



FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

EVALUACIÓN DEL EFECTO BIOLÓGICO DEL HONGO *Ustilago quitensis*  
SOBRE LA MALEZA *Cortaderia jubata*

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar el título de Ingenieras en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc Carla Cecilia Almendáriz Palacios

Autoras

Lissed Jackeline Gavilánez Torres

Andrea Cristina Salazar Andrade

Año

2016

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con los estudiantes, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

---

Carla Cecilia Almendáriz Palacios  
Máster en Biotecnología Molecular y Celular de Plantas.  
C.I.: 1002514626

### DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaramos que este trabajo es original, de nuestra autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

---

Lissed Jackeline Gavilánez Torres

C.I.: 0202029393

---

Andrea Cristina Salazar Andrade

C.I.: 1721640553

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a Dios por permitirnos culminar este momento importante en nuestra formación profesional, siendo una etapa de crecimiento personal. A nuestros familiares, amigos y docentes en especial a nuestra Tutora de Tesis Carla Almendáriz por brindarnos sus conocimientos y guía.

A los miembros que conforman el laboratorio de Centro de Investigación, Estudios y Desarrollo de Ingenierías (CIEDI) con mención especial a la Doc. Lien Gonzales por el apoyo a la finalización de nuestro trabajo de titulación.

## **DEDICATORIA**

A nuestras familias que nos brindaron fortaleza para no desmayar durante este año de tesis, por creer en nosotros, por no desistir en el empuje brindado hacia la superación. “Cerca o lejos “

## RESUMEN

*Cortaderia jubata* es una planta invasora conocida por desplazar vegetación nativa por ejemplo: matorrales y plantas leñosas. El control biológico es una posible solución para eliminar esta maleza de plantaciones nativas evitando efectos secundarios que tienen otros métodos físicos, mecánicos o químicos. *Ustilago quitensis* es un hongo *Basidiomyceto* que invade las inflorescencias de la planta *C. jubata*, por lo cual es considerado como posible agente de control biológico. Esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto biológico que tiene el hongo *U. quitensis* sobre la maleza *C. jubata*. A nivel de laboratorio se evaluaron condiciones de temperatura y composición de medio líquido para obtener mayor concentración de biomasa del hongo *U. quitensis*. Se estableció un protocolo que permita identificar el porcentaje de incidencia del fitopatógeno sobre la planta. Se analizó la relación entre la concentración de esporas del hongo en inóculos y el porcentaje de incidencia del fitopatógeno en la planta utilizando una cámara de Neubauer. Así mismo, se determinó el porcentaje de incidencia en diferentes partes de las plantas utilizando dos métodos de infección (aspersión y directo). Se obtuvo un mayor crecimiento micelial a 25 °C *in vitro*. El tipo de esporas identificadas fueron: telioespora y basioesporas. El hongo fitopatógeno mostró mayor concentración de biomasa a los 4 días de incubación en medio de cultivo líquido (0.0042 g biomasa/ $\mu$ L). Existieron diferencias significativas entre los tratamientos con diferentes concentraciones C1 (818.000 conidios/ $\mu$ L), C2 (360.000 conidios/ $\mu$ L), C3 (122.000 conidios/ $\mu$ L), y C4 (38.000 conidios/ $\mu$ L). Finalmente, se evidenció un porcentaje de 94% de incidencia del hongo fitopatógeno *U. quitensis* en la inflorescencia de la planta y 50% en las hojas por concentración C1 por el método de aspersión. Mientras que, con el método directo con una concentración de (0.0042 g biomasa/ $\mu$ L), se determinó el porcentaje de incidencia en la inflorescencia de 44% y en hojas de 18%. El fitopatógeno *U. quitensis* muestra una mayor incidencia utilizando el método de aspersión en la planta representando mayor efecto en la floración. Se propone a este hongo fitopatógeno como posible control biológico de la maleza en el Ecuador.

## ABSTRACT

*Cortaderia jubata* is an invasive plant known to displace native vegetation for example: shrubbery and woody plants. Biological control is a possible solution to eliminate this weed from native plantations avoiding secondary effects that are caused by physic, mechanic or chemical methods. *Ustilago quitensis* is a *Basidiomyceto* type of *fungi* that invades different parts of the plant *C. jubata* for which is it considered as a possible agent of biocontrol. The aim of the investigation was to evaluate the biological effect that *U. quitensis* has over the weed *C. jubata*. Temperature and media composition conditions were evaluated in laboratory level to obtain the major biomass concentration of *U. quitensis*. A protocol for identifying the percentage of incidence of the phytopathogen over the plant was established. The relationship between the spores concentration of the *fungi* in inoculums and the incidence percentage of the phytopathogen in the plant was analyzed using Neubauer chamber. As well the incidence percentage in different parts of the plant were determined using different methods of infection (direct application or aspersion). It was obtained a major mycelial growth at 25 °C *in vitro*. The identified spores type were: teliospore and basiospore. Phytopathogen *fungi* showed a major concentration of biomass at 4 days of incubation in liquid media (0.0042 g biomass / $\mu$ L). Significant differences were observed between concentrations C1 (818.000 conidios/ $\mu$ L), C2 (360.000 conidios/ $\mu$ L), and C3 (122.000 conidios/ $\mu$ L), C4 (38.000 conidios/ $\mu$ L). Finally, a 94% incidence of *U. quitensis* in flower and 50% in leafs with concentration C1 by aspersion was evidenced, whereas direct application (0.0042 g biomass/ $\mu$ L), the incidences was 44% on flowers and 18% on leafs. *U. quitensis* showed a major incidence using aspersion on the plant representing major effect on the flowers. This phytopathogen *fungi* is proposed as a possible weed control in Ecuador.

## ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción .....	1
1.1 Antecedentes .....	2
1.2 Formulación del problema .....	5
1.3 Justificación .....	5
1.4 Objetivos .....	6
1.4.1 Objetivo general .....	6
1.4.2 Objetivos específicos .....	7
2. Capítulo II. Marco Teórico .....	8
2.1 Maleza Generalidades .....	8
2.1.1 Cortaderia jubata .....	8
2.2 Hongos fitopatógenos: Generalidades .....	10
2.2.1 Desarrollo de infección de hongos fitopatógenos .....	12
2.2.2 Taxonomía .....	12
2.2.2.1 Clase: <i>Basidiomycotina</i> .....	13
2.3 Cinética de crecimiento .....	14
2.3.1 Fases de Crecimiento .....	14
2.3.2 Fase de latencia .....	14
2.3.3 Fase logarítmica o exponencial .....	14
2.3.4 Fase estacionaria .....	15
2.3.5 Fase de muerte .....	15
2.4 Condiciones de crecimiento de microorganismos .....	16
2.4.1 Factores físicos y químicos .....	16
2.4.1.1 Temperatura .....	16
2.4.1.2 Actividad de agua (aw) .....	16
2.5 Métodos de control de maleza .....	17
2.5.1 Control biológico .....	17
2.5.2 Método químico .....	18
2.5.3 Método mecánico .....	19



2.5.4	Método térmico.....	19
2.6	Técnica para identificación de esporas .....	20
2.6.1	Determinación de la concentración de conidios .....	20
2.6.2	Cámara de Neubauer.....	20
2.6.3	Diluciones seriadas .....	20
2.6.4	Peso seco.....	21
3.	Capítulo III. Metodología .....	22
3.1	Esquema de la experimentación .... ¡Error! Marcador no definido.	
3.2	Detalle de experimentos.....	23
3.3	Aislamiento y cultivo del hongo .....	23
3.3.1	Recolección de muestras .....	23
3.3.2	Selección de muestras y almacenamiento .....	23
3.3.3	Microorganismos.....	24
3.3.4	Activación de la cepa .....	24
3.4	Inoculación del hongo fitopatógeno <i>Ustilago quitensis</i> en medio sólido a diferentes temperaturas. ....	24
3.5	Identificación morfológica del hongo fitopatógeno <i>Ustilago quitensis</i> .....	24
3.5.1	Medición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno.....	25
3.5.2	Identificación de las estructuras reproductoras .....	25
3.5.3	Cuantificación de la concentración de esporas mediante el método de Neubauer.....	25
3.5.4	Diluciones seriadas .....	26
3.6	Determinación de Biomasa del hongo fitopatógeno <i>Ustilago quitensis</i> .....	26
3.6.1	Preparación del medio líquido.....	26
3.6.2	Determinación de acumulación de biomasa.....	26
3.6.2.1	Preparación de pocillos para peso seco.....	26
3.6.2.2	Peso seco.....	27
3.7	Determinación de la incidencia en diferentes partes de la planta <i>Cortaderia jubata</i> .....	27

4. Capitulo IV. Resultados y Discusión .....	28
4.1 Determinación de la temperatura en el crecimiento de las cepas .....	28
4.2 Descripción morfológica del hongo fitopatógeno <i>Ustilago quitensis</i> .....	29
4.2.1 Descripción de las estructuras reproductivas del hongo fitopatógeno <i>Ustilago quitensis</i> .....	30
4.2.1.1 Determinación del área de propagación .....	32
4.2.2 Concentración de esporas .....	37
4.2.3 Biomasa .....	38
4.2.4 Métodos de inoculación del hongo fitopatógeno en diferentes partes de la planta.....	41
5. Capitulo V. Conclusiones y Recomendaciones .....	46
5.1 Conclusiones.....	46
5.2 Recomendaciones .....	47
REFERENCIAS .....	48
ANEXOS .....	55

## 1. Capítulo I. Introducción

La presente investigación se enfoca en un método biológico para el control integrado de malezas a partir de la aplicación de un hongo fitopatógeno aislado de zonas ecuatorianas. El control de malezas en Ecuador se ha manejado con varios mecanismos que a lo largo del tiempo han mostrado efectos adversos tanto en la salud de las personas como en el medio ambiente.

Para analizar esta problemática es necesario puntualizar las causas. Los métodos convencionales sean químicos, manuales, mecánicos o físicos son poco efectivos; demandan tiempo y algunos son costosos para ser aplicados en el control de malezas (DiTomaso, Drewitz, y Kyser, 2008, p.82). Por tal razón, con los avances de la tecnología se ha planteado una solución que permitirá usar microorganismos capaces de atacar la maleza sin el uso de métodos químicos u otros métodos desfavorables.

Entre algunos microorganismos utilizados encontramos: hongos fitopatógenos, caracterizados por ser organismos causantes de enfermedades en las plantas; porque producen enzimas, toxinas, entre otras sustancias; las cuales alteran el metabolismo celular en la planta adhiriéndose las esporas a las superficies y germinando a través del tubo germinativo (Motta y Ordoñez, 2014).

El estudio se realizó para encontrar una alternativa al control integrado de malezas a partir de microorganismos específicos los cuales infectan a la planta que se considera maleza. Por lo tanto, los hongos fitopatógenos utilizados no dañan el hábitat de otros cultivos y son un método amigable con el medio ambiente (Hokkanen y Lynch, 2003). Además, no causan afecciones a los seres humanos

## 1.1 Antecedentes

*Cortaderia jubata*, también llamado sigse, es una planta perenne originaria de las pampas argentinas y de los Andes de Bolivia, Perú y Ecuador. Tiene hojas lineales de 2 a 3 cm de ancho y llegan a alcanzar hasta 2 m de alto. *Cortaderia* spp. forma inflorescencias terminales en carrizos que llegan a alcanzar hasta 4 m de altura. Las inflorescencias son largas y producen miles de semillas que logran ser diseminadas por el viento (DiTomaso et al., 2008, p. 85). Esta herbácea tiene la característica de colonizar generalmente zonas intervenidas, es decir zonas donde la vegetación y el suelo han sido alterados. Investigaciones anteriores demuestran que las plantas del género *Cortaderia* causan un impacto en el ecosistema, porque forman una densa colonia que impiden el establecimiento de especies nativas presente en zonas costeras y tierras rocosas (Gosling, Shaw, y Beadel, 2000).

Las plantas del género *Cortaderia* spp. son consideradas hierbas invasivas o malezas en lugares como bosques, debido a la velocidad en que se propagan y al efecto que provocan en los hábitats naturales de ciertos países (Vourlitis y Kroon, 2013). Las principales plantas desplazadas por *Cortaderia jubata* en el norte de las costas de Nueva Zelanda son cultivos como: Rimu (*Dacrydium cupressinum*), Pingao (*Ficinia spiralis*), Flor de arroz (*Ozothamnus diosmifolius*), Brillantísima (*Coprosma repens*), Manatu (*Plagianthus regius*) (Reid, Sawyer, y Rolfe, 2009, p. 14).

La literatura señala que tanto California del Sur y Hawái en Estados Unidos, y en otros países como Nueva Zelanda, las comúnmente llamadas hierbas jubata han proliferado sin ser plantas autóctonas (Okada, Lyle, y Jasieniuk, 2009; Vourlitis y Kroon, 2013). En Estados Unidos se empezó a considerar como una maleza desde la década de los 60. Sin embargo, inicialmente, *Cortaderia jubata* se introdujo en Estados Unidos, Nueva Zelanda y África del Sur como una planta ornamental y como un pasto de secano (DiTomaso et al., 2008, p. 82). En Ecuador las malezas se localizan en ecosistemas de Matorral altoandino en zonas de la parte sur y norte del país principalmente en

barrancos o quebradas (Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN), 2009, p. 34). Las plantas del género *Cortaderia* se caracterizan por localizarse junto a plantas leñosas, matorrales, pastos perennes nativos, así como: cola de venado (*Andropogon gerardii*), conjunto de plantas como: Ñachag (*Bidens andicola*), *Leandra subseriata*, *Zapatitos (Calceolaria crenata)* y arbustos pequeños como: *Baccharis caespitosa* y *Lupinus pubescens*, dañándolos (Labrada, Caseley, y Parker, 1996).

Durante las últimas décadas, el control de *Cortaderia* spp. se ha realizado mediante métodos mecánicos, químicos y térmicos. El método químico se divide en dos clases importantes que son de origen vegetal y otros sintéticos. Los herbicidas normalmente se clasifican en base a su modo de acción e interfieren de varias maneras en el metabolismo de la planta.

El herbicida que mayormente se ha utilizado para el control de *Cortaderia* es el glifosato, basándose en: la textura del suelo, el tipo de planta, la presencia de plantas nativas y las condiciones ambientales (Gallastegui y Prieto, 2006, p. 30). Asimismo, se ha realizado ensayos con Imazapyr, Fluazifop-P butyl, Sethoxydim. Los efectos tóxicos generados por el uso de estos productos han resultado en grandes afecciones de salud a corto y largo plazo. Los herbicidas tienen gran impacto ambiental y han demostrado ser una alternativa económicamente no viable (DiTomaso et al., 2008, p. 85). Por ejemplo, el glifosato inhibe la síntesis de aminoácidos aromáticos capaces de formar proteínas y es absorbido por partículas del suelo. Por otro lado, se ha demostrado que la toxicidad es baja para mamíferos, aves y peces; pero, resulta ser una sustancia letal para anfibios (Beebee y Griffiths, 2005).

El otro método de control mencionado es el físico que consiste en la eliminación manual (Sanz, Sánchez, y Vesperinas, 2004). La eliminación mecánica consiste en el uso de maquinaria especializada para arrancar la raíz, es un trabajo arduo, largo y costoso que hay que repetir durante varios años para que no existan nuevos brotes. Es poco recomendable realizar la

eliminación mecánica utilizando maquinaria pesada ya que elimina también a las plantas autóctonas (Gosling et al., 2000).

El método térmico, consiste en la quema controlada, bajo la supervisión de personal capacitado, mediante lanzallamas. Este es un método de control desfavorable ya que, al igual que el método físico puede generar nichos capaces de formar nuevas invasiones (Gallastegui y Prieto, 2006).

Los métodos químicos, físicos y térmicos han sido tradicionalmente empleados en el control de malezas, siendo técnicas perjudiciales. En consecuencia, se ha considerado buscar métodos de control ecológicamente factibles y con métodos biológicos seguros debido a que tienen una estricta especificidad del hospedero por lo que son cotizados tanto los carbones y royas como una alternativa de control biológico en el Ecuador. Con este fin se emplea el hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* ya que logra ingresar a la planta por presión mecánica, debido a que las esporas secas de los hongos trasladan compuestos que al momento de hidratarse pueden unirse a la parte externa de la planta, además liberan enzimas tales como cutinasas y celulasas, degradando la pared celular y facilitando el proceso de penetración del hongo (Pineda, 2011).

Existen otras investigaciones acerca del género *Ustilago* que han permitido obtener más información, la especie *Ustilago bullata* es considerado un potencial agente biocontrol de *Bromus tectorum* que es una herbácea perenne perteneciente a la familia de las gramíneas. Las esporas de *U. bullata* germinan y se desarrollan en esporidios en el suelo, y se fusionan para crear hifas que infectan a los pastos durante la etapa de plántula. El patógeno crece sistémicamente dentro del huésped hasta la floración, cuando finaliza el proceso de producción de semillas en la planta, provoca generación de esporas del hongo en lugar de semillas viables (Prevéy y Seastedt, 2015).

Además, en el Ecuador no se han realizado investigaciones relacionadas al hongo fitopatógeno sobre la planta *Cortaderia jubata*, pero se conoce de ciertos

problemas que causa la maleza, como el actuar como hospedero de plagas, enfermedades de cultivos y en la interferencia de ciertas labores culturales. Conjuntamente, se ha determinado que muchas de las especies dañinas de maleza se encuentran al norte y sur del Ecuador (Labrada et al., 1996). Por esta razón, se desea profundizar los estudios sobre el efecto biológico que causa *Ustilago quitensis* sobre su huésped. Para poder proponer a estos hongos fitopatógenos como posibles controles biológicos de la maleza *Cortaderia jubata* en el Ecuador.

## 1.2 Formulación del problema

*Cortaderia jubata* es una planta invasora que se caracteriza por desplazar a la vegetación nativa en Ecuador por ejemplo: matorrales y plantas leñosas, que en el ecosistema tienen como principal función evitar el cambio de curso natural de los ríos, la apertura de pastizales para la crianza de ganado vacuno y la quema excesiva (MECN, 2009, p. 35). Además, suprime el crecimiento de los árboles jóvenes perennes que oscilan entre 0.5 y 1.5 metros de altura en sus primeros dos años (Barnes y Ordóñez, 2012, p.11). Puede generar 100.000 semillas que pueden ser propagadas con el viento. Al mismo tiempo, se reproducen mediante fragmentos vegetales desglosados de la planta, por lo tanto sus raíces logran expandirse brevemente, cambiando la disponibilidad del agua en el suelo (Caballer, 2012). Actualmente, los métodos empleados para el control de esta maleza causan efectos secundarios como el deterioro del hábitat y pérdida de ciertas especies como anfibios y reptiles en la naturaleza. La composición microbiana del suelo se ve alterada por el uso desordenado de herbicidas, utilizados en el control de esta maleza, ya que estos químicos son productos que se acumulan en el suelo disminuyendo los nutrientes presentes en el mismo (Bórtoli, Verdenelli, Conforto, Vargas Gil, y Meriles, 2012, p. 33).

## 1.3 Justificación

Las plantas del género *Cortaderia spp.* son consideradas hierbas invasivas o malezas en lugares como bosques debido a la velocidad en que se propagan y

al efecto que provocan en los hábitats naturales de ciertos países (Vourlitis y Kroon, 2013). Este tipo de planta es considerada altamente competitiva con otras especies propias de la zona ya que se extiende rápidamente y a su vez alteran la composición de nutrientes que se encuentran en el suelo, requeridos por otras especies de plantas (Peterson, Russo, y Invasive Species Team, 2014). Se propone el control biológico de esta maleza mediante el empleo de un hongo fitopatógeno (*Ustilago quitensis*) como un tema relevante de estudio; ya que es un método natural que forma parte del ecosistema y que no causa efectos secundarios, debido a que investigaciones anteriores muestran una estricta especificidad de los hongos carboneros en el hospedero (Hokkanen y Lynch, 2003). Por ejemplo: *Ustilago nuda* (carbón específico de la cebada), *Ustilago maydis* (carbón específico del maíz), *Ustilago avenae* (carbón específico de la avena), *Ustilago tritici* (carbón específico del trigo) (Villamizar y Caycedo, 2013). Así es posible comparar el efecto sobre el medio ambiente que tiene método natural con respecto a los métodos físicos, mecánicos y químicos. Por ejemplo, en el método químico se distinguen herbicidas que alteran la composición microbiana del suelo y disminuyen los nutrientes presentes en el mismo (Bórtoli et al., 2012, p. 34).

Existen alrededor de 1200 especies de hongos fitopatógenos que afectan a las semillas y se alimentan de los nutrientes de la planta (Muñoz, Galdames y Andrade, 2010, p. 51). El hongo fitopatógeno crece rápidamente causando la enfermedad del carbón que consiste en producir manchas necróticas, tizones, podredumbre, agallas y marchitamientos. Por ende, es perjudicial para la planta huésped. El tema se vuelve importante por la complejidad del ciclo de vida que se da en los hongos, los cuales se consideran parásitos y, dependen de las condiciones ambientales adecuadas para germinar.

## **1.4 Objetivos**

### **1.4.1 Objetivo general**

Evaluar el efecto biológico de *Ustilago quitensis* sobre la maleza *Cortaderia* (*Cortaderia jubata*).



#### 1.4.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración y tipo de esporas para la incidencia del hongo *Ustilago quitensis*.
- Determinar la acumulación de biomasa del hongo *Ustilago quitensis* en el ciclo de vida *in vitro*.
- Determinar la incidencia del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* en diferentes estructuras de la planta *Cortaderia jubata*.
- Establecer un protocolo para la determinación de la incidencia del hongo *Ustilago quitensis* como potencial agente de biocontrol.

## **2. Capítulo II. Marco Teórico**

### **2.1 Maleza Generalidades**

Las malezas son plantas que se desarrollan fuera de su sitio causando un daño a plantas nativas y hasta procesos industriales (Gómez, 1995). Muestran una gran capacidad de resistir periodos sin agua, también compiten en forma agresiva con los cultivos por factores como luz, espacio y nutrientes. Asimismo, producen una gran cantidad de semillas que se dispersan con ayuda del viento y de la lluvia; además de tener la capacidad de adaptarse a cambios de clima y temperatura. Estas son varias de las causas que dificultan el control del crecimiento de estas plantas.

El término maleza se puede aplicar a toda planta que provoca cambio perjudicial de la vegetación. Normalmente el crecimiento de maleza es inducido por el cambio de hábitat alterando la ecología de un sitio determinado (Labrada et al., 1996). Puede llegar inclusive a causar grandes daños como la extinción total de una o varias especies perdiendo su identidad genética y hasta pueden llegar a desaparecer.

Para el control de malezas se han empleado varios métodos que deben aplicarse previa investigación de varios factores que puedan afectar como condiciones de cultivo, tipo de suelo, eficiencia, daño causado y economía (Labrada et al., 1996).

#### **2.1.1 Cortaderia jubata**

El género *Cortaderia* comprende 24 especies gramíneas cespitosas vivaces distribuidas por Nueva Zelanda, Nueva Guinea y América del Sur (Gallastegui y Prieto, 2006, p. 31). Este género es considerado como especie exótica invasora en diferentes países, se caracteriza por poseer una atrayente y espesa inflorescencia llamada plumero, principalmente se distingue por un

color blanco amarillento y en ciertas ocasiones hasta rojizo que determina su estado de madurez. Su nombre *Cortaderia* deriva por la forma que presentan sus hojas ya que son largas y sus bordes son cortantes.



Figura 1. *Cortaderia Jubata* ubicada en la granja experimental de Nono (UDLA).



Figura 2. Inflorescencia enferma extraída del Parque lineal al sur de Quito.

## 2.2 Hongos fitopatógenos: Generalidades

Los hongos fitopatógenos son microorganismos que conforman el grupo más grande e importante a nivel mundial. Existen alrededor de 8000 especies de hongos catalogados por causar enfermedades en las plantas (Peña y Paéz, 2011).

Los hongos fitopatógenos actúan como control biológico, es así que deben abarcar investigaciones para determinar el nivel de interacción del hongo con su hospedero y con el medio ambiente. Sin embargo, los hongos carbonos muestran una estricta especificidad en el hospedero y por lo que se cotizan como agentes de control biológico (Hokkanen y Lynch, 2003). El nivel adecuado de la concentración de esporas y el método de formulación para regular la maleza dentro del agroecosistema (Motta y Ordoñez, 2014). La seguridad del uso de hongos fitopatógenos se basa principalmente en la especificidad y estabilidad del enfoque de los diferentes tipos de control biológico (Sánchez, 1999).

Los hongos fitopatógenos presentan dos tipos de reproducciones: asexual y sexual básicamente por medio de esporas, que con ayuda del viento se esparcen para continuar con el ciclo debido a que estos carecen de movimiento. Se encuentran encargados en el ecosistema de reciclar carbono, nitrógeno y minerales esenciales para la nutrición. Los hongos se consideran organismos heterótrofos porque se alimentan de materia orgánica sintetizada mediante toxinas y enzimas degradadoras de la planta, causándole daño. Sin embargo, existen hongos biótrofos que establecen íntimo contacto celular con el hospedero, pero muestra un mínimo daño en la planta (Peña y Paéz, 2011). Finalmente, existen hongos hemibiótrofos que muestran una fase inicial donde mantienen un tejido vivo y en la fase final existe una destrucción del tejido de la planta (Zamora, Martínez, y Guerrero, 2009).

Entre los grupos de hongos más sobresalientes encontramos al grupo de Basidiomycotina, los cuales se caracterizan por presentar: micelio con un septo

dolíporo complejo además ciertas especies se desarrollan a manera de esporas.

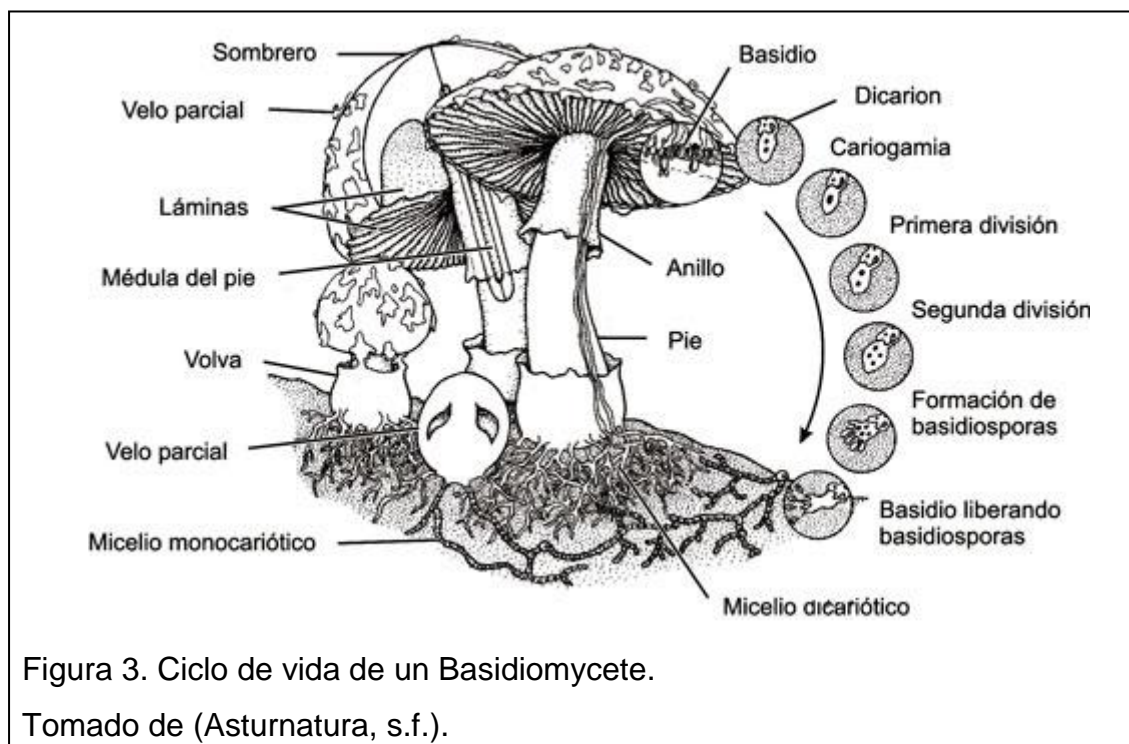


Figura 3. Ciclo de vida de un Basidiomycete.

Tomado de (Asturnatura, s.f.).

Adicionalmente, este grupo de hongos son haploides y poseen pared celular formada por quitina y glucanos. También, se reproducen de forma asexual y sexual. La reproducción asexual se atribuye a pequeñas estructuras conocidos como conidios, los cuales no se hallan presentes en todas las especies. Por otro lado, la reproducción sexual es el resultado de la acción de la fusión de hifas vegetativas a partir de dos cepas con un solo núcleo. Una vez las paredes se desintegren, los núcleos empiezan el ciclo de apareamiento, en consecuencia, se obtiene cada sección hifal con dos núcleos distintos. Al finalizar el proceso de reproducción se desarrolla un organismo nuevo o posiblemente una seta donde se despliega una serie de estructuras llamados basidios. Internamente en los basidios se localizan los núcleos fusionados, donde ocurre el proceso de meiosis. Posteriormente, se obtienen núcleos haploides que se trasladan hacia las basidiosporas en proceso. En efecto a partir de una fusión de núcleos se obtiene millones de esporas en esparcimiento genéticamente distintas (Alexopoulos y Constantine, 1979).

### 2.2.1 Desarrollo de infección de hongos fitopatógenos

Los hongos patógenos se ensamblan de varias formas a la superficie de la planta, algunos colonizan áreas superiores, otros infectan partes localizadas debajo del suelo. En todo caso, la penetración del hongo en la planta necesita del contacto y adherencia de las esporas. Un mecanismo hipotético es la segregación de enzimas que alteran la textura de la planta. Como segundo paso de la infección está la penetración del hongo en la planta que se da de forma mecánica, ya sea por la digestión causada por enzimas o por heridas naturales. Finalmente, está la colonización del tejido huésped que ocurre en cuatro mecanismos: liberación de enzimas degradativas, producción de toxinas que detienen el metabolismo de la planta, producción de compuestos hormonales que afectan el crecimiento de la planta y por último la interferencia que provoca el crecimiento del hongo (Rivera y Codina, 2010) .

#### Taxonomía

En la Tabla 1 se aprecia la división taxonómica del hongo *Ustilago quitensis*.

Tabla 1. Taxonomía *Ustilago quitensis*

<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Clase</b>	<i>Basidiomycotina</i>
<b>Subclase:</b>	<i>Teliomycetes</i>
<b>Orden</b>	<i>Ustilaginales</i>
<b>Género</b>	<i>Ustilago</i>
<b>Especie</b>	<i>U. quitensis</i>

Adaptado de: Alexopoulos y Constantine, 1979.

### **2.2.1.1 Clase: *Basidiomycotina***

Los grupos de hongos introducidos a los Basidiomycotina son: *Teliomycetes*, *Hymenomycetes* y *Gasteromycetes*. Las royas y carbones o también conocidos como tizones, son provenientes del grupo de hongos correspondientes a los *Teliomycetes* (Alexopoulos y Constantine, 1979).

#### **2.2.1.1.1 Características generales de *Teliomycetes***

Principalmente a este grupo de hongos pertenecen: hongos parásitos de vegetaciones conocidos como royas y carbones. Estos hongos fitopatógenos se destacan por la obtención de esporas, llamadas teliosporas, muy resistentes debido a que cuentan con pared gruesa. En las estructuras distinguidas como teliosporas se da el proceso de germinación donde se da lugar a un promicelio, el cual transcurre a un núcleo diplóide. Por lo tanto, el resultado de la germinación a partir de basidiosporas son las hifas que dan lugar a la aparición de esporas indirectas o de conidios. (Alexopoulos y Constantine, 1979).

#### **2.2.1.1.2 Orden: Ustilaginales**

En esta sección se distinguen los hongos causantes de la aparición de carbones, denominados así por la presencia de esporas en las inflorescencias de las plantas, los cuales dan a las terminaciones de las inflorescencias florales de la planta un aspecto negro y pulverulento. Habitualmente, encontramos a estos hongos fitopatógenos como hospederos de plantas vasculares existiendo una alta tendencia de infección en las gramíneas de la familia Poaceae y Cyperaceae. Por ejemplo: pastos forrajeros. Los carbones son frecuentemente específicos a un hospedero por lo que son cotizados como agentes biocontrol para pastos forrajeros (Hokkanen y Lynch, 2003). Además, se caracterizan por no contar con cuerpo fructíferos y por ser parásitos intercelulares. Este grupo de Ustilaginales está separado de los Uredinales por poseer un micelio monocariótico el cual sobrevive como saprófito, por lo tanto se considera un parásito sólo el micelio dicariótico (Asturnatura, s.f.).

El hongo *Ustilago quitensis* pertenece a la clase de *Basidiomycetes*. Estos hongos, se caracterizan por poseer una etapa dicariótica que es obligatoriamente parasitaria para la planta. El proceso de germinación de las esporas es rápido, se produce aproximadamente entre 7 a 10 días considerando que las temperaturas no se encuentren a menos de 20 °C ya que si no, la esporulación sería más lenta. Producen en primer lugar telioesporas que se localizan en la epidermis y basidiosporas que son lanzadas al medio externo cuando existe humedad. (Alexopoulos y Constantine, 1979).

### **2.3 Cinética de crecimiento**

El crecimiento microbiano es el incremento del número de microorganismos en un determinado tiempo. Los microorganismos crecen individualmente y se da lugar a la división celular para obtener aumento en la población (Salvucci, 2010).

#### **2.3.1 Fases de Crecimiento**

##### **2.3.2 Fase de latencia**

Es conocida también como fase de adaptación porque los microorganismos acoplan su metabolismo a la presencia de diferentes factores ambientales. En esta fase no existe un aumento en el número de células, debido a que los microorganismos están en proceso de adaptación y consumen los nutrientes lentamente, pero presentan acción metabólica en el desarrollo del tamaño individual de las células, como en el material genético y peso seco de las células (Salvucci, 2010).

##### **2.3.3 Fase logarítmica o exponencial**

En esta fase la velocidad de crecimiento de los microorganismos llega a ser máxima y el tiempo de reproducción es mínimo. Los microorganismos durante



esta fase se nutren de todos los alimentos que se encuentran en el medio enriquecido, acelerando el crecimiento de la masa celular (Salvucci, 2010).

### 2.3.4 Fase estacionaria

La fase estacionaria muestra una velocidad de crecimiento igual a cero. Se puede considerar que los microorganismos entran a esta fase por ausencia de algunos nutrientes indispensables para mantener su desarrollo y crecimiento (Salvucci, 2010).

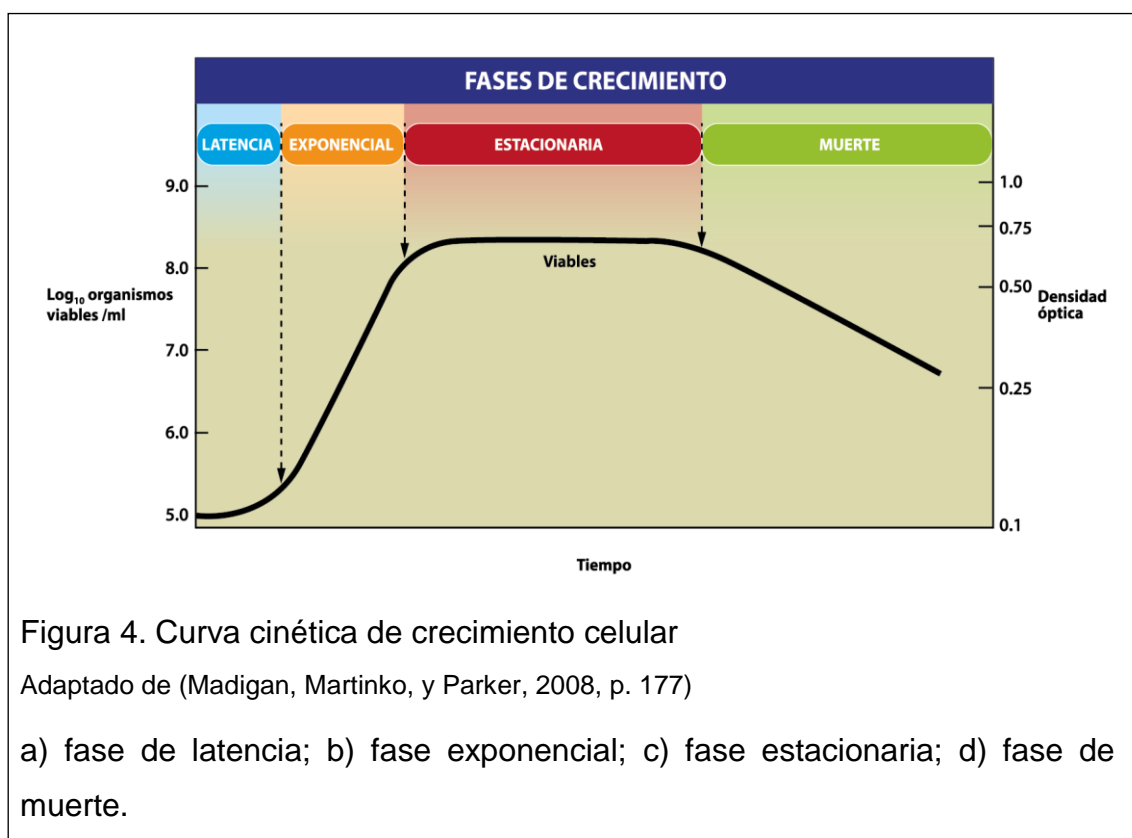


Figura 4. Curva cinética de crecimiento celular

Adaptado de (Madigan, Martinko, y Parker, 2008, p. 177)

a) fase de latencia; b) fase exponencial; c) fase estacionaria; d) fase de muerte.

### 2.3.5 Fase de muerte

En esta última fase los microorganismos tienden paulatinamente a disminuir el número de células viables y algunas células se mantienen metabolizando, pero ya no existe incremento de células. Es por eso, que entran a la denominada fase de muerte (Salvucci, 2010).

## **2.4 Condiciones de crecimiento de microorganismos**

### **2.4.1 Factores físicos y químicos**

Los microorganismos son agentes que se encuentran influenciados por factores físicos y químicos que son: temperatura, actividad de agua y pH (Alarcón y Oliva, 2001)

#### **2.4.1.1 Temperatura**

Los microorganismos están expuestos a diferentes temperaturas, pero crecen en una temperatura específica. Por lo tanto, la temperatura es un factor importante para el desarrollo del microorganismo es por eso que se busca la temperatura óptima. Los hongos *Ustilagos* necesitan de una temperatura adecuada para crecer y desenvolverse en el ambiente que va entra entre los 25 °C y 30 °C (Alarcón y Oliva, 2001).

#### **2.4.1.2 Actividad de agua (aw)**

La actividad de agua es otro requisito influyente en la velocidad de crecimiento de los microorganismos. Se denomina como actividad de agua ya que intervienen conjuntamente la presión de agua de substrato de cultivo y la presión de vapor de agua del agua pura. Por ende, el valor de la actividad del agua está estrechamente relacionado con la humedad relativa.

El resultado de conocer la actividad de agua ayudará a obtener la cantidad de agua necesaria metabólicamente para cada microorganismo. Es así que los hongos filamentosos, como los *Ustilagos*, se ven afectados por la actividad del agua en el crecimiento y en la formación de productos (Toledo, 2008).

## **2.5 Métodos de control de maleza**

En los últimos años se han utilizado métodos tradicionales para el control integrado de malezas como método químico y método mecánico (Bárberi, 2001). Mientras tanto el método biológico está siendo empleado en el control integrado de malezas debido a que este método emplea agentes, por ejemplo: hongos, bacterias, nemátodos y ácaros, los cuales no son perjudiciales para el medio ambiente y atacan a la planta parasitándolas, depredándolas u ocasionando molestias a los insectos plaga (Sarayasi, 2012).

### **2.5.1 Control biológico**

El control biológico es la acción de parásitos, depredadores o patógenos que mediante su actividad reducen los efectos adversos de otra especie (Alston, 2011, p. 1). La formulación de esporas y micelio que infecta específicamente a una maleza se conoce como control biológico, que busca reducir las densidades de malezas a niveles aceptables mediante microorganismos específicos, que se aplican en 3 tipos de métodos:

El primer método usa enemigos específicos que atacan una o varias especies en particular. Después tenemos el uso de microorganismos no específicos que atacan a todas o algunas de las especies. Finalmente, está el método que aplica especies de plantas competitivas, las cuales disputan con la maleza por varios factores de crecimiento como luz y agua (Gioanetto y Cerna, 1996).

Además, se distingue dos enfoques principales, guiándose en el objetivo y el origen de la maleza:

Enfoque clásico: analiza los enemigos naturales de una plaga específica, habitualmente se los encuentra en la zona de origen, el objetivo es autorregular constantemente la población de malezas y aprovechar la habilidad innata del organismo (Viñuela y Jacas, 1993, p. 24).

Enfoque inundativo: aumento de microorganismos de forma artificial por medio de tecnología, por ejemplo, en un laboratorio utilizando medios de cultivos (Gioanetto y Cerna, 1996).

### **2.5.2 Método químico.**

Este método consiste en el uso de sustancias químicas o herbicidas que sean capaces de inhibir la germinación y el crecimiento de las malezas, ya sea de forma total o parcial.

Los herbicidas necesitan tener un adecuado manejo y conocimiento acerca de la aplicación y los efectos en el medio ambiente. Algunos herbicidas se aplican en presembrado (controla el barbecho), preemergencia (controlan que las semillas germinen) o postemergencia (controla plantas que ya han brotado). La desventaja de usar repetitivamente un herbicida es que algunas especies de maleza adquieren resistencia (Labrada y Parker, 1994, p. 16). Otra desventaja de los herbicidas son los factores ambientales consecuencia de la fijación de los herbicidas en el suelo, entre estos se encuentra: descomposición química, lixiviación, volatilización y adsorción por partículas del suelo. Los herbicidas se clasifican de acuerdo al proceso fisiológico sobre el que actúa por lo que se dividen en seis grupos: inhibición de la fotosíntesis, inhibición de síntesis de ADN, inhibición de la respiración, la inhibición de la formulación de ATP, inhibición de la germinación y la inhibición de la formación de raíces, membranas y proteínas (Villanueva, 2002).

El glifosato es un ingrediente activo en los herbicidas no selectivos, su principal función es inhibir la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) clave en la ruta metabólica de producción de aminoácidos aromáticos que son esenciales para el crecimiento y supervivencia de la planta (ArgenBio, s.f.). El glifosato muestra varias desventajas tanto en el medio ambiente como en la salud de los seres humanos, por ejemplo: la contaminación de aguas, depreciación en la supervivencia de algunos artrópodos, anfibios y peces afectando la cadena trófica. Además de afectar la salud de las personas como

la capacidad de reproducción, cáncer y hasta problemas neurológicos por la exposición directa al producto de agricultores y habitantes de la zona (ArgenBio, s.f.). Sin embargo, el tema de la toxicología del glifosato es un debate sin resolver hasta el día de hoy que necesita obtener más información porque existen diferentes criterios. La Agencia de Protección Ambiental (EPA) clasifica a los plaguicidas con glifosato como Clase II siendo altamente tóxico, mientras que la Organización Mundial de la Salud lo clasifica como Clase I siendo extremadamente tóxico. Finalmente, los investigadores independientes a través de investigaciones demostraron que no es tóxico (Iñiguez y Gallo, 2010).

### **2.5.3 Método mecánico.**

En este método son empleados la limpieza manual y manejo de herramientas manuales que facilitan cortar la maleza. Entre las herramientas utilizadas están el rodillo de cuchillas, el machete y un mecanismo más sofisticado como el uso de una máquina motorizada manual. Otra forma de aplicar el método mecánico es realizar una supervisión cada cierto tiempo para ir eliminando la maleza de forma manual (Labrada, 2008, p. 61).

Existen también los métodos culturales que se basan en la preparación del suelo mediante la labranza, tomando en cuenta técnicas para preservar la fertilidad del suelo y no afectar el mismo conjuntamente con el método mecánico. Sin embargo, esta técnica aumenta los problemas con la maleza (Labrada, 2008, p. 61).

### **2.5.4 Método térmico.**

El método térmico es uno de los métodos más usados en la antigüedad, se basa en el uso de quemadores a base de gas, propano o butano. Usa una temperatura de alrededor de 90 a 100 °C. Existen ciertas desventajas con el uso de este método como el incremento del pH del suelo, la destrucción por el

fuego sin control de otras plantas y el gran costo económico y energético (Bárberi, 2001).

## **2.6 Técnica para identificación de esporas**

### **2.6.1 Determinación de la concentración de conidios**

Es una técnica cuantitativa que establece la cantidad de conidios del hongo en la muestra. Se realiza con ayuda de la cámara de Neubauer y del microscopio óptico.

### **2.6.2 Cámara de Neubauer**

Es una técnica de recuento de conidios se basa en el conteo de partículas en los 5 cuadros grandes de la cámara de Neubauer Improved y se aplica la fórmula para el cálculo de la concentración celular (MARIENFELD, s.f.)

$$\text{Concentración (cel / mL)} = \frac{\text{número de células}}{\text{Volumen (en mL)}} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

### **2.6.3 Diluciones seriadas**

La dilución es una disolución de menor concentración de aquella de la que partimos (Jara, Jimenez, y Gomez Peña, 2013). Es el método más usado para el aislamiento de hongos, iniciando de una solución madre que consiste en tomar 5 g de la muestra y diluirlo en 100 mL de medio PDB. A partir de esta se prepara diluciones en serie ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ). Inicia con la dilución  $10^{-1}$  se toma 1 mL de la solución madre transfiriendo a un tubo que contiene 5 mL de medio PDB y así sucesivamente hasta obtener una dilución de  $10^{-4}$ , para el conteo de esporas se toma una cantidad de 10  $\mu$ L para la cámara de Neubauer (Granda, 2008, p. 26).

#### **2.6.4 Peso seco**

La biomasa hace referencia a los microorganismos presentes en un sistema. Se puede usar para determinar la cantidad de masa de seres vivos usados principalmente en bioprocesos. El peso seco permite establecer el número de células en una muestra siendo útiles para enumerar organismos como bacterias o levaduras, así como también hongos filamentosos que son difíciles cuantificar (Arnáiz, Isac, y Lebrato, 2000, p. 45).

Para medir el peso seco se utiliza el término de peso seco por unidad de volumen, bien sea como sólidos en suspensión totales (SST) o sólidos en suspensión volátiles (SSV). La centrifugación es el método más usado para separar el líquido del sólido expresándose en g.m.s/mL (Arnáiz et al., 2000, p. 45). Esta técnica muestra ciertas desventajas porque además de la determinación de organismos vivos, también toma en cuenta el peso de organismos muertos y materia orgánica. Además, se debe tener sumo cuidado al momento del pesaje porque puede recobrar humedad dependiendo del sitio.

### 3. Capítulo III. Metodología

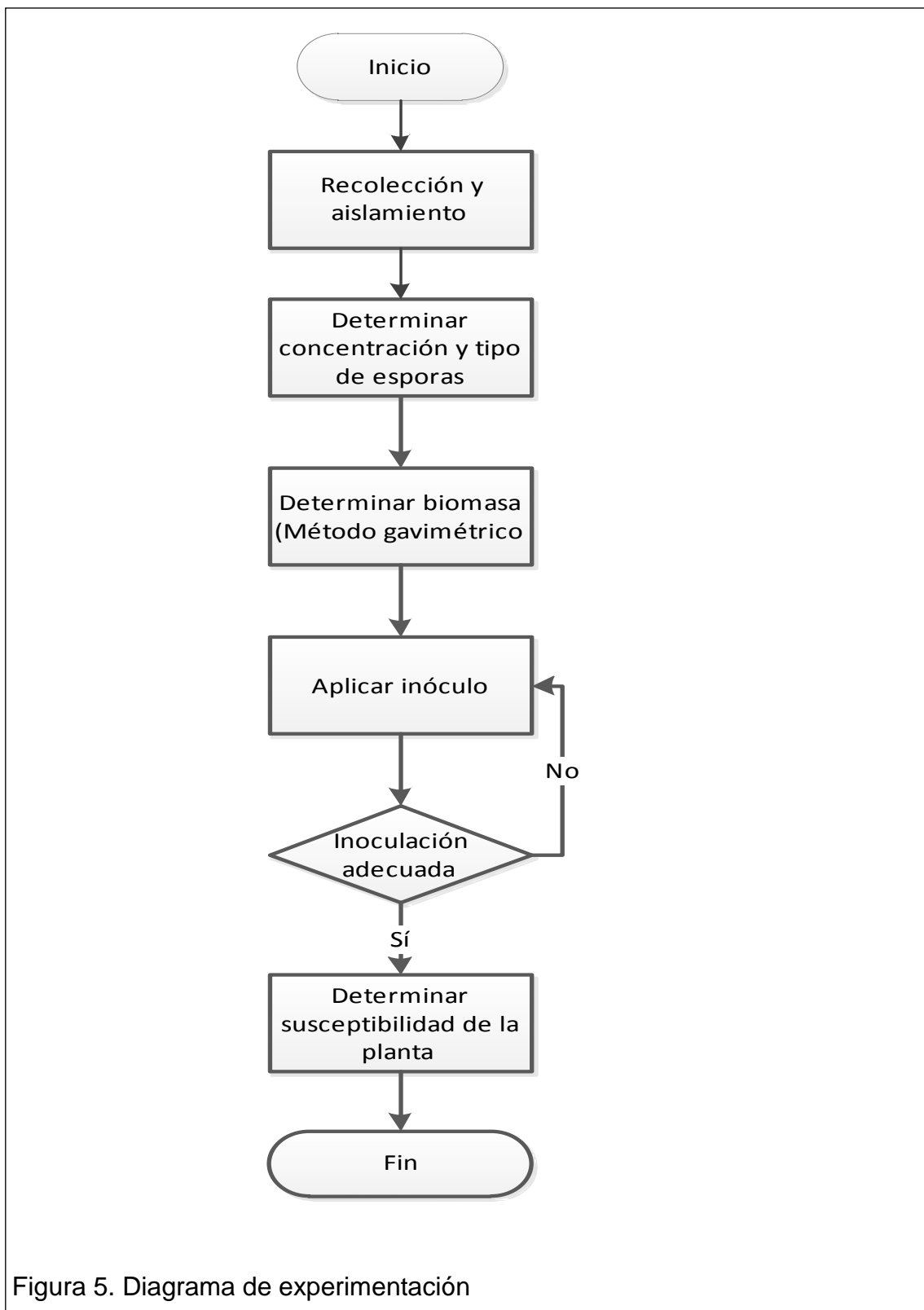


Figura 5. Diagrama de experimentación



## 2.7 Detalle de experimentos

Se realizó el análisis de experimentos mediante el empleo de estadística descriptiva basada en los promedios de las variables. Las variables cualitativas evaluadas fueron la forma y el color del hongo fitopatógeno. Adicionalmente, las variables cuantitativas analizadas fueron: el crecimiento micelial determinado mediante la longitud del diámetro (cm) en los medios nutritivos. Concentración de esporas y la acumulación de biomasa del hongo *Ustilago quitensis* en medio líquido. En cuanto a la virulencia del hongo en diferentes estructuras de la planta, se propuso un diseño factorial completamente al azar  $2^2$  de dos factores: dos niveles de temperatura de 25 °C y 30 °C y dos niveles con presencia de fungicida Benomil y el control en ausencia de Benomil, donde se evaluó el crecimiento de la cepa extraída del Parque Lineal, Cantón Quito. Se utilizaron dos métodos, el primero por aspersión de esporas y el otro método directo. Se aplicó análisis estadístico con ANOVA para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos empleados en las plantas y se representó en porcentajes la incidencia del hongo *Ustilago quitensis* sobre la planta *Cortaderia jubata*.

## 2.8 Aislamiento y cultivo del hongo

### 2.8.1 Recolección de muestras

Las muestras fueron recolectadas en el Parque Lineal en la Provincia de Pichincha Cantón Quito ubicado a 2.800 msnm.

### 2.8.2 Selección de muestras y almacenamiento

Las muestras tomadas para el proceso de experimentación fueron de plantas con inflorescencias de color verdoso y plantas con inflorescencias no secas. A continuación, las muestras extraídas fueron colocadas en tubos de 15 mL y microtubos de 1.5 mL. Posteriormente, se trasladaron las muestras al Laboratorio del Centro de Investigación, Estudios y Desarrollo de Ingenierías, localizado en la Universidad de las Américas, donde se almacenaron a 4 °C.

### **2.8.3 Microorganismos**

Se utilizó para el estudio a un hongo fitopatógeno nativo, extraído de las inflorescencias de la maleza *Cortaderia jubata*. Fueron aislamientos nativos localizados en el Cantón Quito, estos fueron denominados M4.

### **2.8.4 Activación de la cepa**

Se obtuvo ejemplares de plantas infectadas procedentes de áreas ecuatorianas. A continuación, en la activación de la cepa nativa se colocó una pequeña porción de inflorescencia en 1 mL de agua esterilizada en tubos de 1.5 mL. Posteriormente se tomó 1 mL de la mezcla, se dispensó en cajas Petri compuestas por PDA (Potato Dextrose Agar) de marca Difco y fueron incubadas a 25 °C durante tres días.

### **2.9 Inoculación del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* en medio sólido a diferentes temperaturas.**

Se inoculó la cepa M4 a distintas temperaturas de 25°C y 30°C durante 3 días. Al finalizar el tiempo de incubación se analizó en el estereomicroscopio las placas inoculadas donde se observó parámetros como: crecimiento micelial (cm) y coloración.

### **2.10 Identificación morfológica del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis***

Se preparó una suspensión de esporas, a partir de la muestra colectada de la cepa M4. En un microtubo con 1 mL de la solución de Tween al 0.1 %, se colocó una porción de hongo y se agitó ligeramente para separar las esporas. Inmediatamente se cargó la cámara de Neubauer y se contó el número de esporas bajo el microscopio. Se realizó una segunda dilución, tomando 100 µL de la solución anterior y se agregó 900 µL de agua destilada. Posteriormente se sembró 100 µL de concentración deseada en una caja Petri con medio PDA y se esparció con la espátula de Drigalski. Finalmente se incubó a 25 °C por 5 días (Ames y Cañedo, 2004).

### 2.10.1 Medición del crecimiento micelial del hongo fitopatógeno

Se inoculó la cepa M4 en medios sólidos con diferente composición a 25 °C. A continuación, en la Tabla 2 se muestra los compuestos que forman los diferentes medios sólidos. Se midió el crecimiento micelial en cm cada dos días durante 8 días como:  $t_0$ ,  $t_2$ ,  $t_4$ ,  $t_6$  y  $t_8$ , para la observación y medición del crecimiento micelial de la longitud del diámetro en cm (Gaitán y Báez, 2008).

Tabla 2. Composición de los diferentes medios sólidos

Cepa M4	
Composición	
Medio 1	Medio 2
PDA+	PDA+
Estreptomicina	<i>Estreptomicina+</i>
	Benomil

### 2.10.2 Identificación de las estructuras reproductoras

Se observó en el microscopio el tipo de esporas que produce la cepa denominada M4 extraída del Parque Lineal en Quito. Se tomó cinta adhesiva y se colocó sobre un pedazo de inflorescencia infectada para extraer esporas. Se procedió a colocar una gota de safranina sobre el portaobjeto y la cinta adhesiva sobre la gota para observar en el microscopio (Cáceres, Pumisacho, Forbes, y Andrade, 2007).

### 2.10.3 Cuantificación de la concentración de esporas mediante el método de Neubauer.

Se empleó la cámara de Neubauer MARIENFELD-SUPERIOR, para determinar la concentración específica del número de esporas por mililitro.

#### **2.10.4 Diluciones seriadas**

Se colocó 1g de esporas en 1.5 mL de agua estéril, se tomó 1 mL de solución de esporas en 9 mL de medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth) de marca Difco en un tubo de ensayo y se homogenizó por dos minutos. Luego se procedió a preparar las diluciones seriadas en tres tubos de ensayo con diferente factor de dilución ( $F_1=10^{-5}$ ,  $F_2=10^{-10}$ ,  $F_3=10^{-15}$ ) que contenían 9 mL de medio líquido cada tubo y se colocó 1 mL de la solución madre. Se esperó 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se puso 1 mL de medio inoculado en cajas Petri con medio PDA a 25 °C durante 5 días y se hizo el recuento de placas (Solano, 2005, p. 14).

### **2.11 Determinación de Biomasa del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis***

#### **2.11.1 Preparación del medio líquido**

Se utilizó PDB de marca Difco para la preparación de medio líquido, se autoclavó los medios a 125 °C a 1.5 psi por 120 minutos. Consecutivamente, a los medios autoclavados se adicionó antibiótico (Estreptomycin). Finalmente se colocó un 1 mL de la cepa M4 por 24 h.

#### **2.11.2 Determinación de acumulación de biomasa**

##### **2.11.2.1 Preparación de pocillos para peso seco**

Se preparó 21 pocillos con papel aluminio, los cuales fueron previamente enviados a secar en la estufa a 105 °C por un lapso de 12 horas o hasta alcanzar peso constante. Inmediatamente, los pocillos fueron rotulados y pesados en una balanza analítica, se anotó el peso del recipiente con tres decimales.

### **2.11.2.2      Peso seco**

Se preparó 21 tubos de ensayo con un volumen de 9 mL de medio líquido. Seguidamente, se tomó 1mL de la muestra inoculada anteriormente en matraz y se ubicó en los tubos de ensayo. Se tomó las muestras cada 24 horas por 5 días, de cada tubo de ensayo se obtuvo 4 mL destinados a centrifugar por 8000 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante, se continuó con otro lavado y nuevamente se centrifugó por 10 minutos. Finalmente, el pellet se resuspendió y fue colocado en un pocillo, para luego ser ubicado en la estufa a 105 °C por 12 h. Luego del período de secado, el pocillo fue pesado y se anotó su peso colaborando a calcular la concentración final de la muestra (O'toole, 1983, p. 506).

### **2.12 Determinación de la incidencia en diferentes partes de la planta**

#### ***Cortaderia jubata***

Se utilizó la cepa identificada M4 como el hongo *Ustilago quitensis*. Se empleó dos métodos. El primer método por aspersión, consistió en colocar esporas diluidas (conidios/uL) en agua para ser aspergidas en las hojas e inflorescencias de la planta. El segundo método es el denominado directo, consiste en colocar la mayor concentración obtenida de biomasa del hongo fitopatógeno mediante el empleo de una inyección, se insertó en el envés de la hoja y en la inflorescencia de la planta *Cortaderia jubata*. (Guevara y Estrella, 2008)

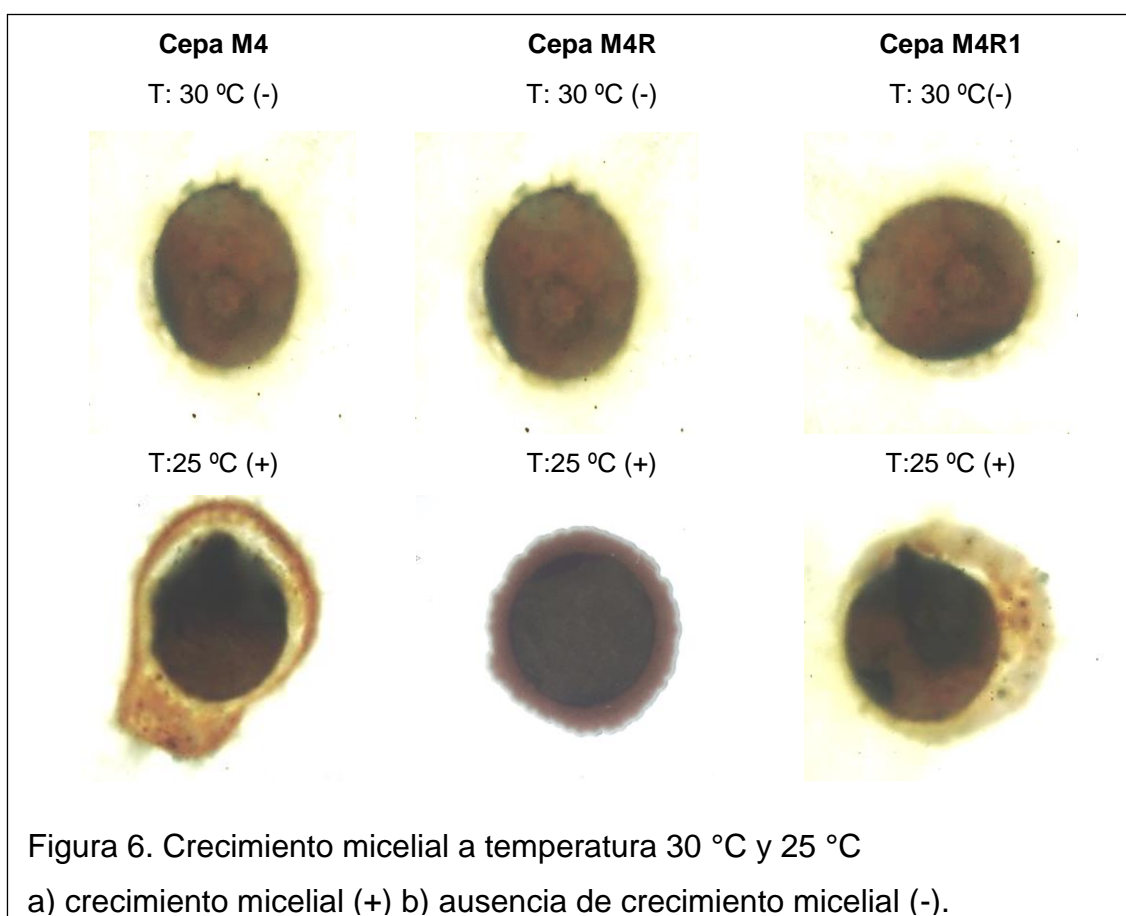
## 4. Capítulo IV. Resultados y Discusión

### 3.1 Determinación de la temperatura en el crecimiento de las cepas

Se observó la influencia de la temperatura en el modo de crecimiento del hongo fitopatógeno Tabla 3 y Figura 6, registrado a los 3 días de haber sido inoculado. Las temperaturas estudiadas fueron 25 °C y 30 °C, presentando a 25 °C, un crecimiento micelial (+), con una coloración café oscuro y forma regular, compuesto por la presencia de hifas y esporas, color café oscuro y negro, mientras que a 30 °C no se presentó el micelio (-).

Tabla 3. Crecimiento micelial *in vitro* del hongo *Ustilago quitensis* a dos temperaturas en medio PDA.

Cepa M4	Repeticiones		
Temp	M4	M4R	M4R1
T1:30 °C	-	-	-
T2:25 °C	+	+	+



En los medios nutritivos sólidos, el crecimiento micelial se observó a los 3 días, visualizando crecimiento a 25 °C, mientras a 30 °C no se apreció nada de crecimiento. El análisis revela que la temperatura es un factor relevante en la propagación de los microorganismos, ya que cada microorganismo crece a una temperatura definida. Es por eso, que se busca la temperatura específica del microorganismo (Alarcón y Oliva, 2001). El estudio realizado logró determinar que el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* es a 25 °C, ya que a 30 °C existió ausencia de crecimiento micelial.

### 3.2 Descripción morfológica del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis*

En la morfología de los micelios de la cepa M4 de *Ustilago quitensis*, fue similar entre ellos. Por lo que, en el micelio se observó un color café oscuro en la parte interna mientras que la parte externa era un color blanco, colores característicos de los hongos fitopátogenos del género *Ustilago* como se representa en la Figura 7. La apreciación se llevó a cabo empleando medio sólido PDA con antibiótico (Estreptomicina) donde el hongo se desarrolló fácilmente (Menéndez, 2007).

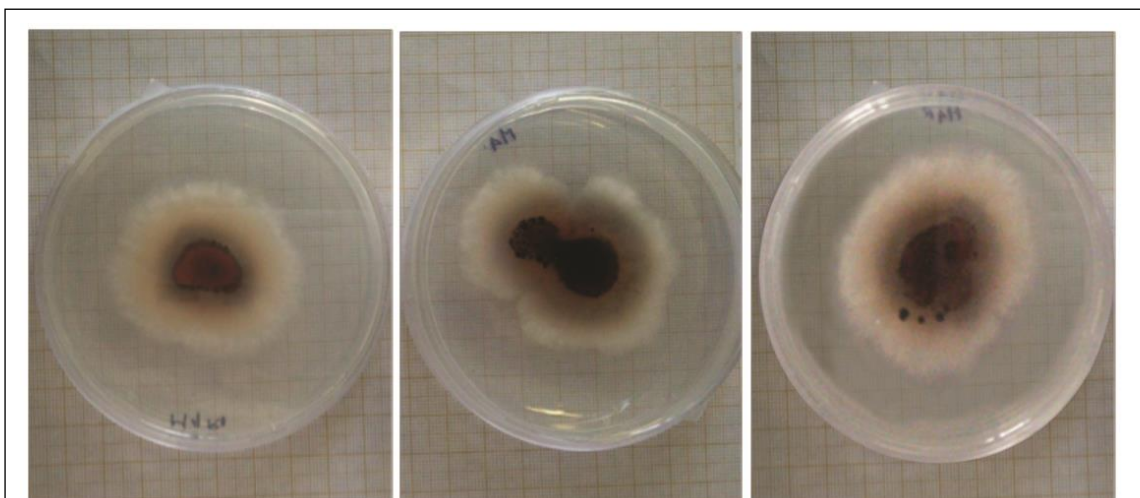


Figura 7. Placas PDA con antibiótico (Estreptomicina) distinguiendo características como: Color y crecimiento del hongo *Ustilago quitensis*.

### 3.2.1 Descripción de las estructuras reproductivas del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis*

*Ustilago quitensis* está formado por telioesporas y basidioesporas las cuales fueron identificadas y medidas en el microscopio como se observa en la Figura 8. Estas estructuras presentan una coloración en la parte central café oscuro rodeada por un café más oscuro.

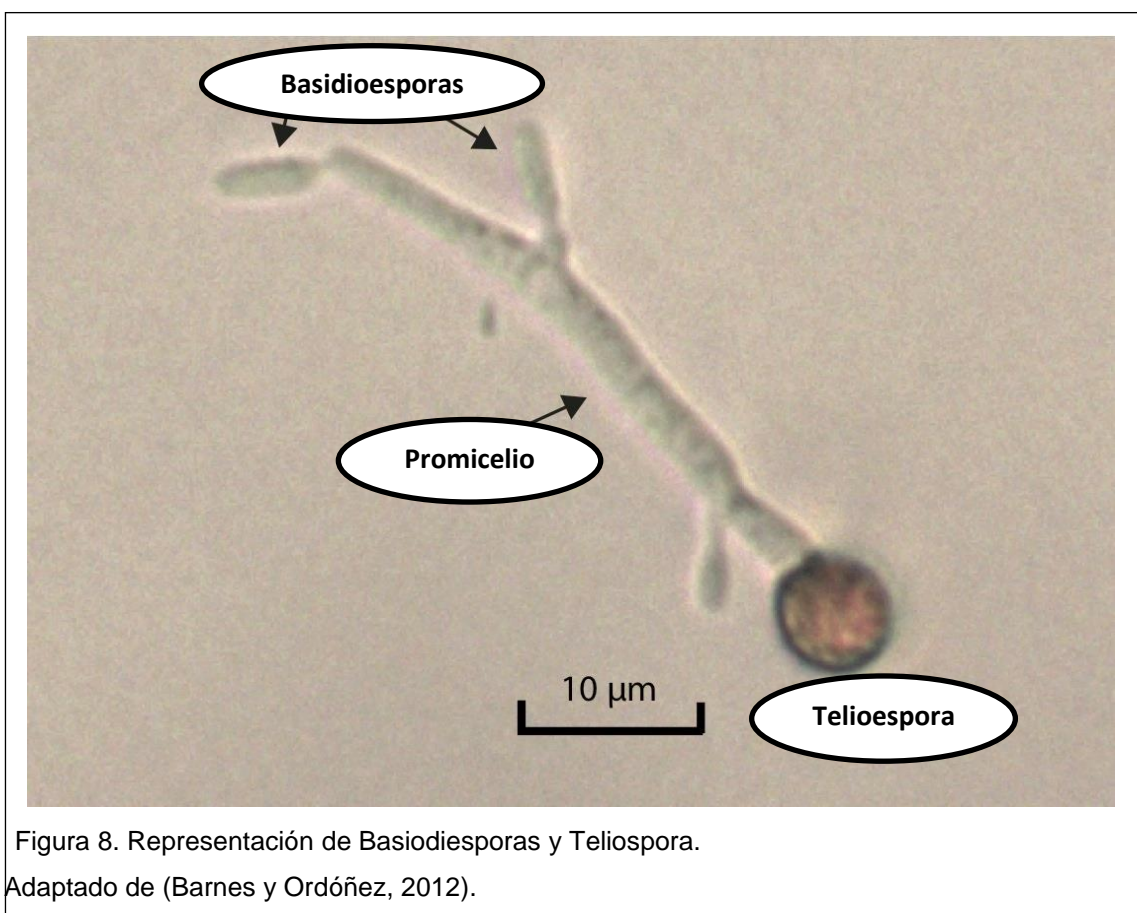


Figura 8. Representación de Basidiosporas y Teliospora.

Adaptado de (Barnes y Ordóñez, 2012).

En el proceso de germinación es posible apreciar estructuras tales como: teliosporas las mismas que dan lugar a un promicelio, el cual trasciende a un núcleo diploide. Por lo tanto, el efecto de la germinación a partir de basidiosporas son las hifas que dan lugar a la aparición de conidios. (Alexopoulos y Constantine, 1979). Los resultados muestran cada una de las partes que trascienden en el proceso de germinación, identificando a las teliosporas por su forma redonda y coloración café oscura. Por otro lado, las basidiosporas poseen una forma ovalada y de color café claro.



Se observó la presencia de una gran cantidad de teliosporas presentadas en la Figura 9 y Figura 10.

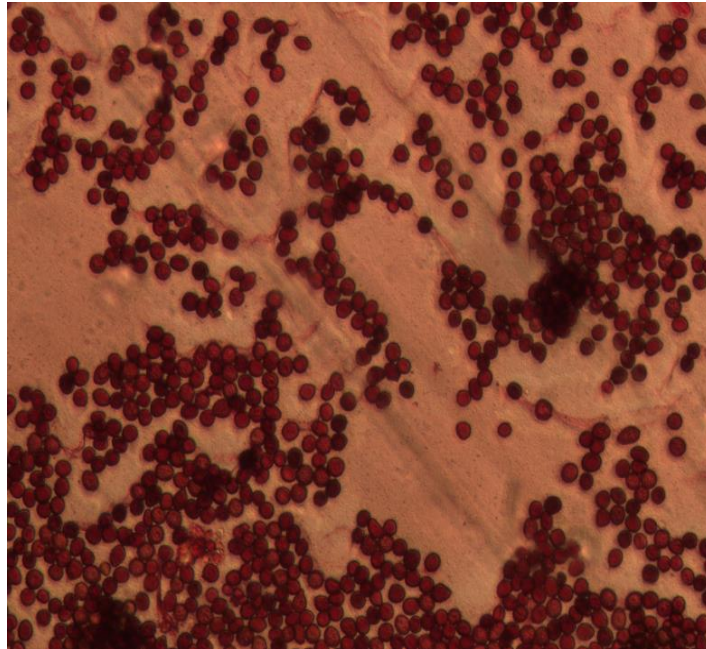


Figura 9. Teliosporas utilizando tinción de esporas con safranina.

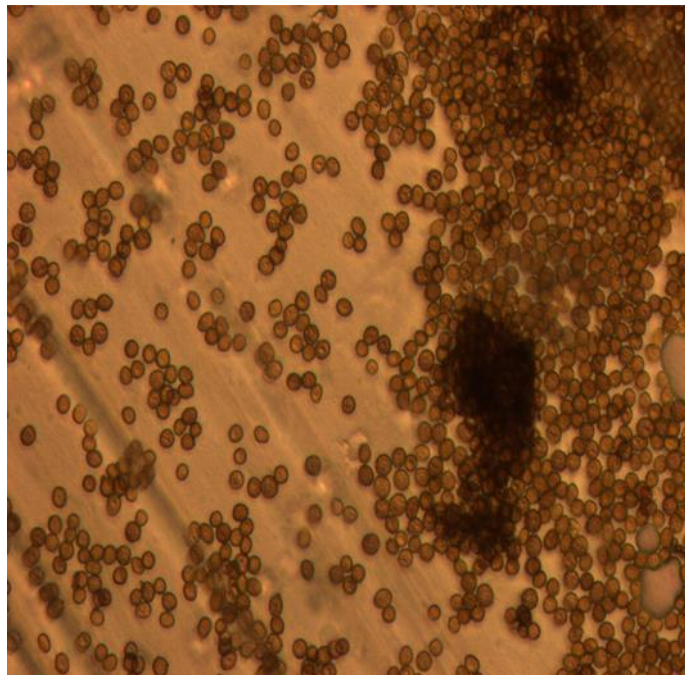


Figura 10. Teliosporas apreciadas en el microscopio marca Olympus con el lente 10X.

En primer lugar, las telioesporas son estructuras situadas en la epidermis. En segundo lugar, se producen basidioesporas que son esparcidas al medio externo cuando existe humedad, disminuyendo su alcance (Alexopoulos y Constantine, 1979). En consecuencia, los resultados indican la gran cantidad de telioesporas formadas en el proceso de germinación después de 24 horas de haber sido inoculadas.

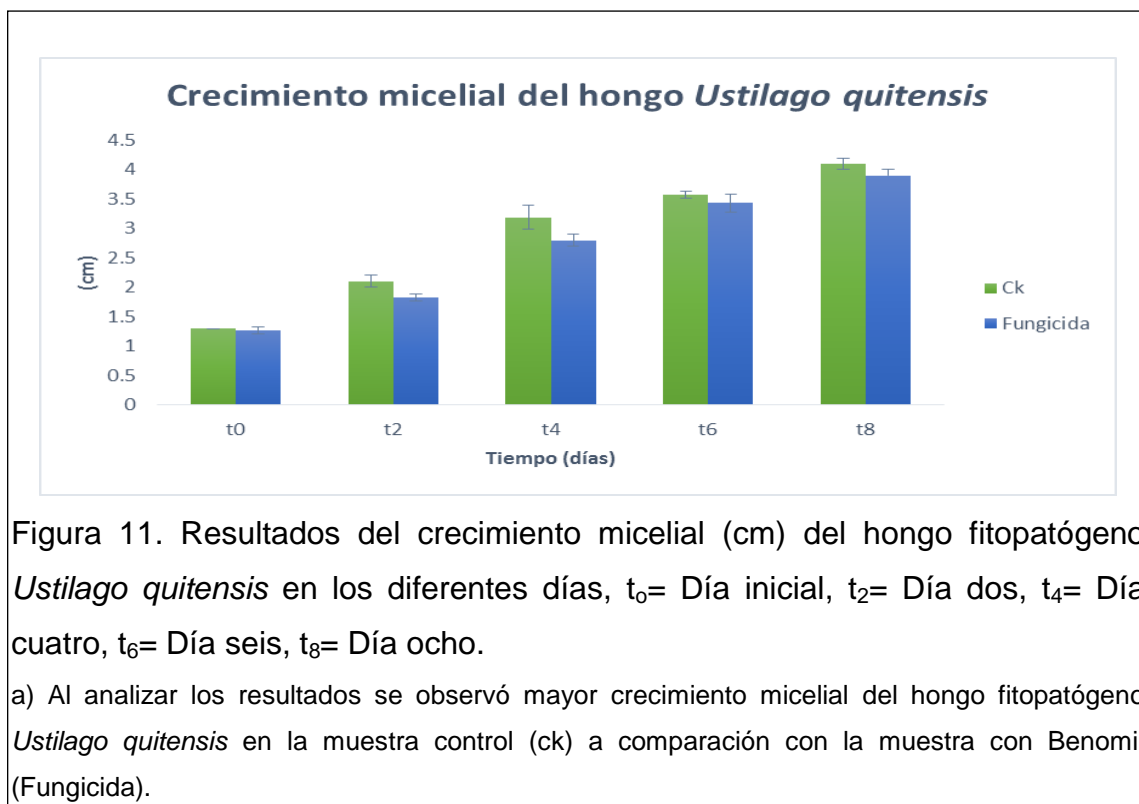
### 3.2.1.1 Determinación del área de propagación

Se trabajó una cepa M4 recolectada en el Parque Lineal. Para cada análisis se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento en 8 días. En la Tabla 4 se detalla la longitud del diámetro (cm) del crecimiento micelial en los tratamientos y en la Figura 11 se distingue el crecimiento micelial en cm aplicando el gráfico de barras.

Tabla 4. Representación del crecimiento micelial de la cepa M4 en cm durante 8 días

Tratamientos	Ck			Media	Desv. Est	Fungicida			Media	Desv. Est
	Repeticiones					Repeticiones				
$t_0$	1.3	1.3	1.3	1.30	0.00	1.2	1.3	1.3	1.26	0.06
$t_2$	2	2.1	2.2	2.10	0.10	1.8	1.8	1.9	1.83	0.06
$t_4$	3	3.2	3.4	3.19	0.20	2.7	2.8	2.9	2.80	0.10
$t_6$	3.5	3.6	3.6	3.57	0.06	3.3	3.4	3.6	3.43	0.15
$t_8$	4	4.2	4.1	4.10	0.10	3.9	3.8	4	3.90	0.10

Nota:  $t_0$ : Día inicial,  $t_2$ : Día dos,  $t_4$ : Día cuatro,  $t_6$ : Día seis,  $t_8$ : Día ocho). Se simboliza con las siglas: ck: Muestra control, Fungicida: Muestra con Benomil.



### 3.2.1.1.1 Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial

En las muestras inoculadas se utilizó al fúngico Benomil como agente inhibitorio micelial. Años atrás el Benomil era nombrado por su aplicación a los grupos taxonómicos del Reino Fungi. Es decir, el fúngico se ha recomendado para disminuir la propagación de ciertas familias de hongo. Es así el caso que inhibe el crecimiento de hongos pertenecientes al grupo de *Ascomycetes*, mientras que en el grupo de *Basyomicetes* es mínima la inhibición que se genera en el crecimiento micelial. Por lo cual, este tipo de fungicida es aplicado en medios selectivos de hongos (Summerbell, 1993, p. 572). En la Figura 12 refleja que con el uso del fúngico Benomil efectivamente el porcentaje de inhibición es mínimo en el crecimiento micelial de este tipo de hongo fitopatógeno. En la Tabla 5 se observa el crecimiento micelial de la cepa M4 midiendo la longitud del diámetro en cm durante 8 días (t<sub>0</sub>: Día inicial, t<sub>2</sub>: Día dos, t<sub>4</sub>: Día cuatro, t<sub>6</sub>: Día seis, t<sub>8</sub>: Día ocho), los tratamientos se simbolizan con las siglas: ck: Muestra control, Fungicida: Muestra con Benomil. El porcentaje

de inhibición de crecimiento micelial se obtuvo mediante la aplicación de la ecuación 2. En la Figura 12 se detalla el porcentaje de inhibición, es decir el fungicida Benomil no actúa como un agente inhibitorio sobre el grupo de *Basyomicetes*.

### Ecuación de inhibición de crecimiento micelial

$$M1 = \left[ \frac{(Mb - Ma)}{Mb} \right] \times 100 \quad \text{(Ecuación 2)}$$

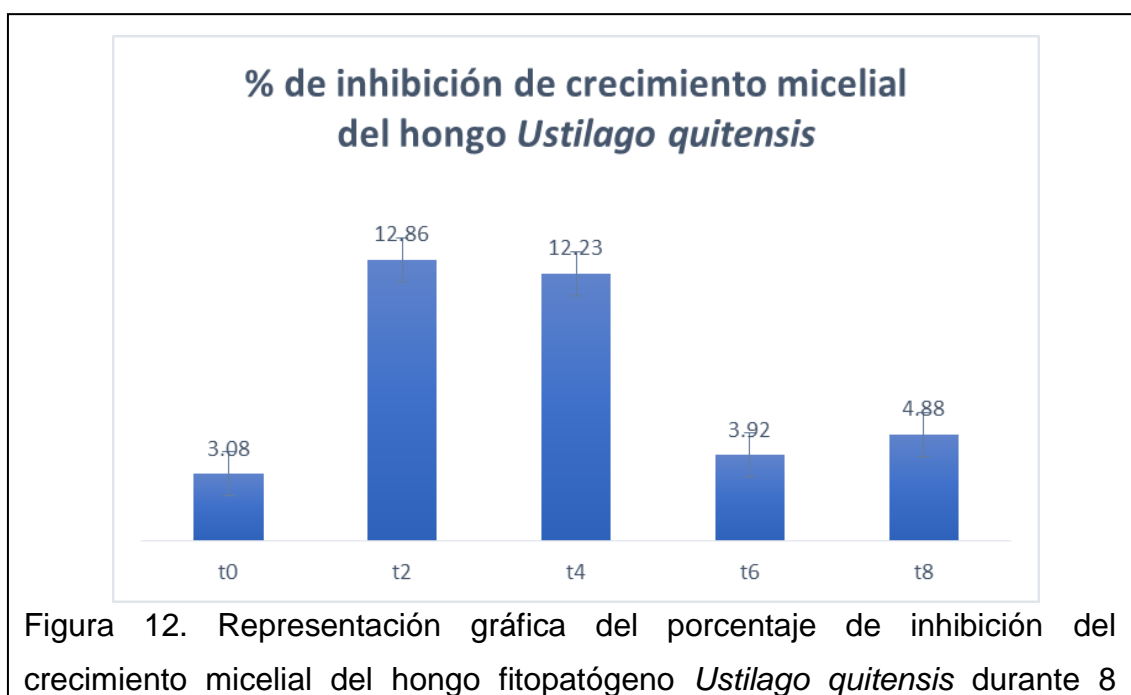
M1: Inhibición del crecimiento micelial

Ma: Crecimiento micelial influenciado (Fungicida)

Mb: Crecimiento micelial libre (Ck)

Tabla 5. Representación del crecimiento micelial midiendo la longitud del diámetro en cm durante 8 días.

Tiempo (Días)	Mb: Ck (cm)	Ma: Fungicida (cm)
t <sub>0</sub>	1.30	1.26
t <sub>2</sub>	2.10	1.83
t <sub>4</sub>	3.19	2.80
t <sub>6</sub>	3.57	3.43
t <sub>8</sub>	4.10	3.90



## Análisis estadístico

Tabla 6. Análisis estadístico  $T \leq t$  del crecimiento micelial durante 8 días con los tratamientos: (ck: Muestra control) y (fungicida: Muestra con Benomil).

Tiempo	Ck (cm) Media	Fungicida (cm) Media	ValorP( $T \leq t$ ) dos colas	Resultados estadísticos
t0	1.3	1.26	0.422	No hubo diferencias significativas en el crecimiento micelial de <i>Ustilago quitensis</i> entre los tratamientos: (ck: Muestra control) y (fungicida: Muestra con Benomil) al tiempo inicial.
t2	2.1	1.83	0.028	Existe diferencias significativas en el crecimiento micelial de <i>Ustilago quitensis</i> en los tratamientos a los 2 días.
t4	3	2.8	0.053	No hubo diferencias significativas en el crecimiento micelial de <i>Ustilago quitensis</i> en los dos tratamientos a los 4 días.
t6	3.5	3.43	0.252	No hubo diferencias significativas en el crecimiento micelial de <i>Ustilago quitensis</i> en los tratamientos a los 6 días.
t8	4	3.9	0.070	No hubo diferencias significativas en el crecimiento micelial de <i>Ustilago quitensis</i> en los tratamientos a los 8 días.

Nota: El análisis estadístico demuestra que si el  $p < 0.05$  no existe diferencia significativa entre los tratamientos aplicados, mientras que si  $p > 0.05$  existe diferencia significativa entre ellos.

En la Tabla 7 se detalla si existe diferencias significativas entre los días:  $t_0$ = Día inicial,  $t_2$ = Día dos,  $t_4$ = Día cuatro,  $t_6$ = Día seis,  $t_8$ = Día ocho aplicando un análisis de varianza. En la Tabla 8, se realiza un análisis de varianza con factor.

Tabla 7. Representación del crecimiento micelial del hongo *Ustilago quitensis* en diferentes días.

$t_0$	$t_2$	$t_4$	$t_6$	$t_8$
1.3	2	3	3.5	4
1.3	2.1	3.2	3.6	4.2
1.3	2.2	3.4	3.6	4.1

### Análisis de varianza

Tabla 8. Análisis de varianza del crecimiento micelial (cm) en muestra control (ck) durante un periodo de tiempo de 8 días.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	15.49066	4	3.8726	305.7368	2.0916E-10	3.478049691
Dentro de los grupos	0.126666	10	0.0126			
Total	15.617333	14				

En efecto, el análisis de varianza muestra que el valor de p es menor. Por lo tanto, si existe estadísticamente diferencia significativa entre los días en la muestra control (ck).

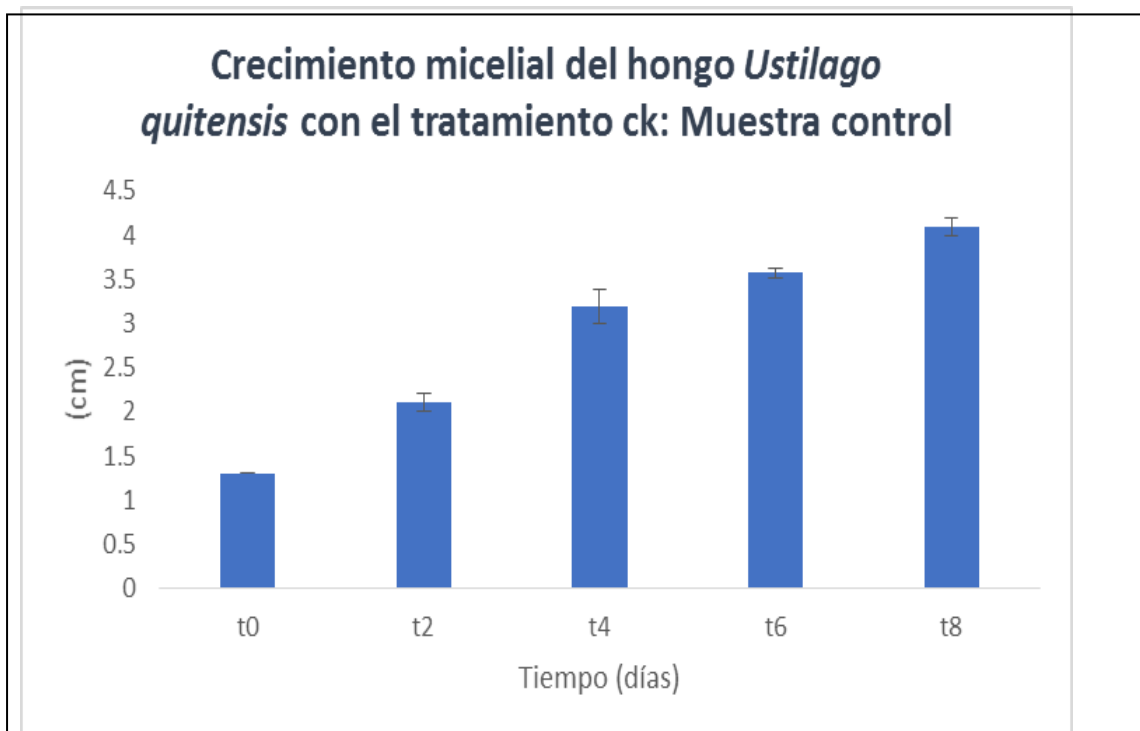


Figura 13. Gráfica de barras de la desviación estándar con el tratamiento ck: Muestra control durante un período de 8 días.

a) Al examinar los resultados se observó mayor crecimiento micelial del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* en la muestra control (ck) al sexto día (t6) y octavo (t8), estadísticamente se reflejan menor dispersión entre sus datos en comparación al resto de días.

### 3.2.2 Concentración de esporas

En primer lugar, se utilizó análisis de datos en Excel, reflejado en la Tabla 9 muestra las concentraciones utilizadas en la investigación. Además, en la Tabla 10 se puntualiza el análisis de varianza, considerando el número de conidios/ $\mu\text{L}$  en los cuatro tratamientos utilizados Concentración 1 (C1), Concentración 2 (C2), Concentración 3 (C3) y Concentración 4 (C4) para el método de aspersión.

Tabla 9. Concentraciones de esporas utilizadas en la inoculación para método de aspersión

	TRATAMIENTOS			
(Conidios/ $\mu$ L)	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4
	818,000	464,000	68,000	28,000
	838,000	296,000	200,000	34,000
	800,000	320,000	100,000	52,000

### Análisis de varianza

Tabla 10. Análisis de varianza de los diferentes tratamientos (cuatro concentraciones) empleados en el método de aspersión.

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1103558.33	3	367852.77	108.87	7.96E-07	4.06
Dentro de los grupos	27029.33	8	3378.66			
Total	1130587.66	11				

A partir del análisis de varianza se observó que el valor de p es menor. Es decir, sí existe estadísticamente diferencia significativa entre los tratamientos utilizando diferentes concentraciones de esporas para ser empleados en diferentes partes de las plantas.

### 3.2.3 Biomasa

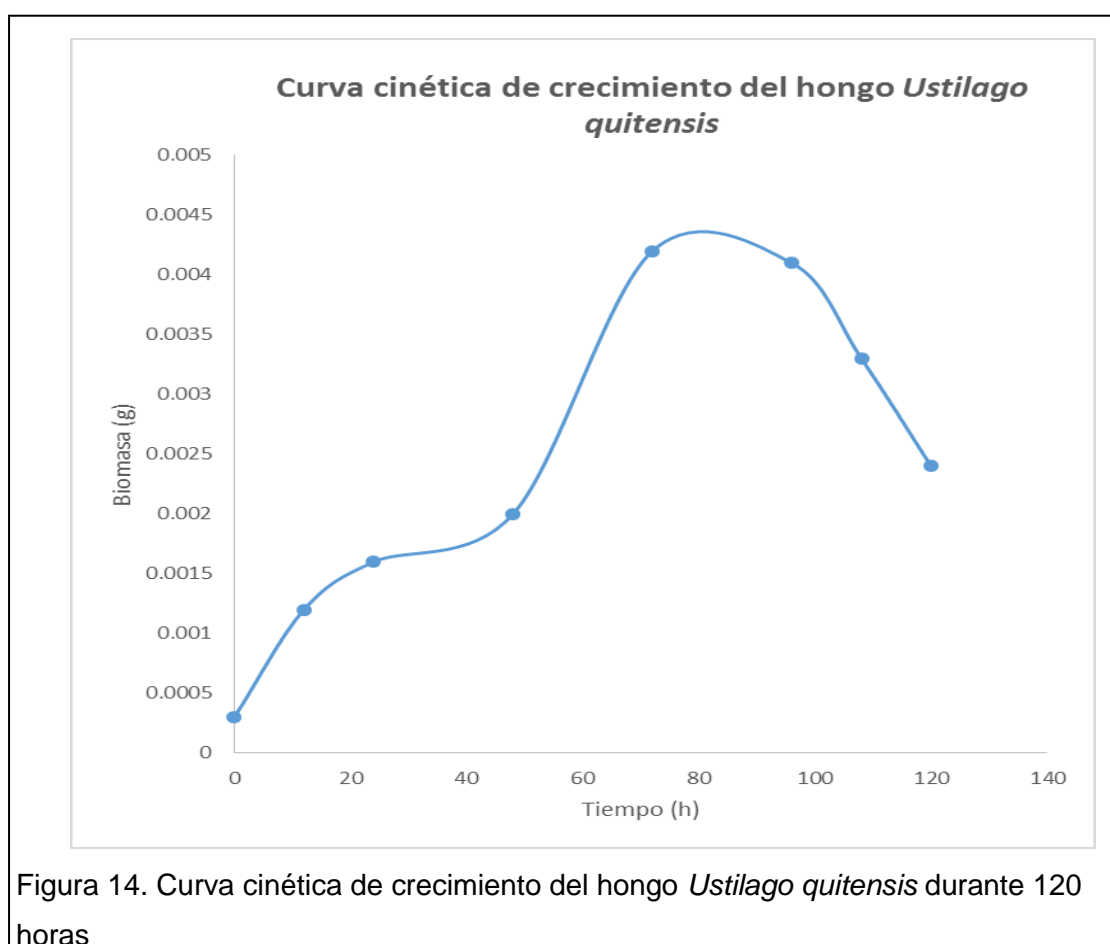
En general, el hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* fue inoculado en cultivo líquido por 24 horas a 25 °C. La producción de biomasa fue tomada cada 24 horas durante 5 días. A continuación, se observa en la Tabla 11 las diferentes concentraciones obtenidas en el tiempo subrayando la mayor concentración de 0.0042 g/ $\mu$ L de biomasa a las 72 h de haber sido inoculado. En la Figura 14 se observa las curva cinética de crecimiento celular a) fase de latencia; b) fase



exponencial; d) fase estacionaria; e) fase de muerte del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis*.

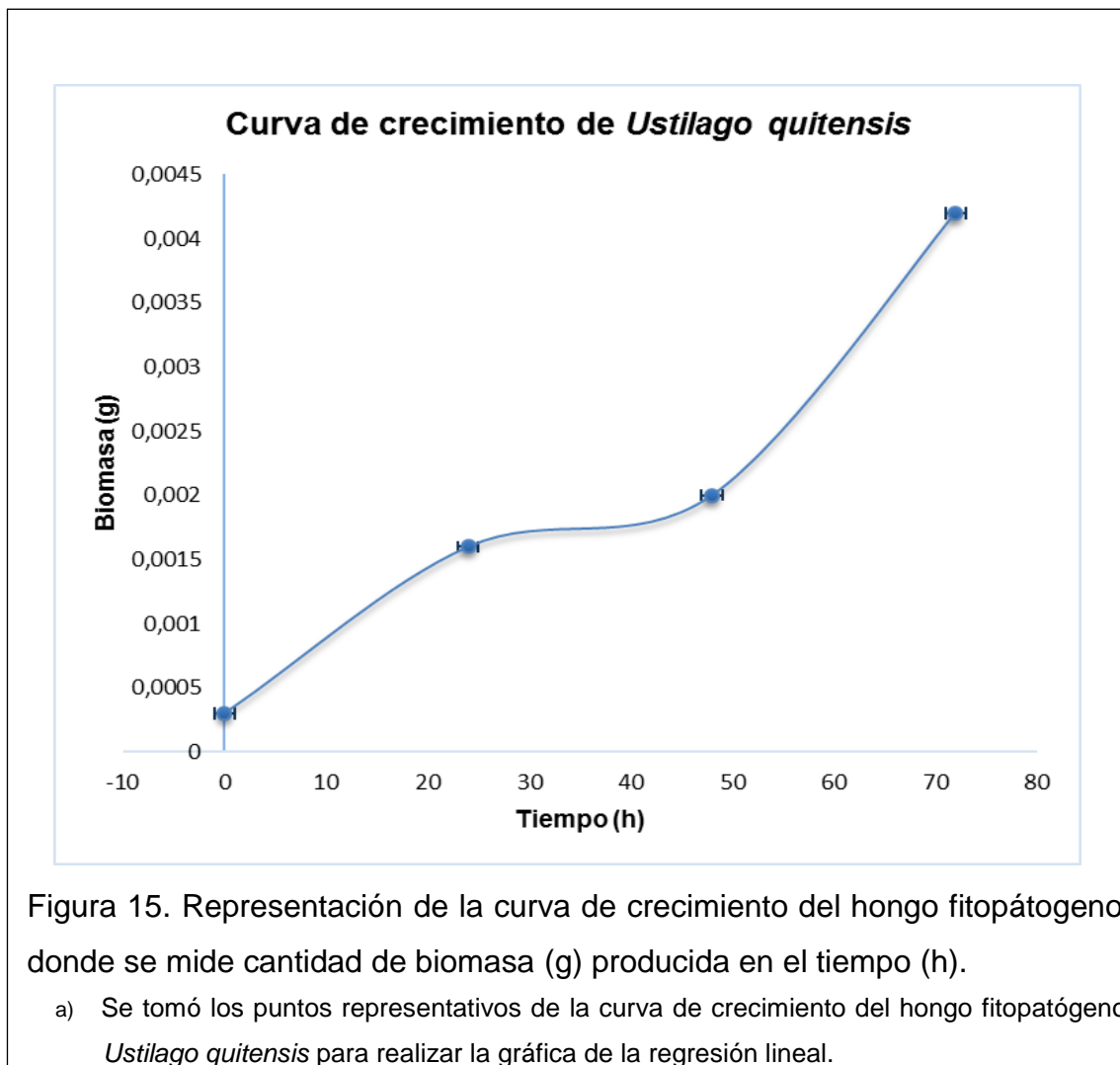
Tabla 11. Promedio de crecimiento en cinco días del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis*.

Tiempo (h)	Promedio (g)	Desv. Est
0	0.0003	0.0001
24	0.0016	0.0005
48	0.0020	0.0004
72	0.0042	0.0008
96	0.004	0.0003
108	0.003	0.0013
120	0.0024	0.0010



Se utilizó el método directo o gravimétrico donde se evalúa la cantidad de biomasa producida en 120 h, diferenciando las fases de crecimiento en microorganismos (Latencia, exponencial, estacionaria y muerte) de crecimiento

del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* (Gaitán y Báez, 2008, p. 41). En la Figura 15 se representa la curva de crecimiento desde la fase de latencia a la fase exponencial.



### Ecuación de biomasa

$$E - S + G - C = A \quad \text{(Ecuación 3)}$$

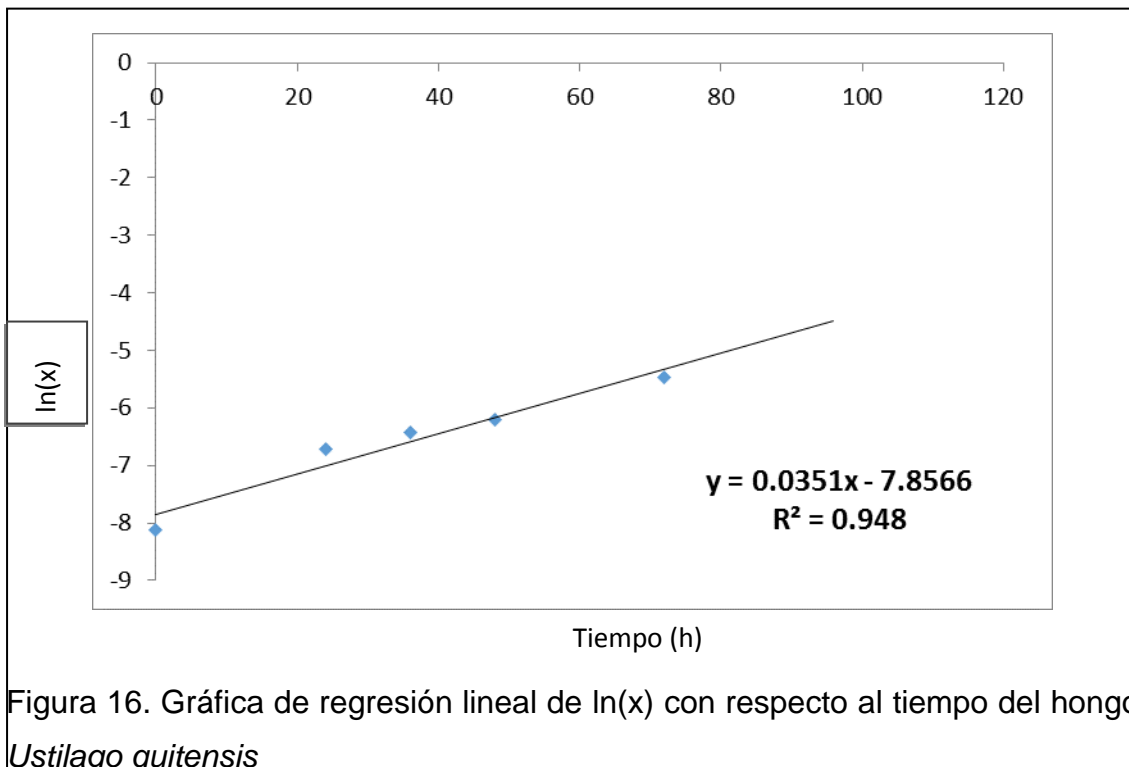
$$ux = dx / dt$$

$$\int dx / x = \int u dt$$

$$\ln \frac{x}{x_0} = ut \quad \text{(Ecuación 4)}$$

$$\ln x = ut + \ln x_0$$

$$y = mx + b \quad \text{(Ecuación 5)}$$



La Figura 16 representa la velocidad de crecimiento donde  $m = \mu$ . El hongo alcanzó su mayor concentración a las 72 horas porque se benefició de las condiciones favorables que se le suministró. La velocidad específica de crecimiento fue de  $\mu = 0,0351 \text{ h}^{-1}$  (Arnáiz et al., 2000, p. 45).

### 3.2.4 Métodos de inoculación del hongo fitopatógeno en diferentes partes de la planta.

En las muestras inoculadas a nivel de campo se usó dos métodos: uno de aspersión donde se manejó cuatro concentraciones diferentes y el método directo el cual consiste en la aplicación de una inyección con la concentración más alta de biomasa. El porcentaje de incidencia se realizó mediante la aplicación de la ecuación 6.

**Ecuación de incidencia:**

$$I\% = \frac{\text{No.hojas/ inflorescencia enfermas}}{\text{Total de hojas/ inflorescencia infectadas}} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

El hongo *Ustilago quitensis* en las plantas *Cortaderia Jubata* mostró un porcentaje de incidencia del 94% con el método de aspersión aplicado en la inflorescencia, mientras que en hojas se obtuvo un 50%. Por otro lado, el método directo empleando una inyección se logró un porcentaje de 44% de incidencia mayor en las inflorescencias y un 18% en las hojas de las plantas.

En la Tabla 12 y 13 se muestra el porcentaje de incidencia que se obtuvo mediante la proporción de individuos u órganos como: hojas y las inflorescencias enfermas del hospedero con relación a los sanos y la Figura 17 se expone en el gráfico de barras el porcentaje de incidencia con los dos métodos (aspersión y directo). Según estudios anteriores la infección del hongo *Ustilago quitensis* penetra las plántulas y se desarrolla en las plantas sin que estas muestren síntomas a manera de una masa de color negro-verdoso, hasta que lleguen a floración (Agrios, 2005). La floración estuvo en estado de desarrollo por lo que se pudo evidenciar que las teliosporas estuvieron presentes en el órgano reproductor del hospedante, mostrando una coloración negra y revelando un porcentaje de incidencia mayor. En las hojas la incidencia fue menor porque presentaban una forma lineal, es decir no eran jóvenes y tienen menor cantidad de estomas y muestran un sistema vascular menos activo. Los estomas, son los encargados de realizar la fotosíntesis, se encuentran en los tallos jóvenes y en mayor cantidad en las hojas jóvenes (Banrepcultural, s.f.).

Tabla 12. Método de aspersión del hongo fitopatógeno en diferentes partes de la planta: # de hojas enfermas (H) y # de inflorescencias enfermas (I).

Método				
Aspersión	H	% de incidencia	I	% de incidencia
C1	8	50%	15	94%
C2	6	37%	10	62%
C3	4	25%	5	31%
C4	1	6%	3	18%

Nota: Se tomó 4 plantas y el tamaño de la muestra fue de 16 hojas y 16 inflorescencias.

Tabla 13. Método directo del hongo fitopatógeno en diferentes partes de la planta: # de hojas enfermas (H) y # de Inflorescencias enfermas (I).

Directo	H	% de incidencia	I	% de incidencia
Biomasa (g/uL)	3	18%	7	44%

Nota: Se tomó 4 plantas y el tamaño de la muestra fue de 16 hojas y 16 inflorescencias.

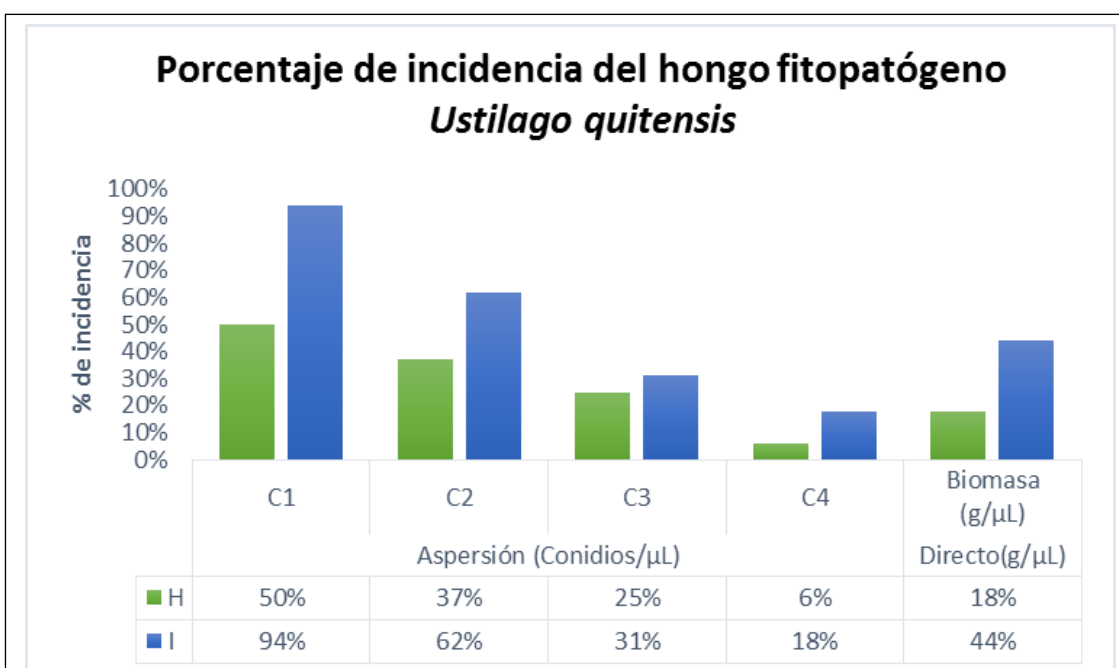
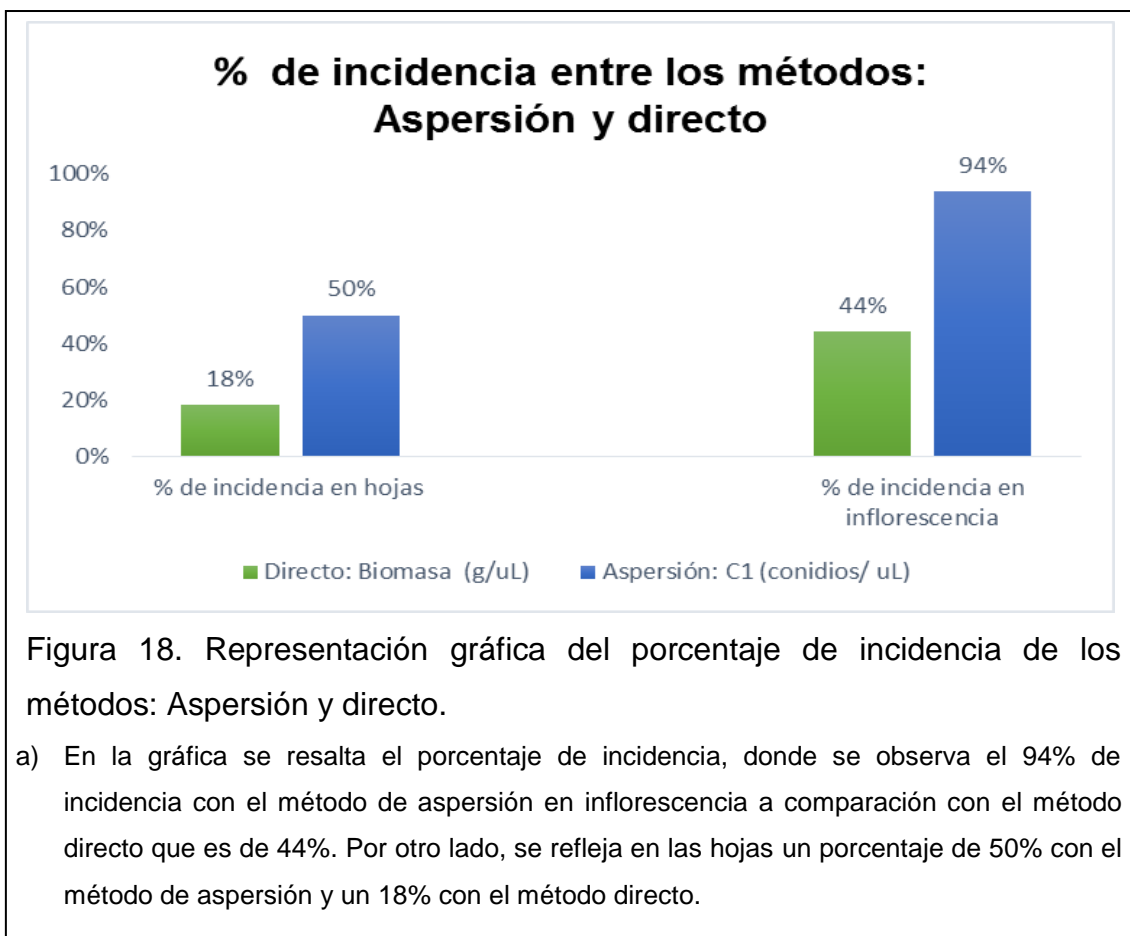


Figura 17. Gráfica con el porcentaje de incidencia del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* en diferentes partes de la planta H= Hojas, I= Inflorescencia, empleando dos métodos por aspersión y directo.

Se pudo observar que existió mayor incidencia del hongo con el método de aspersión a los 30 días con la concentración C1 (818.000 conidios/ $\mu$ L); sin embargo, la parroquia Nono tiene una temperatura de 19 °C y bosques muy húmedos. Algunas investigaciones señalan ciertos factores que influyen en el desarrollo del carbón, así como la temperatura menor a 23 °C y humedad alta del suelo (Matheron, Student, Mircetich, y Leb, 1985, p. 1042). Además, influyen ciertos tipos de suelo como los arcillosos que reducen la incidencia del hongo según Lubberstedt (2013, p.20 ). En la Tabla 14 se identifica los porcentajes de incidencia con los dos métodos.

Tabla 14. Porcentaje de incidencia entre los métodos de aspersión y método directo.

<b>Método</b>	<b>Directo: Biomasa (g/uL)</b>	<b>Aspersión: C1 (conidios/ uL)</b>
% de incidencia en hojas	18%	50%
% de incidencia en inflorescencia	44%	94%



## 5. Capítulo V. Conclusiones y Recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

El efecto biológico del hongo *Ustilago quitensis* sobre la planta se evidenció en hojas e inflorescencias causando manchas de color café en hojas y una masa en polvo café en las inflorescencias. Por lo que, se demuestra un mayor porcentaje de incidencia del 94% en la inflorescencia de la planta.

El hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* mediante esta investigación confirma que está compuesto por esporas denominadas telioesporas y a su vez por basidioesporas.

Las diferentes concentraciones que determinó el porcentaje de incidencia muestran diferencias estadísticamente significativas entre ellas, ya que el proceso de infección es más lento en concentraciones más bajas C3 (122.000 conidios/ $\mu$ L) y C4 (38.000 conidios/ $\mu$ L), mientras que a concentraciones altas C1 (818.000 conidios/ $\mu$ L) y C2 (360.000 conidios/ $\mu$ L) a los 30 días se evidenció incidencia en la planta.

La acumulación de biomasa fue de 0.0042 g/ $\mu$ L a las 72 h de haber sido inoculado, determinando la mayor concentración específica de biomasa alcanzada por el hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* durante 120 horas.

El método de aspersión utilizando concentración C1 (818.000 conidios/ $\mu$ L) representó un porcentaje de 94% de incidencia del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* en la inflorescencia de la planta, y un 50% en hojas. Por otro lado, el método directo mostró un porcentaje de incidencia menor comparado con el método de aspersión del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis*, ya que se obtuvo porcentajes en la inflorescencia de 44% y en hojas de 18%.



El protocolo de incidencia desarrollado facilita la determinación de incidencia del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* como potencial agente de biocontrol, se presenta en el Anexo 10.

## 4.2 Recomendaciones

Una de las propuestas, en relación a la inoculación del hongo fitopatógeno, es controlar las condiciones ambientales tales como: luz, temperatura y humedad. Esto sería posible, incorporando un invernadero en estado cuarentenario.

Se contempla importante, considerar el tipo de suelo para facilitar el desarrollo de las plantas y propagación de los hongos fitopatógenos.

Es necesario tomar en cuenta que los medios donde está colocado el hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* debe estar ubicado en cajas de cultivo estéril, lejos de otros microorganismos que pueden alterar el crecimiento, provocando contaminación cruzada entre medios dispensados.

Se recomienda seguir investigando medios de cultivos alternativos y más económicos para el crecimiento del hongo *Ustilago quitensis*.

Es necesario comparar en futuras investigaciones el efecto biológico del hongo *U. quitensis* con otro hongo del mismo género utilizado como agente de biocontrol.

## REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). Enfermedades de cereales. *The American Phytopathological Society*
- Alarcón, L. y Oliva, E. (2001). *Manual de prácticas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos*. (1ª ed). Juárez: UACJ. Recuperado el 13 de noviembre del 2015 de <https://books.google.com/books?id=Oy-kG04CIBUC&pgis=1>
- Alexopoulos, A., y Constantine, J. (1979). *Introducción a la micología*. (C. Wiley, Ed) (3ª ed). Michigan.
- Alston, D. (2011). General Concepts of Biological Control. Recuperado el 10 de Mayo del 2016 de <https://extension.usu.edu/files/publications/publication/gen-biocontrol96.pdf>
- Ames, T. y Cañedo, V. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos* (Cañedo, V). Lima: 2004.
- ArgenBio. (s.f.). Glifosato. Recuperado el 2 de Febrero 2016, de <http://www.argenbio.org/adu/uploads/Glifosato.pdf>
- Arnáiz, C., Isac, L. y Lebrato, J. (2000). Determinación de la biomasa en procesos biológicos. *Artículos Técnicos*
- Asturnatura. (s.f.). *Basidiomycetes. Teliomycetes; royas y carbones*. Recuperado el 10 de Octubre 2015, de <http://www.asturnatura.com/articulos/hongos/basidiomycetes-teliomycetes-uredinales-ustilaginales-royas-carbones-rust.php>
- Banrepcultural. (s.f.). *Epidemiología*. Recuperado el 20 de Abril del 2016 de [www.banrepcultural.org/sites/...de.../modulo1-v.pdf](http://www.banrepcultural.org/sites/...de.../modulo1-v.pdf)
- Bárberi, P. (2001). *Métodos preventivos y culturales para el manejo de malezas*. Recuperado el 10 de Octubre del 2015, de <http://www.fao.org/docrep/007/y5031s/y5031s0e.htm>
- Barnes, C. y Ordóñez, M. (2012). Primer Reporte de la Secuencia de ITS de

Ustilago quitensis en Cortaderia jubata en Ecuador. *CIENCIAMÉRICA*

- Beebee, T. y Griffiths, R. (2005). The amphibian decline crisis: A watershed for conservation biology. *Biological Conservation*. Recuperado el 4 de Mayo del 2016 doi.org/10.1016/j.biocon.2005.04.009
- Bórtoli, P., Verdenelli, R., Conforto, C., Vargas Gil, S. y Meriles, J. (2012). Efectos del herbicida glifosato sobre la estructura y el funcionamiento de comunidades microbianas de dos suelos de plantaciones de olivo. *Ecología Austral*
- Caballer, E. (2012). *La invasión de los plumeros*. Recuperado el 23 de Marzo del 2015, de <http://www.espores.org/es/plantas/la-planta-del-mes.html>
- Cáceres, P., Pumisacho, M., Forbes, G. y Andrade, J. (2007). Guía para facilitar el aprendizaje sobre control de tizón tardío de la papa. *Centro internacional de la Papa (CIP), Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias del Ecuador (INIAP), Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología del Ecuador (SENACYT)*.
- DiTomaso, J., Drewitz, J. y Kyser, G. (2008). Jubatagrass (Cortaderia Jubata) Control Using Chemical and Mechanical Methods. *Invasive Plant Science and Management*. Recuperado el 5 de Enero del 2016 de doi:10.1614/IPSM-07-028
- Gaitán, R. y Báez, I. (2008). *Crecimiento micelial de cepas silvestres nativas de Lepista nuda, en medios de cultivo con diferentes suplementos orgánicos*. *Revista mexicana de micología*. Recuperado el 18 de Diciembre del 2015 de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-31802008000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802008000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es)
- Gallastegui, M. y Prieto, J. (2006). *El carrizo de la pampa (Cortaderia selloana) Bizkaia*. *BFA*
- Gioanetto, F. y Cerna, E. (1996). *El control biológico de las hierbas adventicias*. Recuperado el 10 de Febrero del 2016, de [https://latuzagolosa.files.wordpress.com/2008/07/copy\\_of\\_el\\_control\\_biol](https://latuzagolosa.files.wordpress.com/2008/07/copy_of_el_control_biol)

ogico\_de\_las\_hierbas\_a\_.pdf

- Gómez, J. (1995). *Control de Malezas*. Recuperado el 3 de Septiembre del 2015, de [http://www.cenicana.org/pdf/documentos\\_no\\_seriados/libro\\_el\\_cultivo\\_cana/libro\\_p143-152.pdf](http://www.cenicana.org/pdf/documentos_no_seriados/libro_el_cultivo_cana/libro_p143-152.pdf)
- Gosling, D., Shaw, W. y Beadel, S. (2000). *Review of control methods for pampas grasses in New Zealand. Science for Conservation*. Wellington.
- Granda, D. (2008). Producción y uso de hongos entomopatógenos. *Fundación para el desarrollo Tecnológico Agropecuario y Forestal de Nicaragua*
- Guevara, T. y Estrella, N. (2008). *DETERMINACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ENFERMEDADES BACTERIANAS DEL TOMATE RIÑÓN (Lycopersicon sculentum), CULTIVADO BAJO INVERNADERO EN DOCE ÁREAS DE LA CORDILLERA CENTRAL DEL ECUADOR*. Escuela Politécnica del ejército.
- Hokkanen, H. y Lynch, J. (2003). *Biological Control: Benefits and Risks*. (Cambridge University, Ed). New York: 1995. Recuperado el 18 de Mayo del 2016 de <https://books.google.com.au/books?id=DVPjI7gfqDoC>
- Iñiguez, K. y Gallo, G. (2010). Glifosato: mitos y realidades. Recuperado el 12 de Abril del 2016, de <http://www.funpat3mil.com.ar/documentos/Glifosato.pdf>
- Jara, A., Jiménez, C. y Gómez, B. (2013). *Operaciones Básicas De Laboratorio* (Mc Graw Hi). México: 2002. Recuperado el 15 de Febrero del 2016 de <http://doi.org/5984519>
- Jones, G., Kevin, H. y Pang, K. (2014). *Freshwater Fungi: and Fungal-like Organisms*. (D. Gruyter, Ed). Thailand: De Gruyter. Recuperado el 10 de Mayo del 2016 de <https://books.google.com/books?id=mXfnBQAAQBAJ&pgis=1>
- Labrada. R. (2008). Recomendaciones para el manejo de malezas. *FAO*. Recuperado el 21 de Marzo del 2015 de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a0884s/a0884s.pdf>

- Labrada, R., Caseley, J. y Parker, C. (1996). Manejo de malezas para países en desarrollo. Recuperado el 31 de Marzo 2015, de <http://www.fao.org/docrep/t1147s/t1147s0l.htm>
- Labrada, R. y Parker, C. (1994). Manejo Integrado de Malezas. FAO. Recuperado el 18 de Noviembre del 2015 de [http://www.fao.org/ag/ca/training\\_materials/cd27-spanish/wm/weeds.pdf](http://www.fao.org/ag/ca/training_materials/cd27-spanish/wm/weeds.pdf)
- Lubberstedt, T. y Rajeev.K. (2013). *Diagnostics in Plant Breeding*. New York: Springer Science & Business Media. Recuperado el 5 de Abril del 2016 de <https://books.google.com/books?id=jV9BAAAQBAJ&pgis=1>
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2008). Interacciones entre microorganismos y plantas. In *Brock Biología de los Microorganismos* (10° ed)
- MARIENFELD. (s.f.). Cámara de recuento. Recuperado el 14 Octubre del 2015, de [http://www.marienfeld-superior.com/index.php/manuals.html?file=tl\\_files/Infomaterial/AnleitungenundAnwendung/Zählkammern/2010-Marienfeld-info-camaras-de-recuento.pdf](http://www.marienfeld-superior.com/index.php/manuals.html?file=tl_files/Infomaterial/AnleitungenundAnwendung/Zählkammern/2010-Marienfeld-info-camaras-de-recuento.pdf)
- Matheron, M., Student, F., Mircetich, S. y Leb, P. (1985). Control of Phytophthora Root and Crown Rot and Trunk Canker in Walnut with Metalaxyl and Fosetyl Al
- Museo Ecuatoriano de Ciencias Naturales (MECN). (2009). *Ecosistemas del Distrito Metropolitano de Quito (DMDQ)*. (6ª ed). Quito, Ecuador. Recuperado el 18 de Mayo del 2016 de [http://www.quitoambiente.gob.ec/ambiente/images/Secretaria\\_Ambiente/Documentos/patrimonio\\_natural/biodiversidad/guia\\_ecosistemas\\_dmq.pdf](http://www.quitoambiente.gob.ec/ambiente/images/Secretaria_Ambiente/Documentos/patrimonio_natural/biodiversidad/guia_ecosistemas_dmq.pdf)
- Menéndez, J. (2007). Ustilago maydis. Recuperado el 20 de Abril del 2016, de <http://www.asturnatura.com/especie/ustilago-maydis.html>
- Motta, P. y Ordoñez, B. (2014). Hongos entomopatógenos como alternativa para el control biológico de plagas. *Revista Ambiente e Agua*, 9(3), 445–458. Recuperado el 20 de Marzo del 2015 de <http://doi.org/10.4136/1980-993X>
- Muñoz, G., Galdames, R. y Andrade, O. (2010). TAXONOMÍA DEL AGENTE CAUSAL DEL CARBÓN DE LA PAPA

- O'toole, D. (1983). Weighing technique for determining bacterial dry mass based on rate of moisture uptake. *Applied and environmental microbiology*
- Okada, M., Lyle, M. y Jasieniuk, M. (2009). Inferring the introduction history of the invasive apomictic grass *Cortaderia jubata* using microsatellite markers. *Diversity and Distributions*. Recuperado el 5 de Marzo del 2016 de <http://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00530.x>
- Peña, R. y Paéz, J. (2011). HONGOS FITOPATOLÓGICOS. Recuperado el 2 de Septiembre del 2015, de <http://virtual.uptc.edu.co/ova/fito/archivo/HONGOS.pdf>
- Peterson, D., Russo, M. G. y Invasive Species Team. (2014). *Cortaderia jubata* - Bugwoodwiki. Recuperado el 23 de Marzo del 2015, de [http://wiki.bugwood.org/Cortaderia\\_jubata](http://wiki.bugwood.org/Cortaderia_jubata)
- Pineda, M. (2011). FITOPATOLOGIA. Recuperado el 23 de Marzo del 2015, de <http://fitopatologia2011.blogspot.com/>
- Prevéy, J. y Seastedt, T. (2015). Increased winter precipitation benefits the native plant pathogen *Ustilago bullata* that infects an invasive grass. *Biological Invasions*. Recuperado el 18 de Mayo del 2016 de <http://doi.org/10.1007/s10530-015-0934-z>
- Reid, I., Sawyer, J. y Rolfe, J. (2009). Introduction to plant life in New Zealand. *Plant Conservation Network, 1ª ed*
- Rivera, E. y Codina, J. (2010). Mecanismos de infección de los hongos fitopatógenos. Recuperado el 15 de Octubre del 2015, de <http://www.encuentros.uma.es/encuentros36/fitopatogenos.html>
- Salvucci, E. (2010). CRECIMIENTO MICROBIANO | Hacia una nueva Biología on WordPress.com. Recuperado el 10 de Octubre del 2015, de <https://esalvucci.wordpress.com/crecimiento-microbiano/>
- Sánchez, V. (1999). *Control biológico de Rottboellia cochinchinensis*. (Técnica, Ed). Turrialba: Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza. Recuperado el 5 de Abril del 2015 de <https://books.google.com/books?id=zAK80mM0PMYC&pgis=1>

- Sanz, M., Sánchez, D. y Vesperinas, E. (2004). Capítulos del Atlas de las plantas alóctonas invasoras de España - Inventario Español de Especies Terrestres - Inventarios nacionales - Biodiversidad - magrama.es. Recuperado el 23 de Marzo del 2015, de [http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/ieet\\_flora\\_vasc\\_aloct\\_invas\\_capitulos.aspx](http://www.magrama.gob.es/es/biodiversidad/temas/inventarios-nacionales/inventario-especies-terrestres/inventario-nacional-de-biodiversidad/ieet_flora_vasc_aloct_invas_capitulos.aspx)
- Sarayasi, S. (2012). Control biológico de plagas - Una alternativa a los insecticidas — AgriCultures Network. Recuperado el 11 de Marzo del 2016 de <http://www.agriculturesnetwork.org/magazines/latin-america/28-1-insectos-y-agricultores/control-biologico-de-plagas>
- Solano, C. (2005). Resumen de las prácticas de Microbiología de Alimentos. *Microbiología de alimentos*
- Summerbell, R. (1993). The Benomyl Test as a Fundamental Diagnostic Method for Medical Mycology
- Toledo, M. (2008). *Residuos de Maíz y Quinoa como potenciales sustratos para el cultivo de hongos comestibles Pleurotus ostreatus*. Tesis de Grado. Escuela superior politécnica de Chimborazo.
- Villamizar, A. y Caycedo, J. (2013). *Basidiomycetes Características Generales pdf*. Pamplona. Recuperado el 8 de Septiembre del 2015 de <https://es.scribd.com/doc/181340428/Basidiomycetes-Caracteristicas-Generales-pdf>
- Villanueva, F. (2002). *Control químico de malezas en tierras de pastoreo; Vol.1*
- Viñuela, E. y Jacas, J. (1993). Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas. *Hojas divulgadoras*, 2/93, 24.
- Vourlitis, G. y Kroon, J. (2013). Growth and Resource Use of the Invasive Grass, Pampasgrass (*Cortaderia selloana*), in Response to Nitrogen and Water Availability. *Weed Science*. Recuperado el 7 de Junio del 2015 de <http://doi.org/10.1614/WS-D-11-00220.1>

Zamora, J., Martínez, N. y Guerrero, M. (2009). Enfermedades de las plantas.  
Recuperado el 13 de Abril del 2016, de [http://ocwus.us.es/produccion-vegetal/sanidad-vegetal/tema\\_18/page\\_04.htm/skinless\\_view](http://ocwus.us.es/produccion-vegetal/sanidad-vegetal/tema_18/page_04.htm/skinless_view)



## **ANEXOS**

### **ANEXO 1. *Cortaderia jubata***

Plantas de *Cortaderia jubata* con su inflorescencia en la granja experimental de la UDLA en Nono, donde se usaron parcelas separadas de los demás cultivos.



*Cortaderia jubata* localizada en la Granja Experimental Nono

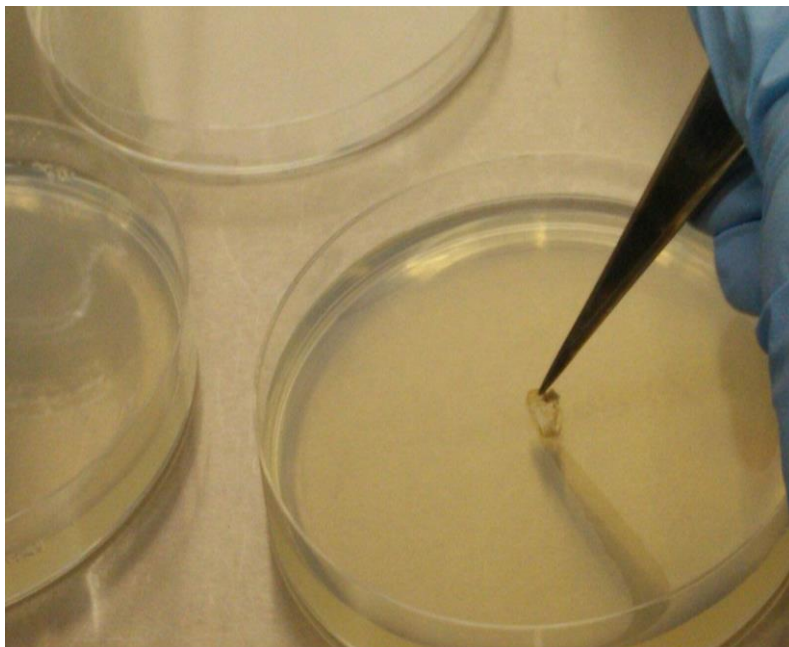
## ANEXO 2. Preparación de medios



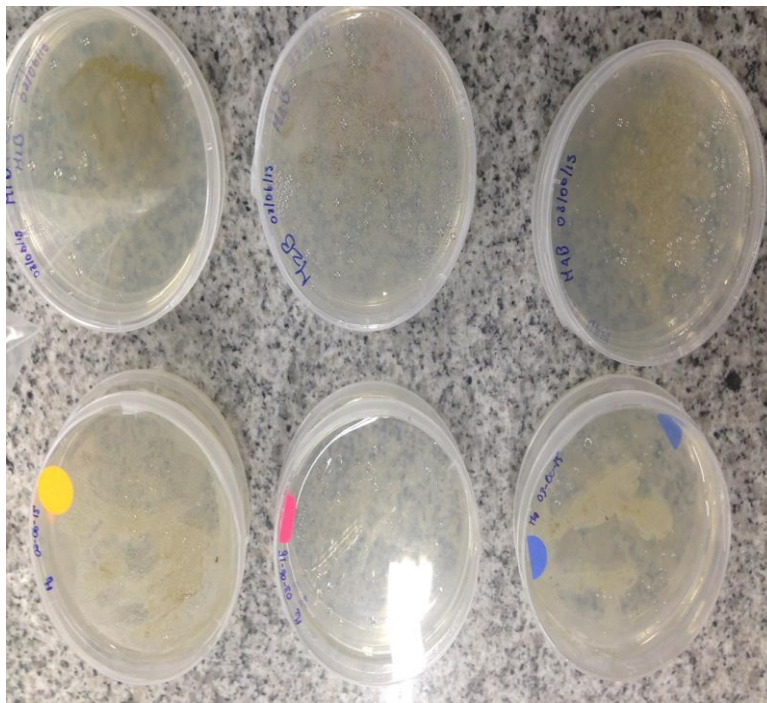
Preparación de medios para el aislamiento del hongo *Ustilago quitensis*

**ANEXO 3. Inoculación del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis***

Inoculación de medios de cultivo PDA a diferentes temperaturas 30 °C y 25 °C.



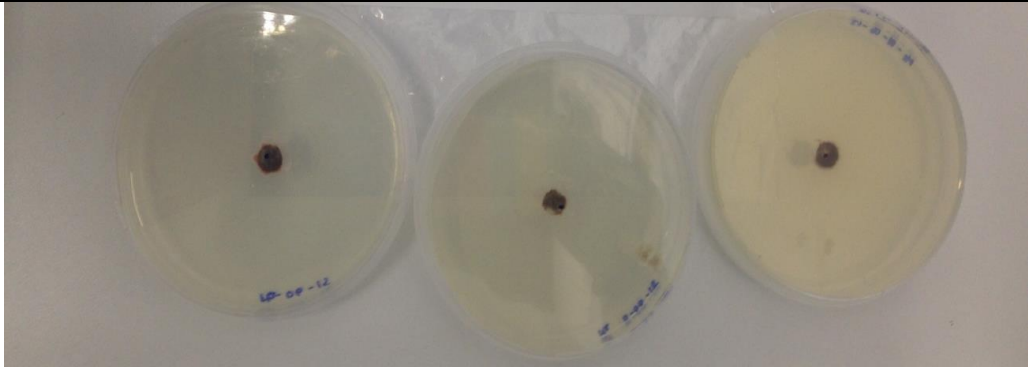
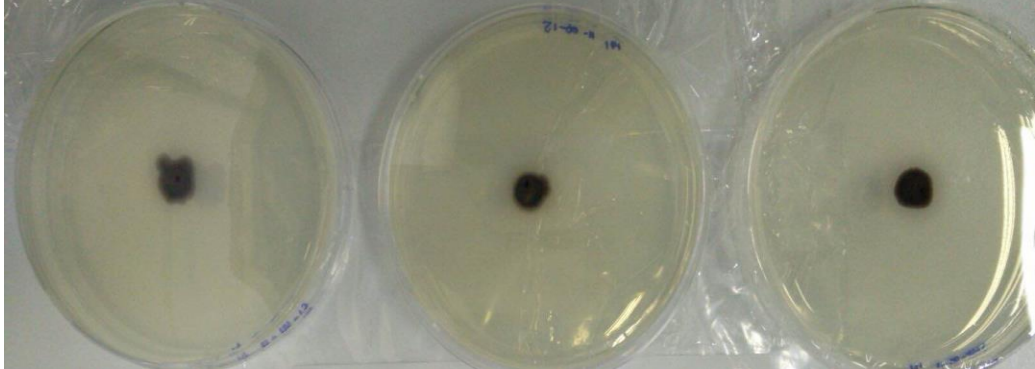
Inoculación del hongo *Ustilago quitensis* en diferentes medios nutritivos


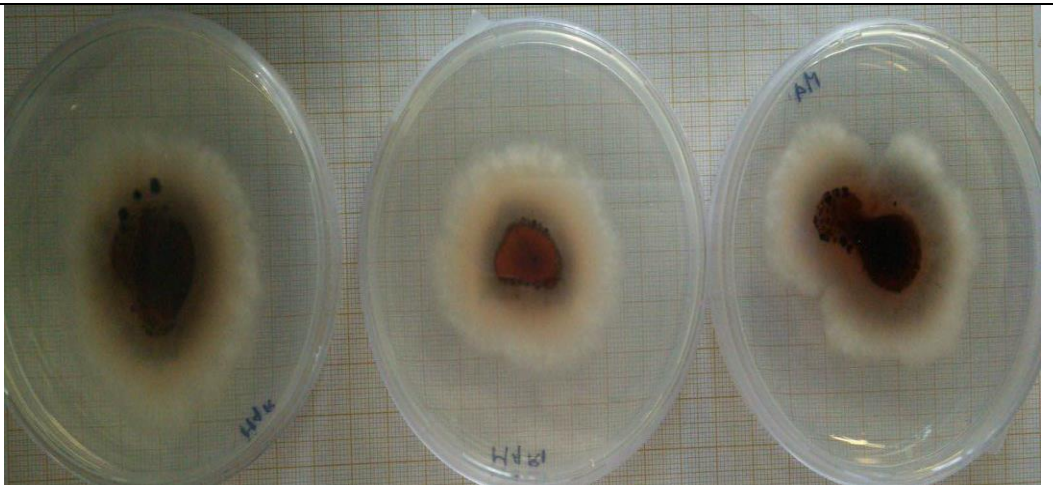


Cajas petri inoculadas en medio PDA

#### ANEXO 4. Réplicas del crecimiento micelial: Muestra control (Ck) a 25 °C.

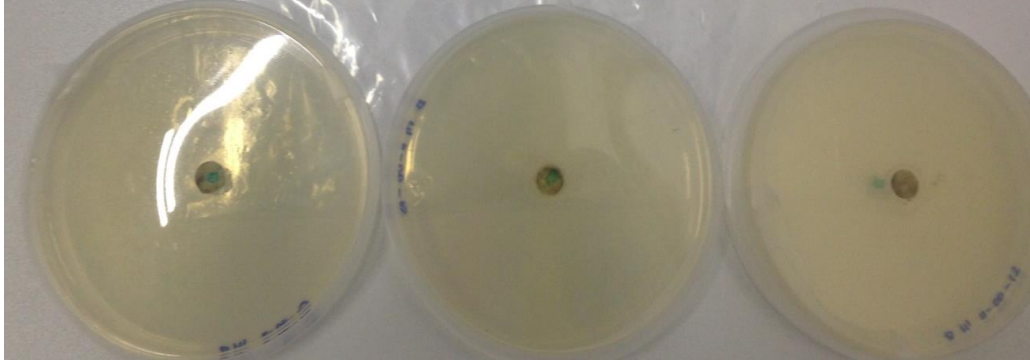
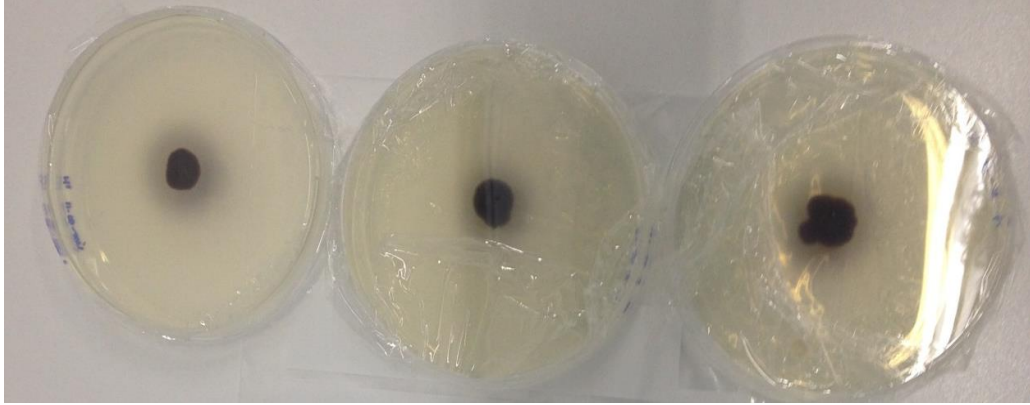
Muestras de la cepa M4 en medio sin fungicida a 25 °C crecimiento micelial a diferentes tiempos y con sus respectivas replicas: (réplica 1: M4) (réplica 2: M4R) (réplica 3: M4R1). Se representa: (Día 0:  $t_0$ ) (Día 2:  $t_2$ ) (Día 4:  $t_4$ ) (Día 6:  $t_6$ ) (Día 8:  $t_8$ ).

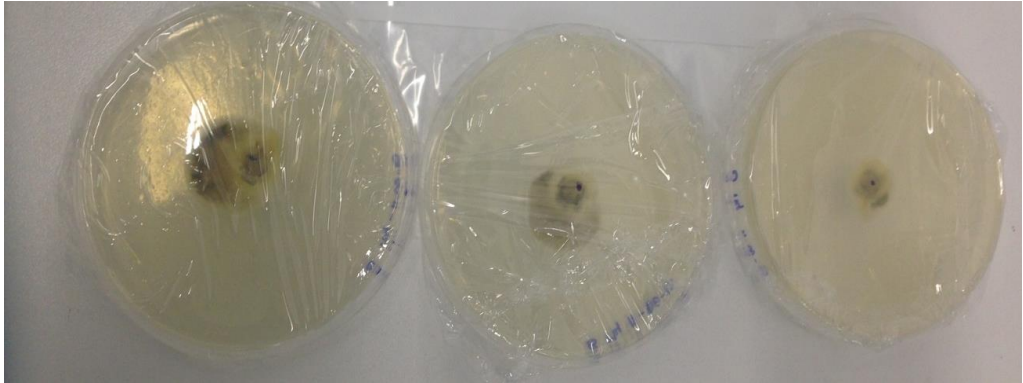
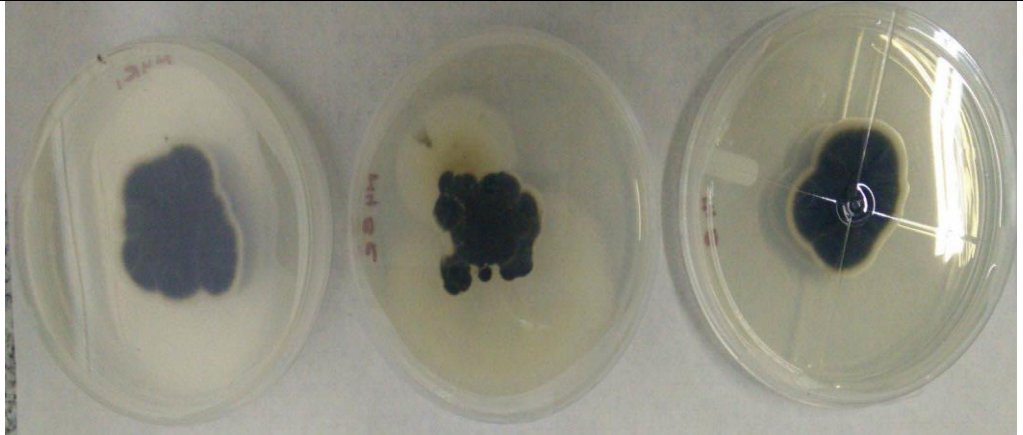
Días	M4 ( réplica 1)	M4R ( réplica 2)	M4R1 ( réplica 3)
$t_0$	 <p>Muestras cepa M4 en medio PDA a 25 °C crecimiento micelial día 0</p>		
	<b>M4 ( réplica 1)</b>	<b>M4R ( réplica 2)</b>	<b>M4R1 ( réplica 3)</b>
$t_2$	 <p>Muestras cepa M4 en medio PDA a 25 °C crecimiento micelial día 2</p>		
	<b>M4 ( réplica 1)</b>	<b>M4R ( réplica 2)</b>	<b>M4R1 ( réplica 3)</b>

<b>t<sub>4</sub></b>			
	<b>M4 ( réplica 1)</b>	<b>M4R ( réplica 2)</b>	<b>M4R1 ( réplica 3)</b>
<b>t<sub>8</sub></b>			
	Muestras cepa M4 en medio PDA a 25 °C crecimiento micelial día 8		

**ANEXO 5. Réplicas del crecimiento micelial: Muestra con fungicida (Benomil) a 25 °C.**

Muestras de la cepa M4 medio Benomil 25 °C a diferentes días y con sus respectivas replicas: (réplica 1: M4) (réplica 2: M4R1) (réplica 3: M4R2). Se representa: (Día 0:  $t_0$ ) (Día 2:  $t_2$ ) (Día 4:  $t_4$ ) (Día 6:  $t_6$ ) (Día 8:  $t_8$ ).

Días	M4 ( réplica 1)	M4R ( réplica 2)	M4R1( réplica 3)
$t_0$	 <p>Muestra cepa M4 medio Benomil 25 °C día 0</p>		
	<b>M4 ( réplica 1)</b>	<b>M4R ( réplica 2)</b>	<b>M4R1 ( réplica 3)</b>
$t_2$	 <p>Muestra cepa M4 medio Benomil 25 °C día 2</p>		
	<b>M4 ( réplica 1)</b>	<b>M4R ( réplica 2)</b>	<b>M4R1 ( réplica 3)</b>

<b>t<sub>4</sub></b>	 <p>Muestra cepa M4 medio Benomil 25 °C día 4.</p>
	<p><b>M4 ( réplica 1)</b>                      <b>M4R ( réplica 2)</b>                      <b>M4R1( réplica 3)</b></p>
<b>t<sub>8</sub></b>	 <p>Muestra cepa M4 medio Benomil 25 °C día 8.</p>



### ANEXO 6. Conteo de esporas en la cámara de Neubauer

Datos del conteo de esporas en la cámara de Neubauer a través de técnicas de dilución para obtener la mejor concentración de esporas.

Tabla 15. Concentración de esporas Conidios/ $\mu\text{L}$  dilución  $10^{-1}$

<b>Dilución <math>10^{-1}</math></b>				
<b>M4</b>				
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
95	72	74	63	76
89	79	92	86	92
<b>M4R</b>				
100	86	80	75	78
99	89	78	77	77
<b>M4R1</b>				
82	74	68	91	90
75	80	74	84	79

Tabla 16. Concentración de esporas dilución  $10^{-2}$

<b>Dilución <math>10^{-2}</math></b>				
<b>M4</b>				
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
45	52	54	37	42
51	44	49	48	40
<b>M4R</b>				
34	21	31	35	42
23	45	21	22	21
<b>M4R1</b>				
8	7	3	8	11
28	15	6	5	15

Tabla 17. Concentración de esporas dilución  $10^{-3}$ 

<b>Dilución <math>10^{-3}</math></b>				
<b>M4</b>				
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
2	11	2	10	10
7	6	11	5	4
<b>M4R</b>				
27	18	15	8	23
11	10	18	20	15
<b>M4R1</b>				
18	11	12	11	5
6	7	17	8	3

Tabla 18. Concentración de esporas dilución  $10^{-4}$ 

<b>Dilución <math>10^{-4}</math></b>				
<b>M4</b>				
<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>
2	1	3	3	7
3	1	5	2	1
<b>M4R</b>				
1	4	10	4	4
3	2	2	1	3
<b>M4R1</b>				
3	4	2	11	10
5	2	7	2	5

Tabla 19. Conteo de esporas con el promedio de cada dilución.

Conteo		De Esporas			
		Repeticiones			
# de diluciones	Diluciones	M4	M4R	M4R1	Promedio
1	$10^{-1}$	409	419	399	409
2	$10^{-2}$	232	148	53	145
3	$10^{-3}$	34	100	50	62
4	$10^{-4}$	14	17	26	19

### Fórmula para calcular factor de dilución

$$F : \frac{vt}{vt + vf} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Vf: Volumen final

Vt: volumen de transferencia

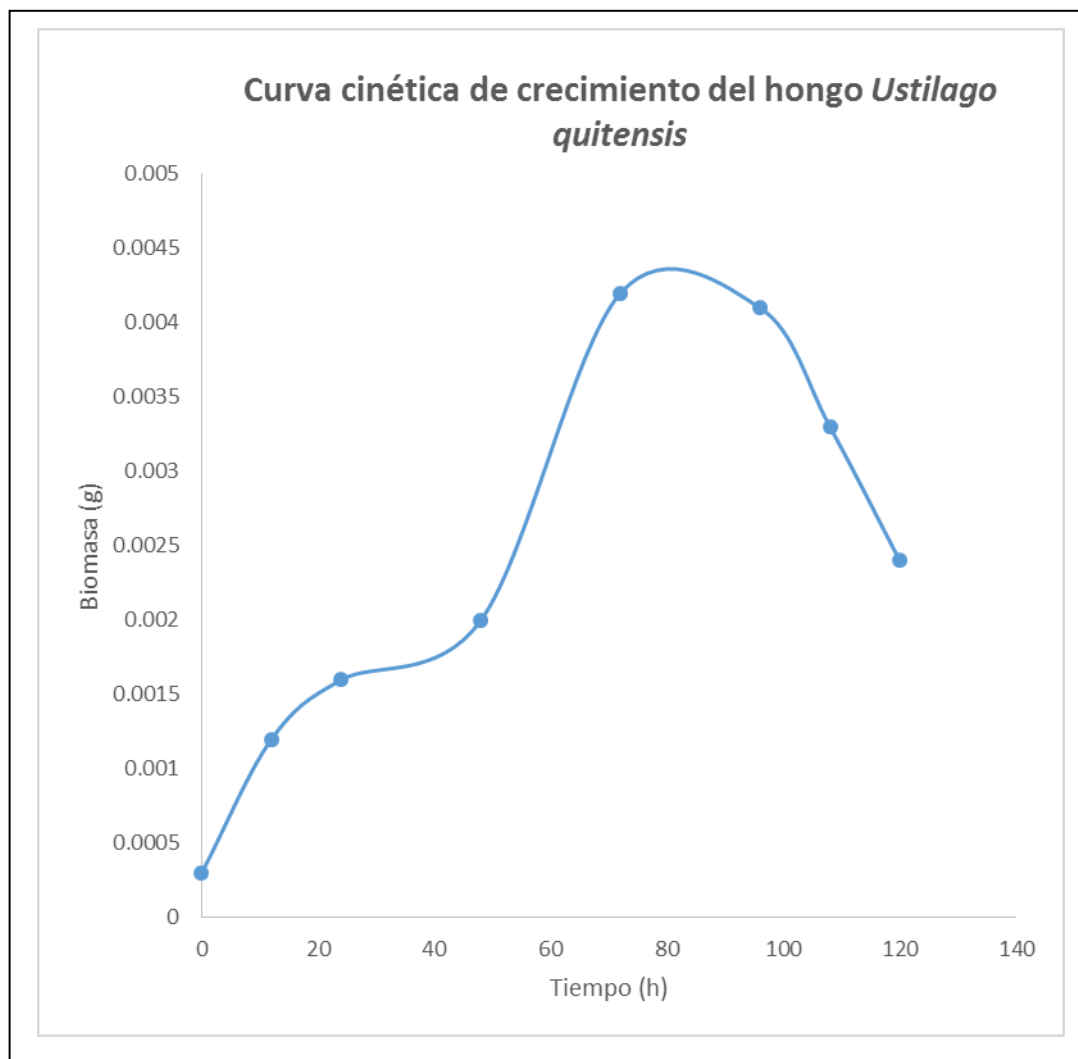
### ANEXO 7. Biomasa

Datos obtenidos de la medición de biomasa (g) en peso seco con sus respectivas repeticiones. Se detalla que se hizo tomo la muestra de biomasa cada 12 horas durante 120 horas

Tiempo	Repeticiones			Promedio	Desv Est.
	M4	M4R	M4R1		
0	0.0002	0.0003	0.0004	0.0003	0.0001
12	0.0011	0.0012	0.0012	0.0012	0.0001
24	0.0021	0.0014	0.0014	0.0016	0.0004
48	0.0022	0.0015	0.0022	0.0020	0.0004
72	0.005	0.0041	0.0034	0.0042	0.0008
96	0.0051	0.0039	0.0032	0.0041	0.0010
108	0.0047	0.0022	0.0031	0.0033	0.0013
120	0.0022	0.0027	0.0022	0.0024	0.0003

### ANEXO 8. Representación cinética de crecimiento del hongo *Ustilago quitensis*.

En la siguiente gráfica se observa la curva de crecimiento del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* durante 120 horas.



**ANEXO 9. Inoculación del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* en diferentes partes de la planta.**

Fotografías de las plantas inoculadas con el hongo fitopatógeno por dos diferentes métodos (aspersión y directo). Los hongos carbonces muestran una estricta especificidad en el hospedero.





Figura 19. Inoculación día 1 con los diferentes métodos

Inoculación Método de aspersión en inflorescencia diferentes concentraciones día 1

<p>Concentración 1 inflorescencia inoculada método de aspersión día 1.</p>	<p>Concentración 2 inflorescencia inoculada método de aspersión día 1.</p>
	
<p>Concentración 3 inflorescencia inoculada método de aspersión día 1.</p>	<p>Concentración 4 inflorescencia inoculada método de aspersión día 1.</p>
	

## Inflorescencia

### Método de aspersión en inflorescencia 30 días

<p>Concentración 1 inflorescencia inoculada método de aspersión día 30. (94% incidencia)</p>	<p>Concentración 2 inflorescencia inoculada método de aspersión día 30 (62% de incidencia)</p>
 A close-up photograph showing a person's hand holding a rice panicle. The panicle is heavily covered with small, white, fuzzy structures, indicating a high incidence of inflorescence. The background shows green rice leaves.	 A photograph of a rice panicle in a field. The panicle is covered with white, fuzzy structures, but the incidence appears lower than in the first image. Blue lines are visible in the background, likely marking the experimental plots.



### Método de aspersión en hojas

<p>Concentración 1 hojas inoculadas método de aspersión día 30. (50% de incidencia)</p>	<p>Concentración 2 hojas inoculadas método de aspersión día 30. (37% de incidencia)</p>
	

Método directo por inyección a los 30 días.

Concentración 1 inflorescencia  
inoculada (44% de incidencia) día 30.



Concentración 1 hojas inoculadas  
(18% de incidencia) día 30.



## **ANEXO 10. Protocolo de incidencia del hongo *Ustilago quitensis***

Protocolo para la determinación de la incidencia del hongo *Ustilago quitensis* como potencial agente de biocontrol.

**Título:** Incidencia del hongo fitopatógeno *Ustilago quitensis* como potencial agente de biocontrol.

### **Introducción**

El control biológico es una alternativa amigable con el medio ambiente donde se utiliza microorganismos que colaboran a controlar la propagación invasiva de malezas, plagas.

### **Objetivo**

Establecer un protocolo para la determinación de la incidencia del hongo *Ustilago quitensis* como potencial agente de biocontrol.

### **Procedimiento**

- Aislar el hongo *Ustilago quitensis* de las inflorescencias de las plantas *Cortaderia jubata*.
- Suspender la muestra de la inflorescencia infectada en 100 uL de agua estéril en un tubo eppendorf 1.5 mL.
- Inocular el hongo fitopatógeno en medio sólido durante 24 horas para activar la cepa a 25 ° C.
- Luego tomar una muestra con un asa estéril de la cepa activada e inocular en medio sólido compuesto por: PDA y el antibiótico estreptomina a 25 °C durante 2 días.
- Trasladar al hongo fitopatógeno del medio solido a medio líquido PDB marca Difco Potato Dextrose Broth y dejar en reposo durante tres días a 25 °C.
- Al tercer día, tomar 1 mL del medio líquido en reposo y trasvasar a un matraz con 100 mL de agua estéril.
- Colocar la mezcla del matraz resultante en un atomizador para asperger en diferentes partes de la planta.
- Observar las plantas cada 3 días

**Recomendaciones**

Controlar las condiciones ambientales tales como: luz, temperatura y humedad.

Esto sería posible, incorporando un invernadero en estado cuarentenario.