) y luego hacer pruebas de patogenicidad. Si la bacteria es patógena deberá reproducir los síntomas de la enfermedad.

La determinación de una especie parasítica de **nemátodo** se realiza en base a la presencia del estilete. La presencia de nemátodos con estilete es un indicio de que pueden ser los causantes de la enfermedad o al menos pueden estar involucrados en el desarrollo de ella. Si el nemátodo puede ser identificado como perteneciente a un género

o especie conocida, entonces el diagnóstico de la enfermedad se puede hacer con un alto grado de seguridad.

El diagnóstico de enfermedades causadas por **virus o mycoplasmas** es más difícil debido fundamentalmente a que muchos de estos organismos no se pueden observar en el microscopio compuesto y, en numerosas ocasiones, aún en el microscopio electrónico; muchos de los síntomas que tales organismos causan no son específicos y pueden confundirse con síntomas causados por factores ambientales. Sin embargo, algunas enfermedades desarrollan síntomas característicos que permiten un diagnóstico seguro. El diagnóstico de enfermedades causadas por microorganismos que no producen síntomas característicos se realiza investigando si la enfermedad es causada por un agente biótico o por un factor ambiental. Esto se hace tratando de transmitir el patógeno de una planta enferma a una planta sana y reproduciendo los síntomas de la enfermedad. Los métodos más comunes de transmisión son: Injertando tejido de la planta enferma sobre una planta sana, frotando la savia de una planta enferma sobre una planta sana o, permitiendo a algunos insectos, nemátodos u otros vectores potenciales del patógeno, alimentarse de la planta enferma y luego transmitirlo a una planta sana.

Un diagnóstico más profundo de una enfermedad causada bien sea por un virus o por un mycoplasma se puede realizar mediante cualesquiera de los siguientes procedimientos:

1. Inoculando un grupo de variedades diferenciales y comparando los síntomas desarrollados sobre éstos con los síntomas producidos en el hospedante original por patógenos ya conocidos.
2. Mediante observaciones en el microscopio electrónico del tejido enfermo y comparando la morfología del patógeno bajo estudio con la de otros patógenos ya conocidos.
3. Aplicando ciertos antibióticos a la planta enferma para determinar si el patógeno es susceptible a alguno de ellos y la planta se recu-

Diagnóstico de Enfermedades de Plantas

Fitopatología

Nombre _____ Curso _____

Muestra No _____ Procedencia _____ Fecha _____

1. **Hospedante:** Nombre Común _____ Nombre Científico _____

2. **Síntomas en el Campo:**

3. **Condiciones bajo las cuales la planta estuvo creciendo:**

Profundidad y naturaleza del suelo _____

Práctica de irrigación: qué cantidad y por cuánto tiempo?

Fertilizantes empleados: cuáles, dosis y forma de aplicación _____

Fungicidas o insecticidas utilizados: cuáles, dosis y forma de aplicación _____

Herbicidas o esterilizantes del suelo usados: cuáles, dosis y forma de aplicación _____

4. **Síntomas en detalle:** a) follaje y brotes; b) tronco, tallo, ramas; c) flores y/o frutos; d) raíces secundarias, raíces adventicias.

5. **Observaciones de la muestra en aumento bajo:** lupa y/o microscopio estereoscópico.

Detalle de lesión _____

Evidencia de esporas o cuerpos fructíferos _____

Exudado (color, consistencia) _____

Evidencia de insectos o ácaros _____

Evidencia de daños mecánicos o químicos _____

6. **Observaciones de la muestra en aumento alto:** Montaje del organismo en placas temporales y observación en el microscopio compuesto.

Diagramas: A. Cuerpo Fructífero,

B. Conidioforos y esporas

7. **Aislamiento:** cultivos preparados para aislar el organismo causal.

Método y Medio de Cultivo _____

Tejidos empleados _____

Condiciones ambientales durante el período de incubación _____

Apariencia de la colonia: tamaño, forma, color, consistencia _____

Cuerpos fructíferos y esporas _____

8. **Patogenicidad:**

Método de Inoculación _____

Período de Incubación y descripción de síntomas _____

9. **Diagnóstico:**

Nombre común de la enfermedad _____

Nombre del organismo o agente causal _____

10. **Recomendaciones:** Después de cada recomendación explicar las razones por las cuales se seleccionó como el método más práctico y efectivo para controlar el problema. _____

11. **Referencias consultadas:**

Práctica No. 6

Aislamiento de Hongos Fitopatógenos de Material Vegetal Enfermo

Objetivo

Demostrar un método para aislar hongos patógenos de plantas en cultivo puro.

Materiales

Hojas de arroz atacadas por *Pyricularia oryzae*; hojas de maíz atacadas por *Helminthosporium turcicum*; hojas de cebolla atacadas por *Alternaria porry* o; hojas y vainas de frijol atacadas por *Colletotrichum lindemuthianum*; cuchillas; pinzas; hipoclorito de sodio al 0.5%; lámpara de alcohol; cajas Petri y tubos de ensayo con PDA acidificado; cámara de aislamiento.

Procedimiento

Haga cortes de los tejidos enfermos de aproximadamente 5 mm de largo, de tal manera que abarquen tanto tejido enfermo como tejido sano. Sumérjalos durante 2 minutos en la solución de hipoclorito de sodio al 0.5%. Mediante las pinzas esterilizadas a la llama, transfiera 5 trozos en cada caja de Petri formando un cuadrado con un trozo de tejido en el centro. Coloque las cajas en una incubadora graduada entre 25–28°C. Una vez que aparezcan las colonias transfiera asepticamente trozos pequeños del margen de ellos a tubos de ensayo conteniendo PDA acidificado. Incube nuevamente. H₂O en la incubadora.

APUNTES

Helminthosporium turcicum

Pyricularia oryzae.

al 0.5% → Fitopatógeno. →

Acerbulos. - Or. Heterosporio.

DE. Heterosporio. Heterosporio.

de un estructura celular. - Heterosporio. Heterosporio.

Familia Dematiaceae.

Pyricularia oryzae.

Prueba

Cultivos

100

100

0.5%

100

100

100

100

Código de identificación

Código

Práctica No. 7

Inoculación de Hongos Fitopatógenos

Objetivo

Demostrar el efecto de la concentración del inóculo y la humedad relativa sobre el establecimiento de hongos fitopatógenos.

Materiales

Plántulas de maíz, cultivos de *Helminthosporium turcicum*, agua destilada estéril; hemacitómetro; aspersor De Vilbiss No. 15; compresor de aire; adherente ADSEE775; vasos de precipitación; cámara húmeda con humidificador; bolsas de plástico; agujas curvas; alambre grueso.

Procedimiento

Disuelva 5 gotas de ADSEE775 en 500 ml de agua destilada. Coloque unos 10 ml de ADSEE775-agua sobre la superficie de cada caja Petri con *H. turcicum*. Con la ayuda de una aguja curva frote suavemente el cultivo del hongo sobre la superficie

del medio. Filtre la suspensión de esporas a través de una capa doble de gasa sobre un vaso de precipitación. Lave la superficie de la caja con otros 10 – 20 ml de solución ADSEE775-agua; filtre y adicione el filtrado a la primera suspensión de esporas. Mediante la ayuda del hemacitómetro prepare dos concentraciones de esporas: 2000 y 10000 esporas/ml de agua. Esté seguro de que las macetas con las plántulas de maíz sean bien humedecidas antes de la inoculación. Inocule dos macetas con una suspensión de 2000 conidias/ml. Coloque una en la cámara húmeda. Cubra la otra con una bolsa de plástico y colóquela sobre una mesa del invernadero. Inocule otras dos macetas con una suspensión de 10000 esporas/ml e incube como hizo antes. Al inocular cubra las hojas con la suspensión hasta que estén completamente recubiertas. Después de 24 horas, remueva las macetas de las cámaras y colóquelas sobre una mesa del invernadero. Después de 7 días determine la severidad de la enfermedad de acuerdo a la concentración de esporas y a la cámara de incubación. Discuta los resultados.

APUNTES

Helminthosporium turcicum 10000

Práctica No. 8

Efecto de las Condiciones Ambientales Sobre el Crecimiento y Esporulación de Hongos

Objetivo

Demostrar el efecto que tiene el medio de cultivo, la temperatura y la luz, sobre el crecimiento y esporulación de hongos.

Materiales

Aislamientos de *Pyricularia oryzae*, *Helminthosporium turcicum*, *Aspergillus* ssp *Pleospora* ssp y *Chaetomium* ssp; 30 cajas de PDA; 30 cajas con V-8 agar; 30 cajas con malta - sal agar (MSA); 30 cajas con agar agua (AA); incubadoras graduadas a 15, 28 y 32° C; cámara con luz ultravioleta; cámara de aislamiento; lámpara de alcohol; papel parafilm; sacabocado, marcador.

Procedimiento

En la cámara de aislamiento siembre asépticamente por cada medio de cultivo 5 cajas de cada hongo, es decir, 20 cajas por hongo. Una vez sembradas las 120 cajas, incube por cada combinación hongo-medio una caja a 15°C, es decir, 4 cajas por cada combinación hongo-medio. Coloque otras 4 cajas a temperatura ambiental, otras cuatro cajas a 28°C y, 4 cajas a 32°C. Las 4 cajas que quedan por cada combinación hongo-medio, colóquelas en la cámara provista con luz ultravioleta. Repita lo mismo para cada uno de los 5 hongos restantes. Tome registros de crecimiento cada 2 días, y dé esporulación a los 8 días, para todos los hongos. Discuta los resultados.

APUNTES

19C - 20C (Cultivo).

Temperatura humedad -> Trab: Cto de medio de cultivo. PDA y (A4A) (EHA); 4 cajas -> Trabajo A.A.

Siembra: 22°C 28°C, ultravioleta, agua purificada, Electroquímica, Petalobria. Calentador bien el agua.

para evaluación: P

Closeto.

1	mas. notum en mas pequeño	Química.
2	no sembrado	1
3	no sembrado	1
4	roya	
5	roya CLORES.	+ ROYA.
6	mas pequeño	2. sano
7		
8	poca roya	
9	roya	
10	roya CL. alta insecuencia + ROYA.	

Práctica No. 9

Aislamiento de Bacterias Fitopatógenas de Material Vegetal Enfermo

Objetivo

Mostrar dos métodos para aislar bacterias fitopatógenas en cultivo puro.

Materiales

Tallos de tomate o de chile afectados por *Pseudomonas solanacearum*; hojas de frijol atacadas por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*; NGA; KB; cuchillas; pinzas; hipoclorito de sodio al 0.5 %; asa; pipetas de 1 ml; agua destilada estéril (ADE); tubos de ensayo; cámara de aislamiento.

Procedimiento

1. Corte trozos pequeños de tejido enfermo de aproximadamente 5 mm de largo, sumérgalos durante dos minutos en clórox o hipoclorito de sodio al 0.5%, enjuague en agua destilada estéril por un minuto y deposite 10 trocitos en un tubo de ensayo que contenga 5 ml de agua estéril; tape el tubo y manténgalo en reposo durante 15 minutos. Prepare 3 tubos de ensayo conteniendo cada uno 9 ml de agua destilada estéril (ADE). Enumérelos. Mediante una pipeta estéril de 1 ml transfiera 1 ml de la suspensión de bacterias al primer tubo, agite y de acá, transfiera 1 ml al segundo tubo, agite nuevamente, y de acá, pase 1 ml al tercer tubo para obtener finalmente diluciones de 1:10, 1:100 y 1:1000, respectivamente. Agregue por separado 0.5 ml de cada dilución por cada caja Petri esterilizada. Agregue apro-
2. Como el método anterior, corte trozos pequeños de aproximadamente 5 mm de tejidos afectados por *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*, colóquelos durante 2 minutos en hipoclorito de sodio al 0.5%, enjuáguelos en ADE durante un minuto y deposite 10 trocitos en un tubo de ensayo conteniendo 5 ml de ADE. Deje reposar por unos 10-15 minutos (observe el flujo de bacterias de color lechoso) y con una asa estéril transfiera una suspensión de bacterias a cajas Petri con nutriente-glucosa-agar (NGA). Se transfiere haciendo rayados paralelos de lado a lado de la caja sobre la superficie del medio. Coloque las cajas a temperatura ambiente. Las colonias aparecerán 48-72 horas más tarde. *Xanthomonas* produce colonias de color amarillo.

X: C. → Nuevaexul. → Colonias Amarillas

EDCA

Práctica No. 10

Inoculación de Bacterias Fitopatógenas

Objetivo

Demostrar la importancia de las heridas en la penetración y establecimiento de las bacterias fitopatógenas e ilustrar los postulados de KOCH.

Materiales

Plantas de frijol con trifolios; plantas de tomate con 5 a 6 hojas; goteros estériles; tubos de ensayo con 5 ml de agua destilada estéril; etiquetas; asas; agujas de disección; cajas Petri; cámara húmeda; humidificador; aspersor De Vilbiss No. 15; compresor de aire; cuchillas; cultivos de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* de *Pseudomonas solanacearum* de 24 a 48 horas de edad.

Procedimiento

Deposite 10 ml de agua destilada estéril en cada una de las cajas Petri con cultivos de *X. campestris* pv. *phaseoli* y *P. solanacearum*. Con la ayuda de una asa esterilizada en la llama remueva las células bacteriales y mézclelas con el agua de tal manera que el agua se enturbie. Tome una planta de frijol e inocule los trifolios con *X. campestris* pv. *phaseoli* haciendo cortes con una cuchilla previamente sumergida en la suspensión

bacterial. Inocule otra planta de frijol asperjando la suspensión bacterial sobre el follaje con el aspersor De Vilbiss. Finalmente, inocule 2 plantas con agua destilada estéril haciendo cortes con la cuchilla y por aspersión, respectivamente. Estas dos plantas servirán como controles.

Tome una planta de tomate y con la ayuda de un gotero deposite una gota de la suspensión de *P. solanacearum* en la axila de la tercera hoja. Introduzca la aguja de disección varias veces dentro del tallo a través de la gota de suspensión bacterial. Inocule una segunda planta depositando una gota de suspensión de *P. solanacearum* en la axila de la tercera hoja. Finalmente, inocule dos plantas con agua destilada estéril introduciendo la aguja dentro del tallo a través de la gota de agua y depositando una gota de agua destilada estéril, respectivamente.

Una vez inoculadas las plantas, se deben colocar dentro de la cámara húmeda durante 24 horas. Siete días después de la inoculación se empiezan a observar los primeros síntomas. Observe con cuidado los síntomas desarrollados por cada bacteria. Aísle de nuevo las bacterias siguiendo cualquiera de los procedimientos descritos en la práctica No. 9 y compare las colonias aisladas con las originales. Discuta los resultados obtenidos.

APUNTES

Práctica No. 11

Tinción y Reacción de Gram de Bacterias Fitopatógenas

Objetivo

Demostrar cómo teñir y determinar la reacción Gram negativa o positiva de bacterias fitopatógenas.

Materiales

Rojo congo al 2%; azul de metileno; soluciones de cristal violeta y oxalato de amonio; solución de Lugol; solución de contraste; alcohol acidificado; colonias de *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* y *Pseudomonas solanacearum*; portaobjetos; lámpara de alcohol; asas; agua destilada estéril; alcohol etílico al 95%.

Procedimiento

1. Tinción de bacterias:

A) Rojo Congo. Deposite sobre un portaobjetos limpio, una gota de solución rojo congo y con una asa estéril agregue una cantidad pequeña de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. Mezcle la bacteria con el colorante y distribúyala por todo un extremo de la cara superior del portaobjetos. Deje que se seque al medio ambiente. Una vez seca la preparación, agregue varias gotas de alcohol acidificado (3 gotas de ácido clorhídrico concentrado en 30 ml de alcohol etílico al 95%). La preparación cambiará de color rojo a azul. Permita que el alcohol se evapore y observe la preparación al microscopio con el lente de inmersión.

B) Azul de Metileno. Sobre un portaobjeto limpio y con la ayuda de una asa, deposite una suspensión diluida de *X. campestris* pv. *phaseoli*. Distribuya la bacteria por todo un extremo de la cara superior del portaobjetos y permita que se seque al medio ambiente. Fije las ce-

lulas bacteriales al portaobjetos, pasando la preparación rápidamente unas 5 – 6 veces sobre la llama de una lámpara de alcohol. Cerciórese de no exponer la bacteria directamente a la llama. Aplique 2 gotas de azul de metileno a la preparación bacterial y déjela reposar durante unos 5 minutos; lave el exceso de colorante con agua destilada. Permita que se seque al medio ambiente y observe la preparación al microscopio con el lente de inmersión.

2. Reacción de Gram.

Coloque una gota de agua destilada estéril sobre un cubreobjetos limpio y seco, previamente tratado con alcohol al 70%. Por cada cubreobjetos adicione una cantidad pequeña de *B. subtilis*, *X. campestris* pv. *phaseoli* y *P. solanacearum*. Mezcle la bacteria con la gota de agua.

Con la ayuda de un cubreobjetos previamente tratado con alcohol al 70%, disperse la bacteria sobre una porción del portaobjetos. Permita que el agua se evapore y luego pase el portaobjetos unas 5–6 veces sobre la llama de una lámpara de alcohol con el fin de fijar la bacteria. Permita que se enfríe y luego cubra la preparación con una suspensión acuosa de cristal violeta durante 30 segundos. Elimine el colorante y lave con solución de Lugol y deje reposar por 30 segundos. Lave el portaobjetos con alcohol etílico hasta que el colorante deje de salir del portaobjetos, quizás unos pocos segundos. Lave inmediatamente con un chorro suave de agua y agregue unas 2–3 gotas de solución de contraste. Deje reposar por unos 3 minutos. Finalmente lave con agua y permita que la preparación se seque al medio ambiente. Observe las preparaciones al microscopio compuesto.

Práctica No. 12

Presencia de Bacterias en Diferentes Ambientes

Objetivo

Investigar la presencia de bacterias en diversos habitats y examinar los hallazgos microscópicamente.

Materiales

Cultivos de *Bacillus subtilis*; cajas Petri con NGA y SDA; marcadores; asas; portaobjetos; cubreobjetos; colorante de cristal violeta; incubadora entre 35–37°C; lámpara de alcohol; microscopios estereoscópico y compuesto; aceite de inmersión; cámara de aislamiento.

Procedimiento

Para obtener buenos resultados, las cajas de Petri se deben preparar unas dos o tres horas antes de que la práctica de laboratorio se inicie. Tanto el medio como las cajas de Petri deben ser manejadas asepticamente. Identifique apropiadamente cada medio y una vez que esté solidificado, invierta las cajas para evitar la condensación de agua.

Para evitar contaminaciones con microorganismos se requiere de mucha limpieza. Evite todos los movimientos innecesarios (puertas, ventanas, ventiladores, etc.) durante la preparación del medio y transferencia de cultivos puros. Limpie todas las superficies de trabajo con un desinfectante (alcohol, hipoclorito de sodio al 5%, o jabón y agua). Lávese bien las manos. Antes de verter medio estéril de un frasco a una caja Petri, debe pasar la boca del frasco por la llama. Levante la tapa de la caja lo necesario para permitir la vertida del medio; coloque suficiente medio para cubrir bien el fondo de la caja e inmediatamente póngale de nuevo la tapa. Similarmente antes de transferir un cultivo puro a cajas, pase la boca del tubo que

contiene el cultivo por la llama e inserte una asa, también pasada por la llama, y obtenga una porción del cultivo. Como se hizo antes, levante la tapa de la caja lo necesario para permitir la entrada del asa y raye suavemente la superficie del medio haciendo líneas paralelas de un lado a otro de la caja; retire el asa y coloque de nuevo la tapa.

Inocule dos cajas de Petri conteniendo NGA y dos cajas conteniendo SDA con *Bacillus subtilis*. Deje dos cajas de cada medio sin inocular, las cuales servirán como controles. Identifique las cajas. Por cada medio incube entre 35–37°C una caja inoculada y otra sin inocular, dejando las otras cuatro cajas a temperatura ambiente.

Divídanse en cuatro grupos. Cada grupo tendrá que preparar dos cajas con NGA y dos cajas con SDA. El primer grupo hará muestreo de bacterias en el aire (corrientes de aire en el laboratorio, fuera del laboratorio, debajo de un árbol, etc.). El segundo grupo hará muestreo de bacterias de polvo (polvo de encima de una lámpara de techo, de un armario, del piso, etc.). El tercer grupo hará muestreo de bacterias del suelo (suelo de una maceta con plantas, de un prado, de forestales, del campo, de un lago o una quebrada, etc.). El cuarto grupo hará muestreo de bacterias de **agua** (de un lago, de un tanque, de una quebrada, de un acuario, etc.).

Para muestrear bacterias del **aire** basta con remover una tapa de las cajas en el lugar seleccionado para tal fin. Permita que la caja permanezca abierta por varios minutos o muévela alrededor varias veces y luego tápela. Incube dos cajas entre 35–37°C y las otras dos cajas déjelas al medio ambiente. El muestreo de bacterias de **polvo** se realiza mediante un aplicador de algodón estéril, el cual se impregna de polvo en la superficie que se va a muestrear, se levanta la tapa de la caja lo

suficiente para permitir la entrada del aplicador y seguidamente se frota a través de la superficie del medio y se tapa la caja. Incube dos cajas entre 35–37°C y las otras dos colóquelas al medio ambiente. El muestreo de bacterias del **suelo** se realiza en forma similar al muestreo de polvo y para tal fin, se esparce sobre el medio con la ayuda del aplicador, varias partículas de suelo. Incube como en el caso anterior. Finalmente, el muestreo de bacterias del **agua** se hace mediante la ayuda de una asa. Para tal propósito basta con sumergir el asa dentro de la muestra de agua y rayar suavemente sobre la superficie del medio, haciendo líneas paralelas de un lado a otro de la caja, retire el asa y tape la caja. Incube dos cajas entre 35–37°C y las otras dos, póngalas al medio ambiente.

Todas las cajas deben ser invertidas durante la incubación con el fin de evitar la condensación de agua.

Observe las cajas (las propias y de los otros grupos) después de 24 – 48 horas. Observe el tamaño, forma, color y textura de las diferentes colonias que aparecen. Además de bacterias, aparecerán levaduras y hongos particularmente en uno de los medios.

Cada grupo dibuje el tamaño aproximado y apariencia de las colonias sobre sus cajas Petri. Identifique cada colonia con respecto a su color, textura y cualquiera otra característica distintiva. Pre-

pare placas microscópicas de *Bacillus subtilis* y de aquellos organismos que aparecen en sus respectivos medios y tratamientos. Mediante un aplicador de algodón estéril transfiera una porción pequeña de una colonia y deposítela cerca del borde del portaobjetos (utilice un portaobjetos para dos preparaciones). Adicione una gota de agua destilada estéril y mézclela bien con la bacteria. Permita que se seque y adicione una o dos gotas de cristal violeta. Después de 30 segundos, elimine suavemente el exceso del colorante, coloque un cubreobjetos sobre la preparación, y observe la placa al microscopio compuesto. Observe también las preparaciones hechas por los otros grupos y discuta sus observaciones: 1) ¿Cuántas colonias hay en sus cajas?, ¿Cuántas clases de colonias hay?, 2) ¿Son las colonias de sus cajas similares a aquellas sobre las cajas de los otros grupos?, ¿Cuáles son las razones por las cuales son diferentes?, 3) ¿Cómo difieren las colonias sobre las cajas de su grupo con respecto a aquellas sobre las cajas de los otros tres grupos?, 4) De razones posibles a sus respuestas del numeral anterior, 5) ¿Hay algunas colonias que están afectando a otras (inhibición o estímulo)? Si la respuesta es afirmativa, ¿qué explicación daría y qué experimentos planearía para investigar más profundamente tal(es) fenómeno(s)?, 6) ¿Qué experimentos diseñaría para investigar en más detalle el habitat de sus muestras y los organismos que encontró? y, 7) ¿Qué posible aplicación le encontraría a sus resultados?, ¿Qué pruebas serían necesario realizar antes de que estas aplicaciones fueran practicadas?

APUNTES

Práctica No. 13

Inoculación de Virus Fitopatógenos

Objetivo

Demostrar la naturaleza infecciosa y la transmisión mecánica del virus del mosaico del tabaco (TMV) y/o del virus del mosaico común del frijol (BCMV).

Materiales

Hojas de tabaco atacadas por el virus del mosaico del tabaco o cigarros elaborados; hojas de frijol afectadas por el virus del mosaico común del frijol; plántulas sanas de tabaco; chile, tomate y frijol, a las cuales se les ha eliminado la yema terminal; pipetas; vasos de precipitación; fosfato de potasio (K_2HPO_4) 0.01 M, pH 7.5; agua destilada estéril; gasa.

Procedimiento

TMV. Triture 10 gr de material afectado con mosaico del tabaco en 25 ml de fosfato de potasio.

Filtre la suspensión a través de gasa y almacene el filtrado en el refrigerador.

BCMV. Macere 10 gr de hojas de frijol afectadas con el virus del mosaico común en 100 ml de agua destilada estéril o en la solución amortiguadora de fosfato de potasio. Filtre la suspensión a través de gasa y guarde el filtrado en el refrigerador.

Con la ayuda de un trozo de gasa estéril frote suavemente el inóculo de cada virus sobre las hojas de plántulas de tabaco, chile, tomate y frijol. Después de inocular el primer virus lávese las manos con agua y jabón para eliminar el virus. Coloque las plántulas inoculadas en el invernadero y observe el desarrollo de síntomas a los 7 – 14 días después de la inoculación. Discuta los resultados.

APUNTES

Metodología: - Fecundación, amonificación y filtrado de agua en agua destilada

75 ml de agua destilada en el agua + 10 grs. de tabaco + 100 ml de agua destilada + 100 ml de agua destilada

Inoculación: Troncos, Hojas, Flores, Inoculación 10 min. Hoja

Dilución 10 min

Enfermedades y síntomas

Ob. síntomas

Propiedades químicas

de la, 2. Hojas;

Práctica No. 14

Extracción y Fijación de Nemátodos del Suelo y de Tejidos Vegetales

Objetivo

Familiarizar al estudiante con los métodos más comunes de aislamiento de nemátodos del suelo y de tejidos vegetales.

1. Método de embudo de Baermann modificado para extraer nemátodos del suelo.

Materiales

Suelo infestado de nemátodos; embudos de vidrio o de plástico de paredes lisas; mangueras de caucho de unos 10 cm de largo; soporte para los embudos; mallas con abertura superior a 2 mm; papel facial; pinzas para las mangueras; vidrios de "syracuse"; microscopio estereoscópico; alcohol 95%; formaldehído 40%; ácido acético glacial.

Procedimiento

Homogenizar bien el suelo. Coloque las pinzas a las mangueras y conecte éstas a los embudos. Haga una casuela con un pedazo de malla e insértela en el embudo. Sobre la malla coloque una toalla facial o papel clenex doblado, sobre el cual se depositan 50 gr de suelo. Disperse bien el suelo de tal manera que forme una capa delgada. Doble las esquinas del papel y agregue agua al embudo hasta que haga contacto con la parte inferior de la malla. Con el propósito de eliminar tierra y residuos se descarta una pequeña cantidad de agua 5 minutos después de haber colocado el material en el embudo. Los nemátodos pasarán a través del papel y se reúnen en el fondo de la manguera. Después de 24 horas se toma unos 5 ml de cada uno de los embudos, apretando la pinza y reco-

giendo el líquido en el vidrio de "syracuse". Observe la muestra bajo el microscopio estereoscópico.

En un tubo de ensayo, caliente (60–85°C) 5 ml de fijador AFA (alcohol 95%: 20 ml; formaldehído 40%: 6ml; ácido acético glacial: 1 ml; agua: 40 ml), el cual se echa al recipiente conteniendo los nemátodos concentrados. De esta manera los nemátodos quedan muertos y fijados.

De cada frasco conteniendo nemátodos fijados se dejan los últimos 2–3 ml, eliminando el resto. Este pequeño volumen de nemátodos concentrados se agita, y con la ayuda de una jeringa, se extrae 0.1 ml, que se deposita en el centro de un círculo hecho de esmalte de uñas de 2 cm de diámetro. La gota se deja reposar durante 10 minutos y luego se coloca un cubreobjetos sobre ella, fijándolo con esmalte. Al cabo de 30 minutos aproximadamente, cuando el exceso de agua se haya evaporado de los bordes del cubreobjetos, se sella con esmalte. De cada muestra se preparan 3 placas. Finalmente se realiza el conteo e identificación directa en el microscopio de nemátodos fitoparásitos y no fitoparásitos.

2. Aislamiento de nemátodos del suelo mediante el método combinado del tamizado y embudo de Baermann.

Materiales

Suelo infestado con nemátodos; embudos de vidrio o de plástico de paredes lisas; mangueras de caucho de unos 10 cm de largo; soportes; mallas; papel facial; pinzas; vidrios de "Syracuse"; microscopio; alcohol 95%; formaldehído 40%; ácido acético glacial; serie de 4 tamices: No. 20

(850 μ), No. 60 (250 μ), No. 200 (74 μ) y No. 325 (45 μ); 2 baldes; frasco lavador; vasos de precipitación.

Procedimiento

Deposite 500 gr de suelo infestado con nemátodos en un balde y adicione 5 litros de agua; agite la suspensión durante 2 minutos, déjela reposar por 30 minutos y luego vierta lentamente el líquido sobrenadante a través de los cuatro tamices colocados en serie, así: número 20, 60, 200 y 325. Descarte el material retenido en los dos primeros tamices y transfiera a vasos de precipitación el material retenido en los tamices No. 200 y 325. Esto se hace con la ayuda del frasco lavador y dirigiendo el chorro de agua por debajo de los tamices. Transfiera el material a cada uno de los embudos preparados, tal como se hizo en el método anterior. Los nemátodos activos pasarán a través del papel y se depositarán en el fondo de la manguera. Al cabo de 12 a 24 horas se recogen muestras de 5 ml de cada uno de los embudos, apretando la pinza y recibiendo el líquido en el vidrio de "syracuse". Observe la muestra en el microscopio estereoscópico.

Los nemátodos grandes son retenidos en el tamiz número 200 (74 μ de abertura), mientras que los pequeños se retienen en el tamiz número 325 (45 μ de abertura). Trate de identificar los nemátodos que encontró siguiendo el procedimiento usado en el método anterior.

3. Extracción de nemátodos del suelo, raíces, tallos-hojas y/o granos mediante la técnica de la centrifuga.

Materiales

Muestras; licuadora; centrífuga de 5000 rpm con tubos (preferiblemente de plástico) con capacidad mínima de 50 ml; solución de azúcar (673 gr de azúcar/litro de agua); agua destilada; tamices número 20 y 325; 2 baldes; 2 frascos beaker de 500 ml de capacidad; frascos lavadores; "syracuses"; espátulas.

Procedimiento

Si la muestra es suelo, mezcle 100 gr de suelo con 5 litros de agua dentro de un balde. Si se trata

de tejido vegetal, basta con echar unos 10 gr de tejido y 1 litro de agua en una licuadora y póngala a funcionar durante unos 30 segundos. Cualquiera que sea la muestra, agite la mezcla y déjela en reposo durante 10 segundos. Sin remover el residuo precipitado en el fondo del recipiente, pase la suspensión a través de los dos tamices colocados juntos, en orden (número 20 sobre número 325) y en posición inclinada. Recoja la suspensión en un balde y desheche ésta. Separe los tamices eliminando los residuos retenidos en el tamiz número 20. En caso de que el tamiz número 325 quede lleno de agua, basta con golpear los lados del mismo varias veces hasta que salga toda el agua. Lave el tamiz número 325 por debajo mediante la ayuda de un frasco lavador que contenga agua destilada. Es conveniente empezar a lavar desde la parte superior del tamiz y luego hacia la parte inferior, haciéndolo rápido. El residuo resultante se recoge en un beaker y se transfiere a tubos de centrifugación de 50 ml. Procure que todos queden llenos hasta el mismo nivel. Coloque los tubos dentro de la centrífuga y póngala a funcionar a 3000 rpm durante 3 minutos. Los nemátodos y partículas pesadas se precipitarán en el fondo de los tubos. Elimine la suspensión acuosa dejando solamente los residuos en el fondo de los tubos. Agregue la solución de azúcar a los tubos con residuos, de tal manera que todos queden con el mismo volumen, pero no demasiado llenos para evitar que se derramen cuando la centrífuga este funcionando. Agite con una espátula los residuos para que formen una suspensión con la solución de azúcar. Centrifugue nuevamente a 3000 rpm durante 3 minutos. Al retirar los tubos de la centrífuga, los nemátodos quedarán suspendidos y las partículas pesadas se precipitarán en el fondo de los tubos. Pase la suspensión a través del tamiz número 325, procurando concentrar los nemátodos en la parte inferior del tamiz y facilitar así la lavada y recuperación de los nemátodos en un mínimo de agua. Lave con agua destilada como se explicó antes. El residuo obtenido así tiene los nemátodos concentrados. Saque unos 5 ml de suspensión y colóquela en el vidrio de "syracuse". Observe la muestra en el microscopio estereoscópico. Trate de identificar los nemátodos que separó siguiendo el procedimiento descrito en el primer método de extracción.

Práctica No. 15

Detección de Microorganismos en Semillas y Tratamiento Químico de Semillas

Objetivo

Demostrar la presencia de microorganismos en las semillas y determinar la concentración óptima de ciertos productos químicos utilizados para la protección de las mismas.

Materiales

Jugo medio
(Cajas de Petri con agar-agua (AA) al 2%; jugo de verduras (V-8) agar y nutriente-glucosa-agar (NGA); hipoclorito de sodio al 1%; 2,4-D al 0.2%; papel filtro; cajas Petri esterilizadas; luz ultravioleta (LU); tubos de ensayo con V-8 agar y NGA; benomyl (50%); thiram (75%); semillas de frijol, maíz, arroz, soya o sorgo.

Procedimiento

1. Prueba en agar.

(Utilice 5 cajas Petri con agar-agua al 2% por tratamiento. Tome 50 semillas por cultivo, trátelas con hipoclorito de sodio durante 2 minutos y siembre 10 semillas por caja de tal manera que queden bien distribuidas e incube a 20-25°C durante 4-8 días. Haga observaciones frecuentes tomando registro de germinación y número de semillas que presentan hongos, bacterias o ambos.) Las bacterias se transfieren a los tubos de ensayo con NGA - Ca CO₃ y los hongos a tubos de ensayo con V-8 agar - ácido láctico para identificación posterior y pruebas de patogenicidad.

2. Prueba en papel filtro más 2,4 - D.

Esta prueba es una modificación de la prueba de germinación ya que la semilla se coloca sobre la superficie de discos de papel filtro

humedecido. Los discos de papel se saturan con agua estéril y el exceso se elimina. Como en el método anterior tome 50 semillas por cultivo; trátelas con hipoclorito de sodio durante 2 minutos y luego coloque 10 semillas por caja Petri. Ya que con éste método el crecimiento de plántulas con frecuencia dificulta la observación de hongos, y la determinación del porcentaje de infección es imposible, adicione unas 5 gotas de 2,4-D al 0.2% por cada caja con el fin de prevenir la germinación de la semilla. Las cajas así tratadas se sellan con tiras de papel parafilm y se ponen a incubar a 20-25°C con un ciclo de luz ultravioleta (LU) de 12 horas diarias durante 4-8 días. Como en el método anterior, tome registros del número de semillas que presentan hongos o bacterias, o ambos. Identifíquelos.

3. Tratamiento Químico

Trate grupos de 50 semillas con Benomyl y Thiram a concentraciones de 0, 500, 1000, y 4000 ppm. Coloque las semillas dentro de una bolsa de plástico, agregue la dosis correspondiente de acuerdo al tratamiento y agite la bolsa durante un minuto; extienda luego la semilla sobre un papel y con la ayuda de unas pinzas siembre 10 semillas por cada caja conteniendo AA al 2%. Siembre 5 cajas por cada concentración, o sea, 25 cajas por fungicida. Incube a 20-25°C durante 4-8 días. Para cada concentración realice observaciones frecuentes de germinación y número de semillas que presentan hongos o bacterias, o ambos. Presente un resumen de los resultados en un cuadro, indicando cuál fue el mejor fungicida y las concentraciones óptimas que se deben emplear en el tratamiento de semillas. Si uno de los fungicidas es mejor que el otro ¿a qué se debe esa característica?

Control Clásico Plutella xylostella

Práctica No. 16

Estimación del Poder Residual de Fungicidas en el Follaje

Objetivo

Demostrar el uso de fungicidas y determinar la influencia del tipo de fungicida, la naturaleza de la superficie foliar y el efecto del agua de lluvia sobre la retención de los fungicidas.

Materiales

PDA; 6 plántulas de frijol; 6 plántulas de café; cajas Petri; cultivo de *Colletotrichum lindemuthianum*; benomyl; mancozeb; atomizadores; probetas de 10, 100 y 1000 ml; sacabocados; pipetas de 5 ml; ventilador; compresor de aire; humidificador; cámara.

Procedimiento

Preparar un litro de PDA. Prepare una suspensión de esporas de *C. lindemuthianum* que contenga más o menos 15000 esporas/ml. Adicione dentro de la cámara de aislamiento 20 ml de la suspensión de esporas, a cada caja de PDA aún líquido (45°C) y agite hasta que las esporas se hayan difundido a través del medio. Prepare 48 cajas vertiendo 20 ml de medio/caja Petri. Permita que el medio se solidifique.

Prepare soluciones de benomyl (2.5 gr/litro de agua = 0.5 kg/200 litros de agua/ha) y de mancozeb (15 gr/ litro de agua = 3kg/200 litros de agua/ha).

Conformen 4 grupos y procedan de la siguiente manera: **El grupo 1** realizará el tratamiento **café-benomyl**. Mediante un atomizador De Vilbiss número 15, accionado por un compresor de aire, asperje dos plantas de café con la solución de beno-

myl. El fungicida debe aplicarse hasta que comience a gotear de la superficie foliar. Una vez asperjadas las plantas, colóquelas cerca de un ventilador hasta que el follaje se seque. Coloque una de las plantas dentro de una cámara de plástico provista con un humidificador. Accione éste durante 30 minutos. Deje una tercera planta como testigo, es decir, sin ser tratada con el fungicida ni expuesta al humidificador. Desprenda las hojas de las tres plantas por separado y colóquelas una vez secas, con el envés hacia abajo sobre papel absorbente. Con la ayuda de un sacabocado desprenda 16 discos de las hojas que no fueron tratadas con benomyl, 16 discos de las hojas tratadas con el fungicida pero no expuestas a la lluvia artificial y, 16 discos de la planta tratada con fungicida y expuesta a lluvia artificial. El sacabocado debe lavarse y secarse al cortar discos de diferentes tratamientos. Por cada tratamiento disponga de 4 cajas con PDA. Con unas pinzas tome los discos, y bajo condiciones asépticas en la cámara de aislamientos, colóquelos sobre el medio de la suspensión de esporas con el haz, haciendo contacto directo con el medio. En cada caja coloque 4 discos correspondientes al mismo tratamiento. Los discos deben quedar equidistantes uno de otro. No mueva el disco una vez depositado sobre el agar. Después de 48 horas mida el diámetro de la zona de inhibición y presente los resultados en un cuadro. Compare y discuta los resultados con los otros 3 grupos.

El **grupo dos** realizará el tratamiento **café-mancozeb**, el **grupo tres** hará el tratamiento **frijol-benomyl** y; el **grupo cuatro** efectuará el tratamiento **frijol-mancozeb**. El procedimiento es el mismo que se siguió para el tratamiento café-benomyl.

APUNTES

Práctica No. 12 = 8

Presencia de Bacterias en Diferentes Ambientes

Gram +; saprofito. — 48 ps. ↓ anthracis, subtilis, Turbansis. → NGA

NGA; SDA. → casei — 37°C Medio, Composit

Colonias. Morfología

1. — Diámetro cm.

2. — Color. —

3. — consistencia, Pastos o mucida.

4. — Superficie, lisa-brillantes, rugosa u otra

5. — Borde. — Entero circulae. irregular

6. — Morfología Celular

lodo

Bacilos → HAVOL tñad Fitopatogena

lodo-bacito

$\lambda_{\text{max}} = 2.2 \mu\text{m} = 2.2 \times 10^{-6} \text{m}$
 $70 \text{ nm} - 1200 \text{ nm} \quad \text{Vib.}$

Inoculación de Virus Fitopatógenos

1). - How to get to the top of the mountain.

1) I want's extra por bean

1007 8 2

[illegible]

III. *Chrysomelidae*

Y. ...

7-14-1901

the 2000 and 2001 years. The 2000 year return period is 1.5×10^6 years, and the 2001 year return period is 1.6×10^6 years.

back in at least two days. I know, because I did it.

the year is 1900. The population of the United States in 1900 was 76,000,000. The population of the United States in 1910 was 92,000,000. The population of the United States in 1920 was 106,000,000. The population of the United States in 1930 was 122,000,000. The population of the United States in 1940 was 137,000,000. The population of the United States in 1950 was 152,000,000. The population of the United States in 1960 was 179,000,000. The population of the United States in 1970 was 203,000,000. The population of the United States in 1980 was 226,000,000. The population of the United States in 1990 was 250,000,000. The population of the United States in 2000 was 281,000,000. The population of the United States in 2010 was 312,000,000. The population of the United States in 2020 was 331,000,000.

10/10/2012 1:00:00 PM

[Faint handwritten notes at the bottom of the page]

[illegible]

Probatum. Item in a. d. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100. 101. 102. 103. 104. 105. 106. 107. 108. 109. 110. 111. 112. 113. 114. 115. 116. 117. 118. 119. 120. 121. 122. 123. 124. 125. 126. 127. 128. 129. 130. 131. 132. 133. 134. 135. 136. 137. 138. 139. 140. 141. 142. 143. 144. 145. 146. 147. 148. 149. 150. 151. 152. 153. 154. 155. 156. 157. 158. 159. 160. 161. 162. 163. 164. 165. 166. 167. 168. 169. 170. 171. 172. 173. 174. 175. 176. 177. 178. 179. 180. 181. 182. 183. 184. 185. 186. 187. 188. 189. 190. 191. 192. 193. 194. 195. 196. 197. 198. 199. 200. 201. 202. 203. 204. 205. 206. 207. 208. 209. 210. 211. 212. 213. 214. 215. 216. 217. 218. 219. 220. 221. 222. 223. 224. 225. 226. 227. 228. 229. 230. 231. 232. 233. 234. 235. 236. 237. 238. 239. 240. 241. 242. 243. 244. 245. 246. 247. 248. 249. 250. 251. 252. 253. 254. 255. 256. 257. 258. 259. 260. 261. 262. 263. 264. 265. 266. 267. 268. 269. 270. 271. 272. 273. 274. 275. 276. 277. 278. 279. 280. 281. 282. 283. 284. 285. 286. 287. 288. 289. 290. 291. 292. 293. 294. 295. 296. 297. 298. 299. 300. 301. 302. 303. 304. 305. 306. 307. 308. 309. 310. 311. 312. 313. 314. 315. 316. 317. 318. 319. 320. 321. 322. 323. 324. 325. 326. 327. 328. 329. 330. 331. 332. 333. 334. 335. 336. 337. 338. 339. 340. 341. 342. 343. 344. 345. 346. 347. 348. 349. 350. 351. 352. 353. 354. 355. 356. 357. 358. 359. 360. 361. 362. 363. 364. 365. 366. 367. 368. 369. 370. 371. 372. 373. 374. 375. 376. 377. 378. 379. 380. 381. 382. 383. 384. 385. 386. 387. 388. 389. 390. 391. 392. 393. 394. 395. 396. 397. 398. 399. 400. 401. 402. 403. 404. 405. 406. 407. 408. 409. 410. 411. 412. 413. 414. 415. 416. 417. 418. 419. 420. 421. 422. 423. 424. 425. 426. 427. 428. 429. 430. 431. 432. 433. 434. 435. 436. 437. 438. 439. 440. 441. 442. 443. 444. 445. 446. 447. 448. 449. 450. 451. 452. 453. 454. 455. 456. 457. 458. 459. 460. 461. 462. 463. 464. 465. 466. 467. 468. 469. 470. 471. 472. 473. 474. 475. 476. 477. 478. 479. 480. 481. 482. 483. 484. 485. 486. 487. 488. 489. 490. 491. 492. 493. 494. 495. 496. 497. 498. 499. 500. 501. 502. 503. 504. 505. 506. 507. 508. 509. 510. 511. 512. 513. 514. 515. 516. 517. 518. 519. 520. 521. 522. 523. 524. 525. 526. 527. 528. 529. 530. 531. 532. 533. 534. 535. 536. 537. 538. 539. 540. 541. 542. 543. 544. 545. 546. 547. 548. 549. 550. 551. 552. 553. 554. 555. 556. 557. 558. 559. 560. 561. 562. 563. 564. 565. 566. 567. 568. 569. 570. 571. 572. 573. 574. 575. 576. 577. 578. 579. 580. 581. 582. 583. 584. 585. 586. 587. 588. 589. 590. 591. 592. 593. 594. 595. 596. 597. 598. 599. 600. 601. 602. 603. 604. 605. 606. 607. 608. 609. 610. 611. 612. 613. 614. 615. 616. 617. 618. 619. 620. 621. 622. 623. 624. 625. 626. 627. 628. 629. 630. 631. 632. 633. 634. 635. 636. 637. 638. 639. 640. 641. 642. 643. 644. 645. 646. 647. 648. 649. 650. 651. 652. 653. 654. 655. 656. 657. 658. 659. 660. 661. 662. 663. 664. 665. 666. 667. 668. 669. 670. 671. 672. 673. 674. 675. 676. 677. 678. 679. 680. 681. 682. 683. 684. 685. 686. 687. 688. 689. 690. 691. 692. 693. 694. 695. 696. 697. 698. 699. 700. 701. 702. 703. 704. 705. 706. 707. 708. 709. 710. 711. 712. 713. 714. 715. 716. 717. 718. 719. 720. 721. 722. 723. 724. 725. 726. 727. 728. 729. 730. 731. 732. 733. 734. 735. 736. 737. 738. 739. 740. 741. 742. 743. 744. 745. 746. 747. 748. 749. 750. 751. 752. 753. 754. 755. 756. 757. 758. 759. 760. 761. 762. 763. 764. 765. 766. 767. 768. 769. 770. 771. 772. 773. 774. 775. 776. 777. 778. 779. 780. 781. 782. 783. 784. 785. 786. 787. 788. 789. 790. 791. 792. 793. 794. 795. 796. 797. 798. 799. 800. 801. 802. 803. 804. 805. 806. 807. 808. 809. 810. 811. 812. 813. 814. 815. 816. 817. 818. 819. 820. 821. 822. 823. 824. 825. 826. 827. 828. 829. 830. 831. 832. 833. 834. 835. 836. 837. 838. 839. 840. 841. 842. 843. 844. 845. 846. 847. 8

Quercus agrifolia Nutt. *Quercus agrifolia* Nutt. *Quercus agrifolia* Nutt.

mid 9. — *Lycopodium Holmboei* sp. n. Lobs. mucro blava - 10-15 cm.

The anti-rust - brown, and -

There is a lot of work to be done in the future.

1. $\{x, y, z\}$ is a basis for V if and only if $\{x, y, z\}$ is a linearly independent set and $\{x, y, z\}$ spans V .

APUNTES

Práctica No. 14

Extracción y Fijación de Nemátodos del Suelo y de Tejidos Vegetales

This image shows a single sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

APUNTES

Práctica No. 15

Detección de Microorganismos en Semillas y Tratamiento Químico de Semillas

[illegible]

APUNTES

Práctica No. 16

Estimación del Poder Residual de Fungicidas en el Follaje

[illegible]

OTRAS PUBLICACIONES DISPONIBLES SOBRE FITOPATOLOGIA:

- **Principios Básicos de Fitopatología**
Jairo Castaño Z.
- **Guía para el Diagnóstico y Control
de Enfermedades de Plantas.**
Volumen I
Mario Contreras, Octavio Ramírez.
- **Guía para el Diagnóstico y Control
de Enfermedades de Plantas.**
Volumen II
Jairo Castaño Z., Octavio Ramírez y
José Zepeda.
- **Fungicidas, Insecticidas y Herbicidas
Registradas en Honduras.**
Jairo Castaño Z., José A. Zepeda.