

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS PATÓGENOS EN EL LABORATORIO



**Graciela García Guzmán
Irma Acosta Calixto
Rosamond Coates
Juan Núñez Farfán
Martin Heil
Julio César Montero**



dgaape

**Dirección General de Asuntos
del Personal Académico**

**PAPIME
PE201717 / PE202919**

AISLAMIENTO DE HONGOS CAUSANTES DE LOS SINTOMAS (MANCHAS FOLIARES)

MATERIAL:

Mecheros, vasos de precipitado de 50 ml., agujas de disección, bisturí, cronometro, marcadores, sanitas estériles, cloro (hipoclorito de sodio), agua destilada estéril, cajas de petri con medio de cultivo PDA estéril.



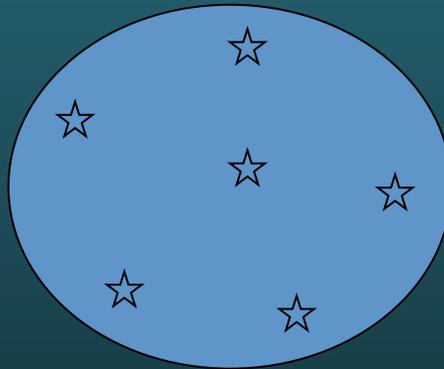
METODO:

CULTIVO DE LOS HONGOS

- 1) Se realizarán cortes de las hojas a nivel del límite de la pudrición (con manchas o puntos) con un bisturí previamente esterilizado a la flama de un mechero.

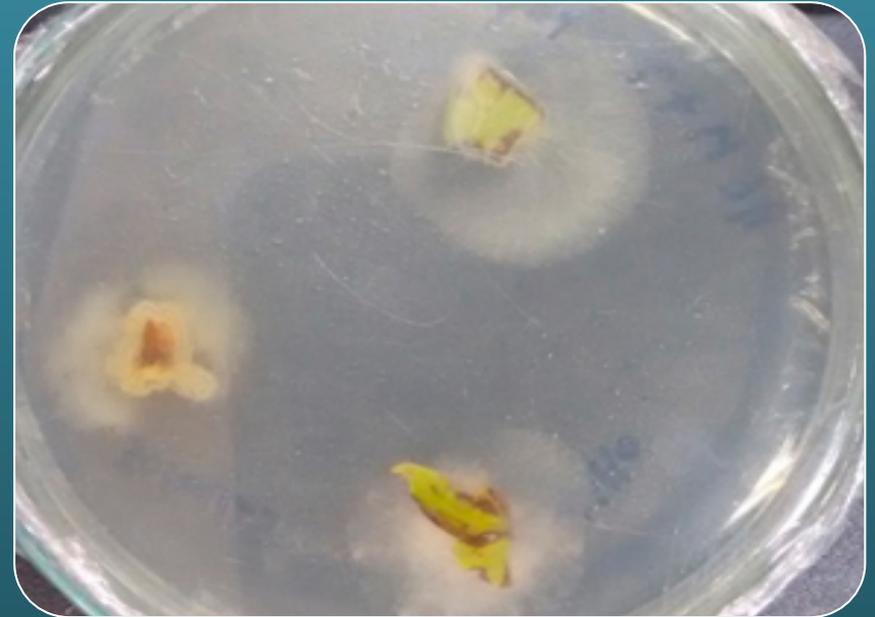


- 2) Se colocarán los cortes en solución de hipoclorito de sodio al 65% durante 2 minutos para desinfectarlos.
- 3) Después se enjuagarán los cortes en agua destilada estéril por 2 minutos.
- 4) Posteriormente los cortes se colocarán en papel o sanitas estériles para eliminar el exceso de agua.

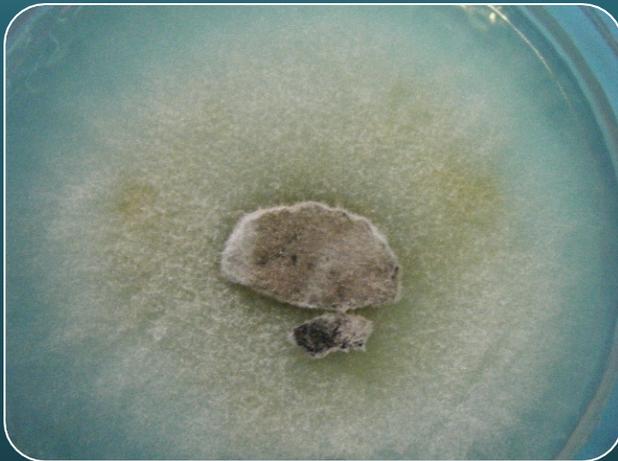
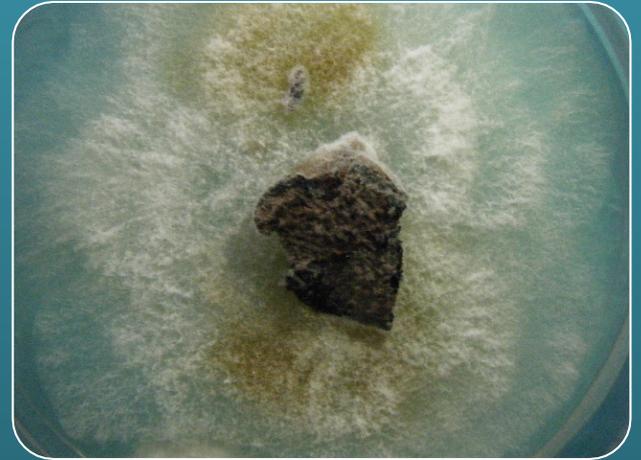


5) Una vez secos, los cortes se colocarán con ayuda de pinzas o aguja de disección (previamente estéril en un mechero) en cajas petri ya etiquetadas con medio de cultivo PDA.

6) Finalmente las cajas de petri se dejan a temperatura ambiente o se meten en una incubadora a 25°C hasta observar el desarrollo y esporulación del hongo.



CULTIVOS DE HONGOS



PURIFICACION DE CULTIVOS DE HONGOS

- Una vez que los hongos emergen a partir de los tejidos vegetales.
- Se toma una pequeña porción de micelio con una aguja de disección previamente esterilizada a la flama y se transfiere a cajas de petri con medio de cultivo PDA (todo estéril).
- Se hacen tantas transferencias de micelio como sean necesarias con el fin de obtener cultivos de hongos puros.
- Posteriormente se purificarán las cepas realizando cultivos monospóricos.

IDENTIFICACION DE HONGOS

Finalmente se llevará a cabo la identificación con base en la morfología colonial y por observación microscópica de preparaciones de los microorganismos obtenidos y utilizando claves taxonómicas.



PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Una vez que los hongos se hayan aislado e identificado, se llevarán a cabo pruebas de patogenicidad para verificar que los hongos aislados son realmente los agentes causales de los daños observados.

METODO:

1) A partir de semilla se obtienen plantas sanas bajo condiciones controladas de invernadero.



2) Se preparará una suspensión de micelio-esporas de los hongos purificados.

3) Se tomará como unidad experimental una hoja con cinco repeticiones y hojas controles.

4) Las hojas se desinfectarán con alcohol al 70% y se inocularán con la suspensión de los microorganismos purificados, empleando los siguientes métodos:



- **POR HERIDA:** donde se realizará una pequeña incisión o un raspado superficial en la lámina de la hoja y se inoculará directamente mediante una aguja de disección.



- **POR CONTACTO:** donde se colocará durante 48 horas trocitos de algodón humedecidos con la suspensión micelio-esporas sobre la hoja elegida para la prueba.



- 5) Una vez inoculadas las hojas, se cubrirán con bolsas de plástico durante 48 horas para evitar el arrastre del inóculo.
- 6) Finalmente se realizarán observaciones cada 24 horas hasta la manifestación de los síntomas y se llevará a cabo nuevamente el aislamiento e identificación de la especie del hongo en cuestión.
- 7) Para los controles se usará la misma metodología pero en lugar de la suspensión micelio-esporas se utilizará agua estéril.

