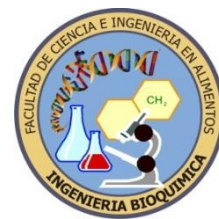




**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE
AMBATO**



**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA
EN ALIMENTOS**

CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

**Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp.
para control biológico de *Fusarium* sp. en
maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *flavicarpa*),
en condiciones *in vitro***

Proyecto de Graduación, modalidad: Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI) presentado como requisito previo a la obtención del Título de Ingeniero Bioquímico otorgado por la Universidad Técnica de Ambato a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.

AUTORA: Ana María Martínez Bolaños

DIRECTOR: Ing. Juan Ramos. MSc.

Ambato – Ecuador

2012

APROBACIÓN DEL TUTOR DE TESIS

Ing. Juan Ramos . MSc.

Siendo el Director del proyecto de Investigación realizado bajo el tema: “ **Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* para control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *flavicarpa*), en condiciones *in vitro*”, por la egresada Ana María Martínez Bolaños, tengo a bien afirmar que el estudio es idóneo y reúne los requisitos de una tesis de grado de Ingeniería Bioquímica; y la egresada posee los méritos suficientes para ser sometido a la evaluación del Jurado examinador que sea designado por el H. Consejo Directivo de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.**

Ambato, Octubre del 2012

.....

Ing. Juan Ramos. MSc

TUTOR DEL PROYECTO

AUTORÍA DE LA TESIS

Los contenidos del presente Trabajo de investigación denominado: **Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. para control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *flavicarpa*), en condiciones *in vitro***”, le corresponden exclusivamente a la Egda. Ana María Martínez Bolaños, e, Ing. Juan Ramos. MSc ; Director del Proyecto de Investigación; que no ha sido presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que se ha consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

Ambato, Octubre del 2012

.....
Egda. Ana María Martínez Bolaños

AUTOR

.....
Ing. Juan Ramos. MSc

TUTOR DEL PROYECTO

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO
UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

Los miembros del Tribunal de Grado aprueban el presente Trabajo de Graduación de acuerdo a las disposiciones emitidas por la Universidad Técnica de Ambato.

Ambato, Octubre del 2012

Para constancia firman:

.....

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Ing. Romel Rivera

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

.....

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DEDICATORIA

A Dios,

Con todo el Amor, Respeto y profunda Admiración a mis queridos padres: Susy y Vidal

A mis hermanos: Ely y Tito

A mi sobrina Salito.

Anita

AGRADECIMIENTOS

A Dios por el sin fin de bendiciones brindadas a lo largo de mi vida por ponerme siempre en el lugar y hora adecuada, por brindarme la oportunidad de culminar una meta.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigación Agropecuarias (INIAP – Estación Experimental Sto. Domingo), Ingenieras Mercedes Navarrete, Diana Lara, Silvia Zambrano, Ceci Solórzano y al Ingeniero Xavier Chiriboga por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de titulación, por compartir parte de sus experiencias y conocimientos, Ingeniera Mónica Angamarca por su amistad y confianza, sobre todo por el apoyo brindado en épocas difíciles.

A mi Tutor de Tesis Ingeniero Juan Ramos por su confianza, por el apoyo incondicional y ser la guía en el desarrollo de mi trabajo de investigación,

A mis tíos, primos, abuelita “Lida”, por el apoyo que siempre me han brindado, por las horas felices que compartimos, por estar persistentemente junto a mí.

A mis padres Vidal y Susy, por ser mi fuente inagotable de energía, por no dejarme rendir, por su confianza, por ser mi apoyo incondicional, por haberme enseñado a soñar, por estar junto a mí en el antagonismo y patogenicidad, por ser mi ejemplo de amor, superación y lucha en la adversidad, por exigirme siempre a dar lo mejor de mí, por dejarme ser quien soy.

A Ely por ser un digno ejemplo a seguir, por ser mi apoyo en días de tristeza por siempre querer lo mejor para mí, gracias por ser confidente, amiga y hermana.

A Salito por ser mi rayito de luz brindándome la calidez mágica de su tierna sonrisa.

Gracias Tito, por los días interminables de sueños, travesuras y consejos.

De manera muy especial a los “Montoyitas”, por recibirme en su hogar y hacerme sentir parte de él.

A Fer, Nancy, Cronsh, Kary, Javi, Qma, Gaby’s, sobre todo a Belén Q, Lili, Ricky, Iván por el afecto, amistad y tiempo compartido, a Luis por brindarme su cariño y adhesión, a Jhon por dejarme una lección de amistad eterna y verdadera.

Anita

PÁGINAS PRELIMINARES

Página de Título o portada.....	i
Página de aprobación por el Tutor.....	ii
Página autoría de Tesis.....	iii
Página de aprobación del Tribunal de Grado.....	iv
Página de dedicatoria.....	v
Página de agradecimiento.....	vi
Índice general de contenidos.....	vii
Resumen ejecutivo.....	x
Introducción.....	xii

Índice General de Contenidos

CAPITULO I	1
EL PROBLEMA DE INVESTIGACION	1
1.1 Tema de Investigación.....	1
1.2 Planteamiento del problema.....	1
1.2.2 Árbol de Problemas	6
1.2.2.1. Análisis Crítico.....	7
1.2.3 Prognosis	7
1.2.4 Formulación del problema.....	8
1.2.5 Preguntas directrices.....	8
1.2.6 Delimitación del problema de investigación.....	8
1.3 Justificación.....	9
1.4 Objetivos	9
CAPITULO II	11
MARCO TEORICO	11
2.1 Contenido	11
2.2 Fundamentación filosófica	12
2.3 Fundamentación Teórico Científica.....	14
2.4 Fundamentación legal.....	30
2.5 Categorías fundamentales.....	33
2.6 Hipótesis.....	49

2.7 Señalamiento de variables	49
CAPITULO III.....	50
METODOLOGIA	50
3.1 Enfoque	50
3.2 Modalidad básica de la investigación	50
3.3 Nivel o tipo de investigación	51
3.4 Población y muestra	51
3.5 Operacionalización de Variables	52
3.6 Recolección de información, procesamiento, análisis e interpretación	54
3.6.2. Aislamiento de microorganismos patógenos y antagonicos.....	55
3.6.3. Caracterización fenotípica de cepas de <i>Fusarium</i> sp. y <i>Trichoderma</i> sp.	56
3.6.4. Evaluación de <i>Fusarium</i> sp. en cultivo individual	56
3.6.5 Evaluación de <i>Trichoderma</i> sp., en cultivo individual	57
3.6.5. Prueba de Patogenicidad de <i>Fusarium</i> sp., en plantas de maracuyá.....	59
3.6.6. Capacidad Antagónica de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium</i> sp. en condiciones in vitro	62
CAPITULO IV.....	64
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	64
4.1 Aislamiento, caracterización macroscópica y microscópica de cepas de <i>Fusarium</i> sp. de muestras de material vegetal.....	64
4.2 Aislamiento, caracterización macroscópica y microscópica de cepas de <i>Trichoderma</i> sp. de muestras de suelo	65
4.3. Evaluación de <i>Fusarium</i> sp. en cultivo individual	66
4.4 Evaluación de <i>Trichoderma</i> sp. en cultivo individual.....	66
4.5. Prueba de Patogenicidad de <i>Fusarium</i> sp. en plántulas de maracuyá.	68
4.5.1 Severidad de la planta.....	68
4.6. Capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Fusarium</i> sp. en condiciones <i>in vitro</i> . ..	70
4.7. Verificación de la Hipótesis	71
CAPITULO V	72
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	72
5.1 Conclusiones	72
5.2 Recomendaciones.....	73
CAPITULO VI.....	75
PROPUESTA.....	75
6.1 Datos Informativos	75
6.2 Antecedentes de la propuesta.....	76

6.3 Justificación.....	77
6.4 Objetivos	77
6.5 Análisis de factibilidad	78
6.6 Fundamentación	78
6.7 Metodología Modelo Operativo	80
6.8 Administración	84
6.9 Predicción de la Evaluación	87
MATERIALES DE REFERENCIA	88
1. BIBLIOGRAFÍA.....	88
2. ANEXOS	95
ANEXO A.....	96
Tabla A1. Sectores de aislamientos de <i>Fusarium</i> sp.....	97
Cuadro A1. Cuadro de análisis de Varianza, con prueba Tukey al 5%, en la competencia por espacio y nutrientes de <i>Fusarium</i> sp.....	104
<i>Gráfico A1. Diferencia de tratamientos en prueba de Tukey al 5%, en competencia por espacio y nutrientes de Fusarium sp.</i>	104
ANEXO B.....	118
Técnicas de Laboratorio	118
Cuadro B1.- Medio de Cultivo PDA	119
Cuadro B2.- Medio de Cultivo CLA	119
Cuadro B3. Velocidad de Crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. vs. <i>Fusarium</i> sp. en cultivo dual.	119
Cuadro B4.- Postulados de Koch.....	120
Cuadro B5.- Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR).....	120
Cuadro B6. -Clasificación del tipo de Antagonismos según Bell, <i>et al.</i> (1982).....	121
ANEXO C.....	123
TÉCNICAS DE CAMPO.....	123
Cuadro C1. Sustancias permitidas para la producción agrícola orgánica.....	124
Cuadro C2. Incidencia de la Enfermedad	125
Cuadro C3a . Severidad Externa de la Enfermedad- escala de Marchitez (aplicada por Farías, 2005).	125
Cuadro C3a . Severidad Interna de la Enfermedad- escala de Marchitez – Según Orjeda, 1998, aplicada por Caballero, 2011; modificada por Martínez, 2012.	125
Cuadro C4. Diseño del ensayo – Pruebas de Patogenicidad	126
ANEXO D.....	127
FOTOS DE ENSAYOS	127

UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS
CARRERA DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA

TEMA:

Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. para control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *flavicarpa*), en condiciones *in vitro*

AUTOR: Ana Martínez

TUTOR: Ing. Juan Ramos

RESUMEN EJECUTIVO

En el presente Trabajo de Investigación en la modalidad Trabajo Estructurado de Manera Independiente (TEMI), ha sido realizado en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental Sto. Domingo – Área de Protección Vegetal - Laboratorio de Control Biológico.

Se aisló 8 cepas de *Fusarium* sp. de muestras vegetales de plantaciones de maracuyá que presentaron problemas fitosanitarios relacionados con la “marchitez vascular ó secadera”, en el cantón La Concordia, en las parroquias Valle Hermoso, y Viche, de los mismos lugares de muestreo se tomaron muestras vegetales y de suelo para aislar cepas nativas de *Trichoderma* sp., con el fin de ser fitopatógeno *Fusarium* sp.

Mediante utilizadas como posibles controladores biológicos del pruebas de patogenicidad con *Fusarium* sp. en dos variedades de plantas de maracuyá (INIAP – 2009 y Local) , se evaluó escalas de severidad externa e interna de la enfermedad lo cual permito identificar que la cepa FL – 2, es el agente causal de la “marchitez vascular ó secadera”, en el laboratorio de Control Biológico, mediante características macro, microscópicas y morfológicas se identificó la que a especie a la que pertenece la cepa FL – 2, es *Fusarium solani*.

Se evaluó la capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* sp. mediante técnicas de cultivos duales donde se obtuvo como resultado que la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* sp., no se vio afectado por la presencia del fitopatógeno [*Fusarium solani*, pero el patógeno disminuyó su velocidad de crecimiento en presencia de los hongos TSM – 2, TI – 1 y TI- 2, en la evaluación de PICR se obtuvo que en los cultivos duales el hongo *Trichoderma* sp. Produjo menor PICR del fitopatógeno *Fusarium* sp., es el hongo TSA – 1, y en las evaluaciones de clase de antagonismos a la que pertenece *Trichoderma* sp., todos los tratamientos obtuvieron los mismos resultados llegaron al punto

de enfrentamiento con calificación 2, no existió el recubrimiento total del antagonico en la caja Petri con *Fusarium solani*.

INTRODUCCIÓN

El Ecuador se ha convertido en unos de los principales países exportadores de jugo de maracuyá en el mundo, con una producción nacional de 247937 toneladas, presentando una productividad de 8.6 toneladas por hectárea, esta fruta tropical ha sido afectada en los últimos años por el ataque del fitopatógeno *Fusarium*, el cual ataca principalmente a la raíz de la planta causando la enfermedad denominada “marchitez vascular” ó “fusariosis”, esta enfermedad causa pérdidas de cultivos de hasta el 100% en menos de dos años, los fungicidas que se utilizan en la actualidad causan alteraciones en la microbiota del suelo, afecciones a la salud de los agricultores, por lo que se ha optado por investigar alternativas de control eficiente y que contribuya a mantener un desarrollo sustentable con el medio ambiente, seleccionando cepas del hongo *Trichoderma* sp., el cual es conocido por tener una alta capacidad de competitividad por espacio y nutrientes demostrando que es una de las principales características de hongos con eficiente capacidad biocontroladora de patógenos.

Para el desarrollo del presente trabajo se plantea seis capítulos siendo los siguientes.

Capítulo I, EL PROBLEMA que contiene: Tema, planteamiento del problema, contextualización, árbol de problemas, análisis crítico, prognosis, formulación del problema, preguntas directrices, delimitación, justificación y objetivos.

Capítulo II, MARCO TEORICO que contiene: Antecedentes investigativos, fundamentaciones, categorías fundamentales, constelación de ideas conceptuales de la variable independiente y dependiente, hipótesis, y señalamiento de variables.

Capítulo III, METODOLOGÍA que contiene: Enfoque, modalidad básica de la investigación, nivel o tipo de investigación, población y muestra, operacionalización de variables, recolección de información, procesamiento, análisis e interpretación.

Capítulo IV, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Capítulo V, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Capítulo VI, PROPUESTA que contiene: Título, datos informativos, antecedentes investigativos, justificación, objetivos, análisis de factibilidad, metodología, plan operativo, administración de la propuesta, previsión de evaluación.

Finalmente se reporta la Bibliografía y Anexos

CAPITULO I

EL PROBLEMA DE INVESTIGACION

1.1 Tema de Investigación

Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. para control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *flavicarpa*), en condiciones *in vitro*.

1.2 Planteamiento del problema

El cultivo de Maracuyá es de gran importancia para el Ecuador pues hasta el momento se ha convertido en uno de los principales exportadores de jugo concentrado de maracuyá a países de la Unión Europea, Estados Unidos, Puerto Rico, República Dominicana, Japón, Colombia y Sudáfrica (Galindo F, Villavicencio M, 2000), ya que el 13% del concentrado de maracuyá importada en el mundo es Ecuatoriana.

Puede haber muchos factores que contribuyen a la reducción de la longevidad y la productividad en las plantas de la fruta de la pasión. (Fischer, I. Rezende, J., 2008), provocada principalmente por problemas fitosanitarios (Roog H.,2000). Constituyéndose así a la marchitez ó secadera como causantes de la principal enfermedad que afecta a los cultivos de Maracuyá (Torres, et al., 2000), provocada por los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani* (Corpoica 2006), mencionado por Cubillos (2008), ocasionando clorosis foliar leve, seguida de marchitamiento generalizado, necrosis foliar, secamiento total, posterior defoliación y pudrición a nivel radicular, provocando graves pérdidas bajo condiciones ambientales favorables para el hongo y la ausencia de control preventivo. (Fischer, I. Rezende, J., 2008). Según Wasilwa et al. (2004), mencionado por Fisher,I et al, (2008), el aumento de la incidencia de la enfermedad fusariosis, secadera ó

marchitez, resultante del cultivo continuo en algunas áreas puede causar disminución del rendimiento del 40-60%, provocando pérdidas económicas que afectan a los productores, los cuales como solución a las mismas deciden dejar a un lado el cultivo de Maracuyá y dedicarse a otros productos de importancia económica en la zona, causando un desequilibrio financiero para el Ecuador como país exportador mundial de Maracuyá.

Hasta hoy el control de las enfermedades se basan en prácticas de manejo convencional que resultan costosas para los agricultores, teniendo que recurrir a la aplicación de fungicidas que a veces resultan ineficientes, incrementan los costos de producción, contribuyen a la contaminación ambiental y deterioran la biota del suelo (Cubillos, et al., 2008).

Según Benitez, *et al.*, (2004), mencionado por Cruz, L.,(2007). La persistencia de varias de las especies de hongos fitopatógenos tales como *Phythium*, *Phytophthora*, *Botrytis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia* y *Fusarium* ha aumentado durante los últimos años debido a los cambios que se han presentado en las prácticas agrícolas; principalmente por el uso indiscriminado de químicos y también por la contaminación que se origina a causa de su empleo, con efectos perjudiciales no solo sobre los cultivos de importancia económica sino sobre los demás organismos, a través de la adquisición de resistencia a las estrategias desarrolladas en los últimos años para su control.

1.2.1 Contextualización

1.2.1.1 Macro Contexto

Según estimaciones de la FAO, la agricultura mundial pierde cada año el 12% de su producción por daños causados por hongos fitopatógenos, más que por cualquier otro agente. Estos daños se producen a pesar de la masiva utilización de fungicidas cuyo mercado global supera anualmente los 20.000 millones de dólares. El género *Fusarium* pertenece a los Ascomicetos y comprende especies que se caracterizan por la presencia de macroconidios fusiformes. Algunas de ellas son importantes patógenos de plantas o productores de micotoxinas contaminantes de alimentos. *F. oxysporum* es la especie más común de este género. No tiene fase sexual conocida pero el grupo teleomórfico más cercano es *Gibberella* que está clasificado dentro de los Pyrenomycetos. *F. oxysporum* es un

habitante del suelo, temido por los agricultores en todo el mundo por ser causante de la fusariosis vascular, según (González et al., 2002). a la pudrición seca ó secadera de diferentes cultivos también se le asocia a *Fusarium solani* el cual ocasiona una muerte prematura de la planta por marchitamiento, al que también se asocia la obstrucción de haces vasculares, clorosis foliar leve, posterior defoliación y pudrición a nivel radical.

Diferentes plantas hospederas son atacada por formas especiales (Agrios, 2000), constituyendo las enfermedades de gran interés en la agricultura dado a su amplísima distribución a nivel mundial y el alto número de especies vegetales de importancia económica que las padecen (Palomares, 2009). Entre las enfermedades por *Fusarium* que han cusan grandes pérdidas en cultivos de interés económico a nivel mundial es importante mencionar algunos de ellos: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* teniendo como hospedero al banano (*Mussa spp.*) que causa la enfermedad conocida como el Mal de Panamá ocasionó severos daños a mediados del siglo pasado en la producción del cultivar ‘Gros Michel’, principal banano de exportación que fue sustituido con cultivarse de Cavendish junto con importantes transformaciones de la industria de la exportación bananera.(Pérez - Vicente, 2004). *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, que causa la marchitez en frijoles, puede causar pérdidas de hasta el 100% en cultivares susceptibles, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causa la marchitez del tomate, ;en el año 1999 en Perú se realizó evaluaciones periódica para determinar la incidencia de la marchitez sobre el rendimiento algodónero Pima a cusa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* en en los campos con mayor incidencia de la enfermedad esta pérdida alcanzó los 978 kg/ha. Las pérdidas estimadas en las 11,680 ha sembradas representaron 454,883 dólares americanos, (Maldonado, et al., 2003), *Fusarium oxysporum* f. sp. *passiflorae* agente causal de la marchitez vascular, secadera o fusariosis en Pasifloras (*Passiflora spp.*),provoca la disminución del rendimiento del 40-60% (*Fischer et al., 2008*).

La marchitez causada por fusarium en pasiflora fue reportada por primer vez en *Australia en 1951 (McKnight 1951)*, esta enfermedad llego a extenderse ampliamente afectando la fruta de la pasión purpura en huertos comerciales (*P. el edulis*). La marchitez también se ha reporto en Brasil (Carvalho y Carvalho 1968), Panamá (Esquivel y Labrador 1977), Africa

Sur (Grech y Rijkenberg 1991) y Venezuela (Bautista y Salas 1995), mencionado por Fisher et al, 2008. En Colombia se considera que los hongos causantes de la enfermedad conocida como marchitez o secadera son *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, esta enfermedad ha ocasionado pérdidas de hasta el 30% de producción anual (Corpioca, 2006), mencionado por (Cubillos, 2008), siendo esta la principal enfermedad que afecta a los cultivos de Maracuyá, tal como el caso en Colombia existen registros de que esta enfermedad ocasionó, en el norte del Valle del Cauca, entre el 90 y el 100% de muerte a plantas en el periodo de 1997- 1999 (Torres et al., 2000).

1.2.1.2 Meso Contexto

En el Ecuador *Fusarium* sp. es el agente causal de la enfermedad conocida como marchitez vascular, secadera o fusariosis en la maracuyá, sin reportarse hasta el momento de la especie del fitopatógeno. No existen medidas de combate químico eficientes de la enfermedad, ni buenas prácticas culturales que reduzcan su incidencia y severidad, por lo que se busca fuentes naturales de resistencia al patógeno, siendo una de estas fuentes el control biológico con especies de *Trichoderma* desde 1930. Según (Matsumoto et al., 1999; Cárdenas 2001; Zambrano et al., 2007), mencionado por Caballero (2011).

Fusariosis o marchitez vascular es la enfermedad que ocasiona clorosis foliar leve, seguida de marchitamiento generalizado, necrosis foliar, secamiento total y muerte, cobro mayor incidencia luego del fenómeno de El Niño que redujo la producción debido al exceso de humedad y temperatura convirtiéndose en un ambiente propicio que favorece a la propagación del fitopatógeno, afectando alrededor de 15000 pequeños productores. Hasta el momento el control químico ha sido la única alternativa utilizada por los productores, realizando aplicaciones de fungicidas como Vitavax y Furadan cada 15 días, afectando así a microorganismos patógenos y benéficos del suelo; según Ploetz (1994), mencionado por Cubillos (2008).

1.2.1.3 Micro Contexto

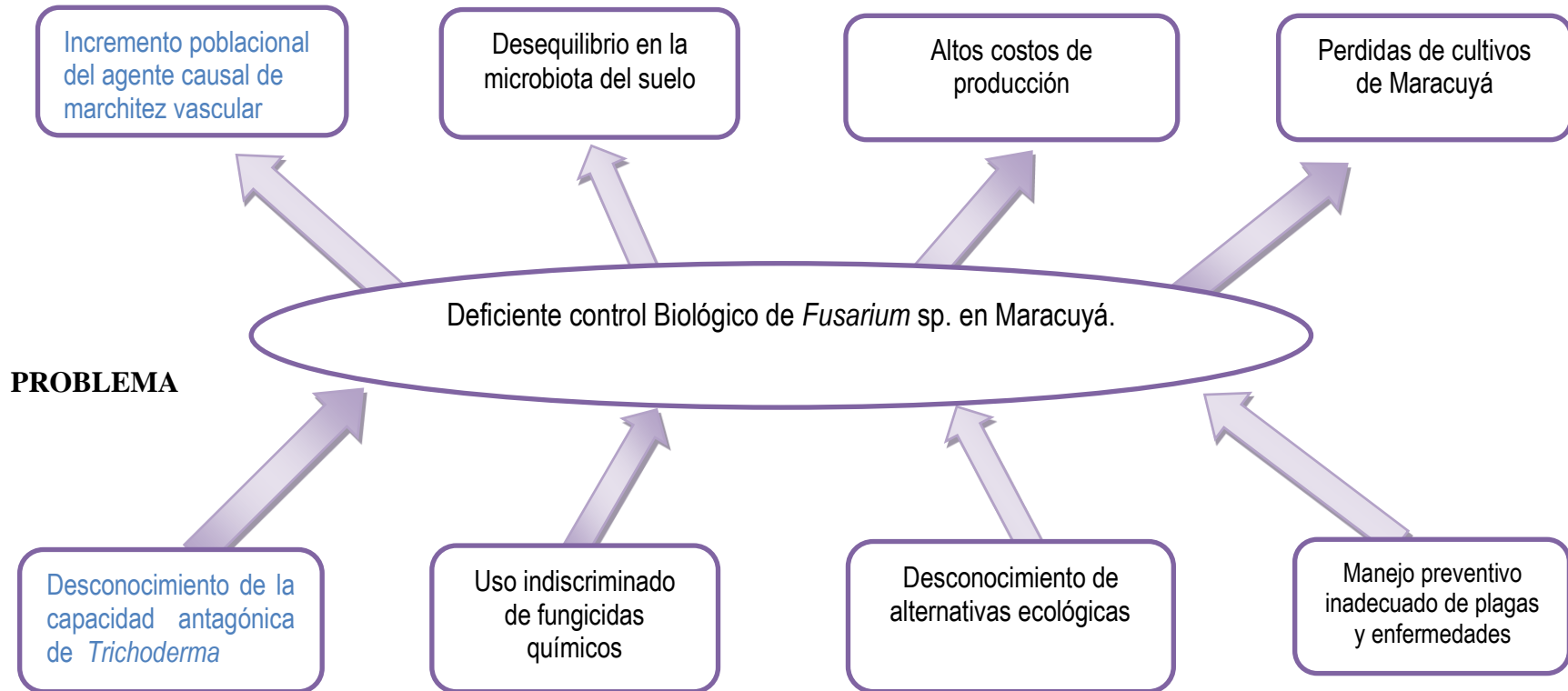
En la zona productora de la Provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas existe cerca de 5000 ha. productivas de maracuyá, (ESPAC, 2009). Las cuales has sido afectadas por presencia del hongo *Fusarium* sp. la intensidad de los daños o pérdidas causadas no se

refleja en todos los cultivos de igual modo. En esta zonas se realizó la evaluación y sistematización de la información técnica sobre el cultivo de maracuyá de la nueva variedad “Maracuyá Mejorada INIAP 2009” y las prácticas como siembra, fertilización, podas y control de enfermedades, donde la nueva variedad registra una producción sobre las 30 toneladas métricas por hectárea y es el resultado de investigaciones de más de dos años con materiales introducidos desde el Embrapa de Brasil, de los cuales se seleccionó una de sus mejores líneas que presenta características de alta productividad, pero no presento resistencia al hongo *Fusarium*.

Existen nuevas poblaciones de maracuyá obtenidas a partir de materiales introducidos desde Brasil por medio de un convenio interinstitucional INIAP – Embrapa, generan grandes expectativas entre investigadores que evalúan características de alta productividad, el objetivo que persiguen los Fito - mejoradores del INIAP entre ellos el Ing. Valarezo Alfonso magister en mejoramiento genético, es de obtener nuevos materiales que a más de reunir características superiores de productividad, posean resistencia a las principales enfermedades que afectan a este cultivo, en especial contra *Fusarium*, principal enfermedad que afecta la productividad y rentabilidad de este cultivo.

1.2.2 Árbol de Problemas

EFEECTO



CAUSA

Gráficos N° 1.- Relación Causa – Efecto

Elaborado por: Ana Martínez

1.2.2.1. Análisis Crítico

El problema del deficiente control Biológico de *Fusarium* sp. en Maracuyá, es causado por el desconocimiento de la capacidad antagónica de *Trichoderma*, lo cual ha conllevado como efecto a que se produzca el incremento poblacional del agente causal de la marchitez vascular.

El problema del deficiente control Biológico de *Fusarium* sp. en Maracuyá, tiene como causa el uso indiscriminado de fungicidas químicos y como efecto el desequilibrio en la microbiota del suelo.

El desconocimiento de alternativas ecológicas, conlleva como efecto los altos costos de producción en la agricultura, manteniendo el problema del deficiente control Biológico de *Fusarium* sp. en Maracuyá.

A causa del manejo preventivo inadecuado de plagas y enfermedades se ha producido como efecto pérdidas de cultivo de Maracuyá, ocasionando el problema del deficiente control Biológico de *Fusarium* sp. En Maracuyá.

1.2.3 Prognosis

Al no realizarse la presente investigación no se contará con un reporte evidente de la especie *Fusarium* sp., agente causal de la marchitez vascular, fusariosis o secadera de la maracuyá en el Ecuador, llegando a afectar a los laboratorios que se encargan de establecer normas de calidad alimentaria, impidiendo el “fortalecimiento institucional y la Ley de Sanidad Vegetal” de los mismos.

Se perdería la oportunidad de aportar con resultados de investigaciones efectivas y por ende brindando alternativas agroecológicas y tecnologías sustentables, mediante el estudio, producción, y aplicación de hongos antagónicos como tal es el caso de *Trichoderma* sp., llegando a establecer un modelo patrón a seguir sin afectar a los suelos utilizados para estos cultivos que perderán valor biológico, si se sigue conservando prácticas inconscientes de control químico de enfermedades.

1.2.4 Formulación del problema

¿Cómo influye la evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. en el control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis* variedad *flavicarpa*), en condiciones *in vitro*?

1.2.5 Preguntas directrices

¿Será posible realizar la evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp.?

¿Será posible realizar el control biológico de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*?

¿Qué métodos permitirán evaluar la capacidad antagonica de las cepas de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno *Fusarium*, en condiciones *in vitro*?

¿Será posible aislar cepas de *Fusarium* sp. de plantas de maracuyá,?

¿Bajo qué características se realizara la caracterización morfológica de cepas fitopatógeno *Fusarium* sp., causante de la marchitez vascular?

1.2.6 Delimitación del problema de investigación

Delimitación del contenido

Campo: Microbiología

Área: Aislamiento de cepas de *Fusarium* sp. de plantas de maracuyá.

Aspecto: Caracterización morfológica de cepas de *Fusarium* sp., causante de la marchitez vascular.

Delimitación espacial:

El presente trabajo de Investigación se realizará en el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Departamento de Protección Vegetal, Laboratorio de Control Biológico, Ubicado en la Provincia de Sto. Domingo de los Tsáchilas, Cantón La Concordia.

Delimitación temporal: Enero - Agosto 2012

1.3 Justificación

La búsqueda insaciable por mantener un equilibrio y desarrollo sustentable con la naturaleza nos ha lanzado a la humanidad a la intrépida exploración y aplicación de nuevas alternativas ecológicas que conlleven a la creación de nuevas tecnologías eficientes, con prioridad en la investigación participativa, involucrando saberes ancestrales, utilizando material biológico y especies vegetales nativas, que nos brinden la posibilidad de realizar investigaciones y el resultado de estas hacerlas fácilmente aplicables a el entorno en el que la necesidad la requiera, recibiendo aportes de otros investigadores, y de aquel que posea conocimientos.

Sin olvidar que el objetivo principal es el de dar la oportunidad de proveer conocimientos, enseñanzas, e ideas nuevas, y el trabajo en equipo.

En el presente proyecto mediante el aislamiento de cepas nativas de hongos biocontroladores *Trichoderma* sp., y la realización de evaluaciones de antagonismo contra *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro* se seleccionará la cepa con mejores características controladoras para en un futuro llevar a cabo evaluaciones en invernadero con aplicaciones de *Trichoderma* a plantas de maracuyá, con el fin de beneficiar a 15000 pequeños productores, en cuanto a mejoras de producción y prevención de la enfermedad “marchitez vascular”. Por medio de la identificación de la especie del fitopatógeno *Fusarium* sp., agente causal de la enfermedad marchitez vascular en maracuyá, y selección de biocontrolador se espera aportar al conocimiento de investigadores, estudiantes y productores en lo referente a control biológico, lo que permitirá obtener como resultado el conocimiento de la biología de los patógenos y los procesos reproductivos.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo General

Evaluar y seleccionar cepas de *Trichoderma* para control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *flavicarpa*), en condiciones *in vitro*.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Realizar la evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp.
- Realizar el Control Biológico de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*.
- Proponer la evaluación de la capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno *Fusarium*, en condiciones *in vitro*
- Aislar cepas patogénicas de *Fusarium* sp. de material vegetal de plantas maracuyá.
- Identificar la especie de *Fusarium* sp. agente causal de la marchitez vascular.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

2.1 Contenido

2.1.1 Antecedentes investigativos

Trichoderma spp. se ha utilizado como controlador de enfermedades de tomate, melón y algodón (Silva *et al.*, 1987), mencionado por Castillo (2004) sin embargo el primero en demostrar el control exitoso de la pudrición de la raíz y la corona en tomate con este biocontrolador fue Morois *et al.* (1981). mencionado por Castillo (2004).

En Chile, se demostró que *T. harzianum* cepa nativa Queule presentó una alta eficiencia protectora sobre *Fusarium solani*, con un 70% de sobrevivencia de plantas de tomate, siendo siempre superior a la entregada por la formulación comercial *T. harzianum* Trichodex, la cual alcanzo un 40% de sobrevivencia.

Obreque (2004), determinó que la aplicación de concentraciones de 10^8 y 10^9 conidias ml^{-1} fueron los más efectivos en el control preventivo de *Fusarium* sp., en plantas de cinco meses de *Leucadendron* 'Safari Sunset', cultivar perteneciente a la familia Proteaceae; observándose una incidencia de la enfermedad menor a 20% e índices de severidad con valor 1 o inferior, equivalentes a marchitez o sin marchitez.

Arzate *et al.* (2006), Seleccionaron 8 cepas de *Trichoderma* spp., para evaluar su capacidad antagonica en condiciones in vitro sobre *Mycospharella fijiensis*, causante de la sigatoka negra en banano donde seis de las cepas se ubicaron el clase 1 de antagonismo, donde

Trichoderma spp. creció sobre el patógeno, cubriendo el 100% del medio de cultivo, mientras que dos cepas presentaron antagonismo de clase 3, donde ninguno de los dos hongos fue dominante; mientras que en fase de invernadero, dos de las seis cepas de clase 1 de antagonismo presentaron porcentajes ponderados de infección con 0.70 y 0.88%, sobre el desarrollo de *M. fijiensis*.

Caballero (2011) seleccionó aislamientos de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 donde obtuvo como resultados que veinte hongos endofíticos *Trichoderma* inhibieron el crecimiento radial de FOC hasta en un 53,46% en comparación con los testigos referenciales.

En el bioensayo de biocontrol, la mayoría de los tratamientos presentaron los primeros síntomas al final de la tercera semana. Plantas protegidas con hongos endofíticos retrasaron la aparición de la enfermedad hasta la cuarta semana. Así mismo hongos endofíticos redujeron desde un 92% hasta 90% los síntomas externos en comparación a los testigos referenciales. Los síntomas internos del cormo se redujeron hasta un 74% por el hongo endofítico *Trichoderma*.

Fernández, *et al.*, (2009) evaluaron *T. harzianum* tres cepas comerciales y tres cepas nativas aisladas de suelo cultivado con palma aceitera los cuales presentaron un modo de acción favorable por competencia de nutrientes y espacio, ya que crecen rápidamente, superando el crecimiento de *F. oxysporum*, impidiendo el desarrollo normal e inhibiendo en más del 50% el desarrollo de este, sin diferencias significativas al comparar los aislamientos comerciales y nativos; sin embargo, por la naturaleza autóctona del aislamiento TCN-009 resultó, a nivel in vitro, más promisorio para la búsqueda de un antagonista en el control de *F. oxysporum* en regiones agroclimáticas similares a la Zona Bananera del Magdalena.

2.2 Fundamentación filosófica

Como su nombre indica, la “filosofía analítica” hace del análisis su método de investigación por excelencia, enfocándolo ante todo al campo del lenguaje, pues en el seno de este movimiento no son pocos los que sostienen que gran parte de los problemas filosóficos consisten en y se solucionan por un adecuado tratamiento analítico del lenguaje.

La filosofía, más que los hechos, de los que nos informa suficientemente el sentido común y cuya naturaleza estudian las ciencias, debe simplemente clarificar el lenguaje y detectar sus posibles defectos. La tarea del filósofo ha de ser, pues, de carácter lingüístico y lógico. La filosofía analítica se caracteriza, por tanto, como un análisis de las estructuras lógicas del pensamiento y del lenguaje.

La continuación directa de estas tesis llevan al Neopositivismo o Positivismo lógico: una de cuyas figuras centrales es R. Carnap: desde los principios del “Tractatus logico-philosophicus” de Wittgenstein, proponen una filosofía “científica”, basada en hechos, afirman las ciencias experimentales y niegan la metafísica, que no es ciencia y carece de interés. La filosofía ha de limitarse al análisis de los métodos y resultados de las ciencias. En otras palabras, el positivismo lógico postula un empirismo antimetafísico tendente al análisis lógico y lingüístico de las proposiciones del lenguaje común y científico. Lo esencial del positivismo lógico se resume, pues, en: No hay más que dos clases de proposiciones que tengan significado: las analíticas (propias de las matemáticas y la lógica) y las sintéticas (propias de las ciencias naturales). El resto de proposiciones carece de significado cognoscitivo. Según la Nueva Enciclopedia Larousse "Tendencia científica y filosófica de la segunda mitad del siglo XIX que se caracteriza por la atención exclusiva a los hechos, prescindiendo de cualquier postulado no verificable".

El negativismo de F. Nietzsche, desconfía del intelectualismo, cuyo engaño ya aparece en el lenguaje, toda palabra se convierte en un concepto en el momento en que deja de servir justamente para la vivencia original, única e individualizada. La filosofía tradicional considera el ser como algo estático, fijo e inmutable, abstracto, pero ese ser no existe. Sócrates hizo triunfar la razón contra la vida, Platón creó otro mundo desvalorizando el mundo real, cuando Nietzsche cree que solo es real este mundo en que vivimos. Contraponiendo un mundo eterno, verdadero y bueno al mundo sensible, aparente, pasajero y engañoso, y llamando “bueno” y “sabio” al hombre que mira lo ideal, se promueve la negación de la vida.

La presente investigación se basará en los dos tipos de investigación filosófica del positivismo o cuantitativa, la cual podrá demostrar en base a cálculos de porcentajes de

inhibición de crecimiento radial, velocidades de crecimiento de los microorganismos, se armara la curva de avance de la enfermedad.

Investigación filosófica del negativismo o cualitativa, mediante este paradigma se podrá determinar la especie del fitopatógeno que causa la marchitez vascular en maracuyá.

2.3 Fundamentación Teórico Científica

2.3.1 Maracuyá

La maracuyá es una planta tropical del género *Passiflora*, cuya especie mayor cultivada es la maracuyá amarilla. (Hafle *et a.*2010),mencionado por Rocha *et al.*,(2011).

Es un bejuco leñoso, trepador perenne, de tallos redondos y enteros, hojas ovadas-oblongas, gruesas, de unos 5-8 cm. de largas. Los tallos, hojas y zarcillos presentan un color rojizo, rosado o púrpura, los frutos son redondos u ovoides de 3-7 cm. de diámetro, con cáscara dura de 3-10 Mm. de grosor. En su madurez son de color amarillo claro, la pulpa es blanca amarillenta y agrídulce con múltiples semillas de color negro.

En todo el mundo el maracuyá es también muy conocido como fruto de la pasión, no por ser un afrodisiaco o tener alguna propiedad parecida a ello, sino que su flor contiene los símbolos de la Pasión de Cristo, teniendo entonces un origen religioso esta designación. La flor del maracuyá, *flor de las cinco yagas, flor passionis o flor de la pasión* simboliza en los estigmas los tres clavos de la cruz, en los estambres las cinco heridas y en los filamentos de la corona de espinas los cinco sépalos y cinco pétalos representan los 10 apóstoles presentes en el martirio, los zarcillos axilares como las cuerdas de los azotes, mientras que la forma del fruto se refiere al mundo que se iba a redimir. Al notar los misioneros españoles los instrumentos de la Pasión de Cristo en la exótica flor de maracuyá, ésta se convirtió en uno de los elementos de la doctrina católica para explicar a los indígenas como se había presentado la Pasión de Cristo. Con tales antecedentes, en 1906, Jacomo Bosio en Bolonia, Italia escribió un tratado en tono profético de acuerdo al significado de la flor, Dios reflejaba su cruz y su calvario a los indígenas del nuevo mundo. Como resucitado de la fe Cristiana, la flor del maracuyá y su fruto inundaron el mundo para convertirse poco

después en la llamada Pasionaria, de ahí también que la familia botánica a la cual pertenece haya sido nombrada *Passifloras*. (Gómez *et al*, 1995), (Tabla 1).

Tabla 1.- Clasificación Botánica de la maracuyá, según Strasburger (1974), mencionado por Manotoa (1997)

Reino	Vegetal
División	Espermatophyta
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Orden	Passiflorales
Familia	Passifloracea
Genero	Passiflora
Especie	Edulis
Variedades	Flavicarpa
Nombre Científico	<i>Passiflora edulis</i> var. <i>flavicarpa</i>

Fuente: Manotoa (1997).

La maracuyá es originaria de la región amazónica probablemente del Brasil. (TERRANOVA, 1995) mencionado por Manotoa (1997). El cultivo de Maracuyá en el Ecuador es relativamente nuevo. Según Akamine (1974), mencionado por Manotoa (1997), las primeras semillas de la variedad *Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*, fue introducida al Ecuador en el año de 1963. Estas semillas fueron sembradas inicialmente en el jardín de una residencia privada en el barrio del Seguro al Sur de Guayaquil, en la hacienda “La María”, del Dr. Carlos Luis Plaza Dañin, situada en la vía Duran – Tambo; en la hacienda “El Ruidoso” del señor Segundo Lima Castillo y en la hacienda “Victoria” del señor Luis Criollo, situada en la parroquia Manuel. J. Calle. Posteriormente la planta se diseminó por varias zonas del Litoral.

A partir de estos cultivos ornamentales se inició el consumo doméstico de la fruta que posteriormente, ingresó en pequeñas escalas a los mercados locales urbanos adquiriendo alguna importancia económica del cultivo. Algunos agricultores de las provincias de Manabí, los Ríos, Pichincha, Bolívar, establecieron un incipiente mercado interno. Al incrementarse paulatinamente la demanda de la fruta, se incrementó también la superficie

cultivada, lo cual unido a la demanda externa, determino que en el año de 1986 se realizaran los primeros esfuerzos por ingresar al mercado internacional de jugo concentrado. Es así que el país exporta en el año de 1987, 800 Tm; y en el año 1990 ; 1485 Tm, 2010 convirtiéndose en el segundo país en el mundo después de Colombia, exportador de jugo concentrado de Maracuyá, (FEDEXPORT – PROEXANT, 1992), mencionado por Manotoa (1997).

En la actualidad como datos provisionales el MAGAP (2010), informa la existencia aproximada de una superficie de 28481 ha de Maracuyá sembrada, con una productividad promedio de 6, 82 Tm/ha, explotados por alrededor de 15000 pequeños productores, la mayor superficie cultivada de Maracuyá se encuentra localizada en la franja costera del país, que corresponde a las provincias de Los Ríos, Santo Domingo de los Tsáchilas, Manabí, Esmeraldas, Guayas y Santa Elena (Valarezo, 2011).

Los bajos costos de producción del Ecuador sacaron de la competencia a Brasil y Colombia, por cuanto los precios internacionales de la fruta no son óptimos como para invertir grandes sumas de dinero. De ahí que esta ventaja ha hecho que el país coloque 11000 de las 13000 toneladas de concentrados que se consumen a nivel mundial. (Diario HOY, 1998).

La productividad de los cultivos se han visto afectados por la enfermedad “Marchitez vascular”, causada por el hongo *Fusarium* sp., el cual se intentan controlar químicamente. Sin embargo, el empleo permanente de éstos químicos tiene varios inconvenientes: puede causar desequilibrios ecológicos y microbiológicos en el suelo e incluso afectar a corto y largo plazo la salud humana (Michel-Aceves *et al*, 2001). Esto ha promovido la búsqueda de nuevas alternativas de control de enfermedades en los cultivos con el fin de mantener una sustentabilidad con el medio ambiente. Una de estas alternativas es el Control Biológico (CB), el misma que es eficaz, económico y libre de riesgos frente a los crecientes problemas derivados del uso indiscriminado de agroquímicos.

2.3.2 Problemas fitosanitarios de la maracuyá

Según, (Escobar *et al*, 2006), dice que en lo relación al manejo fitosanitario, la siembra intensiva y extensiva de un cultivo incrementa los problemas sanitarios y el maracuyá no escapa a esta situación. Esta es una planta de ciclo largo (18 a 24 meses ó más), período durante el cual está expuesta al ataque de patógenos e insectos dañinos, cuyas poblaciones fluctúan según las condiciones climáticas, suelos y del manejo del cultivo, aunque los agricultores realizan aplicaciones preventivas con productos químicos tipo calendario, con una frecuencia probablemente innecesaria las enfermedades mas conocidas son:, Marchitamiento o Pudrición Seca del Cuello de la Raíz, Mancha Parda, Roña - Costra o Verrugosis, Pudrición de las flores.

- **Mancha parda (*Alternaria sp.*)**

Hongo patógeno que se ubica en las hojas y en los frutos, provocando defoliaciones severas que pueden reducir el ciclo del cultivo. Sobre las hojas, puede detectarse la presencia del hongo, gracias a la aparición de manchas pardo – rojizas. Si se permite que la infección avance, las lesiones crecen, dando origen a una serie de anillos concéntricos

- **Manejo de mancha parda**

Establecer dirección de los surcos en sentido del viento, lo que permite una mayor aireación y mejores condiciones de microclima en el cultivo. Pueden realizarse aspersiones químicas principalmente por el envés del follaje, con fungicidas a base de oxiclورو de cobre o caldo bordelés.

- **Roña o costra (*Cladosporium sp.*)**

Es un hongo que ataca al fruto, deteriorando su aspecto externo y perdiendo por completo su valor comercial. Las lesiones que se observan son círculos ulcerosos irregulares,

levantadas en forma de verruga, con un color pardo característico, lesiones que se distribuyen aisladamente.

- **Manejo de roña**

Aplicaciones con sulfato de cobre en mezcla con cal hidratada en periodos lluviosos, que coinciden con los periodos de formación de frutas, previenen en un alto porcentaje la enfermedad.

- ***Botrytis*, pudrición de las flores**

Botrytis sp., es un hongo que produce podredumbres en la base de los tallos, en brotes, en hojas, en flores y en frutos. El síntoma típico es un micelio esponjoso gris oscuro característico la zona afectada. Las partes afectadas se pudren. Infecta penetrando las esporas por heridas que causan los insectos, el granizo, las rozaduras. Las condiciones óptimas para su desarrollo son temperaturas suaves y humedad alta. Así, el moho gris se extiende con rapidez.

- **Marchitez ó Pudrición seca del cuello de la raíz (*Fusarium sp.*)**

Este hongo del suelo ocasiona el marchitamiento general de la planta, que se inicia por amarillamiento en las hojas. Las plantas se retrasan en su desarrollo.

Una variedad del *Fusarium*, está arrasando las siembras de maracuyá en Ecuador y amenaza seriamente a esa fruta. El hongo, un depredador que puede acabar con una hectárea en 30 días, se ha hecho endémico en la zona y la propagación de la plaga es incontrolable. La solución es crear una especie de maracuyá resistente al hongo mediante manipulación genética, aunque aún se encuentra en investigaciones.

- **Manejo**

Uso de insecticidas biológicos como *Trichoderma lignorum*

2.3.3 La Marchitez vascular en maracuyá (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*).

Los marchitamientos vasculares son enfermedades que encuentran ampliamente distribuidas y son muy destructivas, espectaculares y alarmantes, ya que se manifiesta en un marchitamiento más o menos rápido, empardecimiento y muerte de hojas y vástagos suculentos de algunas plantas, lo cual da como resultado a la muerte de estas últimas. Los marchitamientos se deben a la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilémicos de la planta. En pocas semanas el patógeno puede ocasionar la muerte de plantas completas o de sus órganos que se localizan por arriba del punto de invasión vascular en la mayoría de plantas anuales y algunas perennes, aunque en algunas plantas de este último no mueren sino hasta después de varios años a partir del momento en el que fueron infectadas por el hongo. Por lo común el patógeno continúa propagándose internamente en forma de micelio o conidios a través de los vasos xilémicos hasta que muera toda la planta. En tanto la planta infectada continúe viviendo, el hongo que produce los marchitamientos vasculares se limitan a los tejidos vasculares (xilema) y a algunas células circunvecinas y nunca sale a la superficie de la planta incluso tampoco produce esporas. Solo cuando la enfermedad ocasiona la muerte de una planta infectada, el hongo se propaga hacia otros tejidos y esporula en la planta muerta o sobre la superficie de ésta. (Agrios 2000)

Una de las principales características de *Fusarium oxysporum*, es su sobrevivencia en el suelo, por medio de esporas de resistencia (clamidosporas), las cuales germinan cuando el cultivo es establecido en el terreno, ingresando principalmente por las zonas de crecimiento de la raíz, heridas causadas sea por nematodos y/o por herramientas de uso agrícola

El modo de acción de *Fusarium oxysporum* se da mediante la penetración del patógeno por la zona apical de la raíz a través de las hojas, ó por heridas producidas por el uso de herramientas y cierto tipo de plagas.(Agrios, 2000), al momento de ingreso ocasiona el amarillamiento de las hojas nuevas, marchitamiento general de la planta, llegando a causar la muerte de plantaciones siendo una amenaza potencial para el cultivo (Vásquez; Chacón; 1989). La marchitez por *Fusarium* que también es conocida como marchitez vascular es ocasionada por *Fusarium oxysporum*, es una de las enfermedades que más afectan a la fruta de la pasión mundialmente. Es una enfermedad altamente destructiva con adición de

pérdidas económicas. Una de las principales características de *Fusarium oxysporum*, es su sobrevivencia en el suelo, por medio de esporas de resistencia (clamidosporas), las cuales germinan cuando el cultivo es establecido en el terreno, ingresando principalmente por las zonas de crecimiento de la raíz, heridas causadas sea por nematodos y/o por herramientas de uso agrícola.

La enfermedad ataca al sistema xilemático disminuyendo la impermeabilidad de las paredes vasculares impidiendo la translocación del agua a otras partes de la planta haciendo que las plantas afectadas presentan síntomas como hojas o partes de la planta se marchiten, se debilitan, adquieren una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso, decaen y finalmente se marchitan, se tornan amarillas, empardecen y mueren. Al realizar cortes transversales en los tallos y ramitas infectadas muestran varias zonas cafés decoloradas dispuestas en forma de un anillo completo o interrumpido que consta de tejidos vasculares decolorados (Agrios, 2000). El sistema vascular se oscurece a la raíz, el cuello, el tallo y áreas de la ramita. Cuando son afectadas plantas jóvenes las hojas muestran un cambio de color verde glaseadas a verde pálido y apacible, las plantas se marchitan provocando una muerte súbita. (Kiely et al, 1961). En los vasos xilemáticos de tallos, raíces y otros órganos infectados, puede haber micelio y esporas del hongo. Algunos de los vasos xilémicos son obstruidos por el micelio, las esporas o bien los polisacáridos que produce el hongo. Al parecer, la decoloración café de los tejidos vasculares afectados se debe también a la oxidación y translocación de algunos de los productos de degradación. En los tallos jóvenes recién infectados, el número de vasos xilemáticos formados disminuye y sus paredes celulares se adelgazan más de lo normal. Con frecuencia, las células parenquimatosas en torno a los vasos xilemáticos son estimulados por las secreciones del patógeno para que se dividan excesivamente y, esto aunado a las paredes adelgazadas y debilitadas de algunos hospedantes, da como resultado como resultado la disminución del diámetro o el colapso total de los vasos. En algunos hospedantes, las células parenquimatosas forman tilosis que mantienen unidos a algunos vasos xilemáticos. Estas tilosis en forma de globo salen al interior de los vasos y hacen que estos se obstruyan. Las toxinas que secreta el hongo de los marchitamientos en los vasos, renquimatosas adyacentes al xilema, produciendo así alguno de los efectos descritos anteriormente. Las toxinas pueden ser llevadas también a las hojas,

en las que hace que disminuya la tasa fotosintética y se altere la permeabilidad de las membranas celulares de la hoja, así como su habilidad para controlar la pérdida de agua a través de la transpiración, lo cual da como consecuencia epinastia, marchitamiento, necrosis internerval, empardeamiento y muerte de las hojas. (Agrios, 2000).

Las raíces principales de las plantas jóvenes muestran al principio una mancha ligeramente rojiza, que más tarde adquiere una tonalidad que va de rojo oscuro o pardo y que se extiende hasta cubrir más o menos la raíz principal y porción del tallo que se encuentran por debajo de la superficie del suelo, o bien aparece en forma de rayas que se extienden por arriba de ella. En la raíz principal aparecen fisuras longitudinales, en tanto que las pequeñas raíces laterales son destruidas. Por lo general, el crecimiento de la planta se retarda y cuando el clima es seco las hojas pueden tornarse amarillas e incluso desprenderse de la planta. En ocasiones las plantas infectadas forman raíces secundarias y numerosas raicillas inmediatamente por debajo de la superficie del suelo, los cuales bajo condiciones de humedad favorables pueden ser suficiente para permitir que la planta llegue a la madurez y produzcan una cosecha. (Agrios 2000).

Las plantas adultas en el campo pueden marchitarse y morir repentinamente en caso de que la infección sea severa y el clima sea favorable para el patógeno. Sin embargo es más frecuente que en las plantas adultas ocurra epinastia foliar y un previo aclaramiento de las nervaduras de sus hojas antes de que se produzca achaparramiento, amarillamiento de las hojas inferiores, formación ocasional de raíces adventicias, marchitamiento de sus hojas y tallos jóvenes, defoliación, necrosis marginal de sus hojas persistentes y, finalmente, su muerte. Mientras la planta se encuentre viva no aparecen sobre su superficie micelio o cuerpos fructíferos del hongo. Los frutos ocasionalmente son infectados se pudren y desprenden sin que aparezcan manchas en ellos. (Agrios, 2000).

2.3.4. Clasificación Taxonómica de *Fusarium*

Fusarium sp., pertenece a la clase de los Deuteromicetes, que agrupa a todos los hongos sin reproducción sexual (se reproducen por conidias una espóra asexual formada en el extremo de una hifa), dentro de esta clase desde el punto de vista patológico constituye un grupo muy variado y asociado con una gran cantidad de enfermedades. (Llacer *et al*, 1996)

Tabla 2.- Clasificación taxonómica de *Fusarium*, según Alexopoulos *et al* (1985,1996) revisado por Cueva, (2007).

Reino	Myceteae
División	Amastigomycota
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyphomycetidae
Orden	Moniliales
Familia	Tuberculiraceae
Genero	<i>Fusarium</i>
Especie	<i>oxysporum, solani, moniliforme</i>

Fuente: Cueva, 2007.

2.3.5 Morfología de *Fusarium* sp.

Fusarium en medio de cultivo PDA presenta colonias de los distintas especies de fusarios crecen de moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, o como una tela (Carrillo, 1991), mencionado por (Cueva 2007).

Presenta conidias hialinas y variables; produce 3 tipos de esporas asexuales. Los macroconidios son estructuras largas en forma de media luna o elípticas, multiseptadas, constituidos de tres a cinco células que se encorvan hacia ambos extremos, los ápices son puntiagudos y en muchas especies con una célula basal en forma de pie (Agrios, 2000). Los microconidios, que tienen de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia, su forma pueden ser: elipsoidal, fusiforme, claviforme, piriforme o subgloboso con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas, pero en algunas especies en cadenas basípetas (Carrillo, 1991), mencionado por (Estupiñan *et al.*, 2007) No siempre se producen ambos tipos de esporas.

Las clamidosporas son el tercer tipo de espora que produce este hongo, son globosas. Constituidas por una o dos células, son de pared gruesa, pueden ser terminales, laterales o intercalares, a veces formando cadenas, formadas a partir de la condensación del contenido de las hifas y las conidias. Con esta estructura el hongo sobrevive en condiciones ambientales desfavorables y en ausencia de plantas hospedantes. Su tamaño varía de 5 – 15 micras de diámetro (Nelson, 1981)

La morfología de las macroconidias la presencia y características de las clamidosporas son muy importantes para la identificación de las especies. Las macroconidias y microconidias se producen en los vasos del xilema, pero las microconidias son predominantes en tejidos infectados. Hasta el momento no se conoce la fase perfecta del hongo. (Nelson, 1981).

Esta especie se caracteriza por producir distintas formas especiales, las cuales no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales de las colonias, sin embargo, son fisiológicamente diferentes por su capacidad de parasitar y ocasionar enfermedades en plantas hospedantes y sus exudados radicales satisfacen los requerimientos nutricionales del hongo y por lo tanto puede desarrollarse solo en este tipo de plantas. (Nelson, 1981).

2.3.6 Ciclo de la enfermedad

La enfermedad se inicia con el crecimiento de las hifas o con la germinación de las clamidosporas en dormancia presentes en tejidos muertos del hospedante, estimulados por los exudados secretados por las raíces de las plantas de clavel recién sembradas. Las hifas del hongo penetran directamente la epidermis de las raíces, pasan a la corteza y a la endodermis y entran a los vasos del xilema, también las hifas pueden penetrar a través de las heridas hechas en forma mecánica o por nemátodos, insectos o miriápodos. Sin embargo, la penetración directa a través de las raíces es el método más común de penetración del patógeno (Baker, 1978; Baayen, 1988). Una vez dentro de la planta, el hongo se mueve hacia el tejido vascular por colonización intracelular a los vasos del xilema y los invade cuando están maduros (Nelson *et al.*, 1960).

El patógeno coloniza por crecimiento del micelio o por medio de transporte pasivo de microconidias (Baayen, 1988). Este último contribuye a una colonización no uniforme, lo que puede hacer que el material de propagación aparentemente sano resulte afectado (Baayen y Maat, 1987). La colonización del tallo es unilateral debido a que la diseminación lateral y radial del hongo parece inhibida por las paredes celulares y otras barreras laterales (Baayen y Elgerma, 1985). La oclusión de los vasos del xilema infectado juega un papel muy importante en la resistencia de las plantas de clavel ya que aquellas variedades resistentes tienen la capacidad de regenerar nuevos vasos del xilema, como un método para crear nuevas vías de transporte de agua para compensar vasos destruidos (Baayen, 1988).

2.3.7. Diseminación

Algunos patógenos, como los nemátodos, las zoosporas de hongos y bacterias, se desplazan por sí mismos hasta una cierta distancia y de esta forma se trasladan de un hospedante a otro. Las hifas de los hongos y los rizomorfos pueden desarrollarse entre los tejidos que se mantienen unidos y, en ocasiones, a través del cuello en torno a las raíces adyacentes (Agrios, 2000).

Las esporas de algunos hongos son expulsados violentamente desde el esporomorfo o esporocarpo mediante un mecanismo de presión que da como resultado la descarga sucesiva o simultánea de esporas hasta 1 cm o más de distancia por arriba del nivel del esporomorfo (Agrios, 2000).

La principal diseminación del patógeno ocurre a través de esquejes infectados provenientes de la planta madre. Una de las dificultades para evitar este tipo de diseminación consiste en que el hongo coloniza el sistema vascular antes de la expresión de los síntomas en la planta y los esquejes obtenidos pueden contener el patógeno sin mostrar síntomas externos (Nelson, 1964); además la distribución del hongo no es uniforme debido a la colonización pasiva de las microconidias en los vasos del xilema, por lo cual algunos esquejes pueden resultar sanos y otros enfermos (Fletcher y Martín, 1972). Otra fuente de diseminación es el suelo contaminado en donde el hongo puede sobrevivir muchos años a través de las clamidosporas. El agua puede ser un agente de diseminación del hongo, debido a su capacidad para sobrevivir en ese elemento; las esporas pueden germinar en ella y

contaminar los reservorios. El aire puede transmitir el patógeno en suelo contaminado (Garibaldi, 1978).

La mayoría de esporas de hongos y, hasta cierto grado, las semillas de las plantas superiores parásitas son diseminadas por las corrientes de aire que las llevan como partículas inertes hasta ciertas distancias. Las esporas de muchos hongos son demasiado delicadas como para sobrevivir durante un periodo prolongado suspendidas en el aire, por lo que son diseminadas con bastante efectividad sólo a una distancia de unos cuantos centenares o miles de metros, cuando el clima es favorable, pueden ocasionar epifitas de amplia distribución geográfica.

El agua interviene en la diseminación de los patógenos: los fragmentos miceliales, esclerocios, esporas de algunos hongos que se encuentran en el suelo, son diseminados por la lluvia o por el agua de los sistemas de riego que corre sobre la superficie del suelo. Aun cuando el agua es menos importante que el viento en la diseminación de los patógenos a grandes distancias, es mucho más eficiente por el hecho de que los patógenos se depositan ya sobre una superficie húmeda y pueden desplazarse y germinar de inmediato.

Los insectos diseminan a los patógenos a distancias variables dependiendo del tipo de insecto, la asociación que se establece entre éste y el patógeno, y las condiciones climatológicas predominantes, en particular el viento. La mayoría de los animales que se desplazan entre las plantas y hacen contacto con ellas por donde pasan, diseminan algunos patógenos como esporas de hongos, bacterias, semillas de plantas parásitas, nematodos y probablemente también algunos virus y viroides. La mayoría se adhieren en las patas o al cuerpo de los animales, pero algunos de ellos se encuentran en las partes bucales contaminadas; algunos fitopatógenos, como es el caso de las zoosporas de algunos hongos, y ciertas plantas parásitas, transmiten virus cuando se desplazan de una planta a otra, o al crecer y formar un puente entre dos plantas (cúscuta).

El hombre disemina todo tipo de patógenos a distancias variables en una gran variedad de formas, cuando transporta tierra contaminada en sus pies o equipo agrícola, al utilizar trasplantes, semillas, cepas de viveros y yemas infectadas y al hacer uso de recipientes contaminados, por último cabe mencionar que el hombre disemina a los patógenos al llevar

a su zona nuevas variedades que pueden llevar patógenos que en un principio no se detectaron, o al viajar a distintos países e importar alimentos u otros objetos que pueden portar fitopatógenos nuevos

2.3.8 Interacción Planta – Patógeno

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, ellas interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa.

De acuerdo con los axiomas de resistencia planteados por Browning (1980), la resistencia y la avirulencia son la regla mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción. El autor propone además que la resistencia y la susceptibilidad son los extremos de un continuo y que la inmunidad es absoluta. Los genes que determinan la resistencia oligogénica y la susceptibilidad en la planta, son complementarios a los genes que determinan la virulencia y la avirulencia en el patógeno (Browning 1980).

Las interacciones entre una planta y un microorganismo pueden mostrar varios tipos que van desde las relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo. Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, especie y subespecies. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general son susceptibles solamente a pocas especies, aislamientos o razas de patógenos (Heath 2000a). Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrimentos de fuentes existentes y para ello necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta. Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse solo en tejidos de hospedantes vivos son llamados *biotrofos*. Estos patógenos, también conocidos como parásitos obligados, necesitan mantener la célula hospedante viva y emplean para ello mecanismos de invasión sumamente sutiles. Los apresorios son estructuras de penetración usadas por algunos hongos para evitar el daño excesivo del tejido durante las fases iniciales

de la patogénesis. Entre los patógenos biotróficos se encuentran los virus, los nematodos y algunos hongos especializados, tales como las royas

Otro tipo de patógenos, denominados *necrotróficos*, producen la muerte de las células hospedantes obteniendo de esta forma los nutrimentos a partir del tejido muerto. En este grupo se incluyen la mayoría de los hongos y las bacterias fitopatógenas. Estos muchas veces utilizan diferentes toxinas capaces de degradar el tejido de la planta y facilitar la invasión.

2.3.9 Mecanismos de patogénesis

Se cree que los hongos patógenos perjudican a las células de su hospedero causando enfermedad mediante la acción individual o combinada de cuatro mecanismos fundamentales de patógenos (Llácer *et al.*, 2000), mencionado por (Valencia, 2009).

- Producción y liberación de enzimas que degradan barreras celulares.
- La producción y liberación de sustancias (tóxicas) que interfieren con el metabolismo o que afectan la estructura normal del citoplasma y protoplasma.
- La producción y liberación de sustancias que interfieren con el control normal del crecimiento y desarrollo (compuestos hormonales, anti hormonales, u otros).
- La interferencia con los movimientos normales del agua, nutrientes y metabolitos.

2.3.10 Trichoderma sp.

2.3.10.1 Clasificación Taxonómica de *Trichoderma* sp.

Trichoderma se caracterizan por no poseer o no presentar un estado sexual determinado. De este microorganismo existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas (Páez, 2006), mencionado por Cobos (2010). Las diversas especies de *Trichoderma* son mas o menos similares, presentando unos pocos caracteres taxonómicos diferentes que tienen importancia para la identificación de especies (Rifai, 1969). Mencionado por Cueva (2007).

Tabla 3.- Clasificación Taxonómica de *Trichoderma* sp. Según Webster (1989) mencionado por Cueva (2007).

Reino	Myceteae
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Subclase	Hyphomicetidae
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Genero	<i>Trichoderma</i>
Especie	viride, harzianum, lignorum

Fuente: Cueva, 2007.

2.3.10.2 Morfología de *Trichoderma* sp.

Trichoderma forma colonias de color blanco a verde intenso que crecen rápidamente en medios de cultivo artificiales, el color varía debido a la pigmentación de las esporas, son floccosas, suaves. Las colonias pueden ser compactas o sueltas, existiendo variaciones entre ambos extremos; estas características pueden estar correlacionadas en parte con las estructuras de los conidióforos (Rifai, 1969), mencionado por Cueva (2007).

El micelio es septado y hialino (transparente); a partir de él se originan los conidióforos aterciopelados, erectos o arrastrados, altamente ramificados más o menos cónicos, débiles o fuertemente verticilados y cortos que se separan con facilidad en cuyas partes terminales producen esporas (conidias) unicelulares, esféricas no septadas, subglobosas a elipsoidales y viscosas, a menudo reunidas en forma de racimos.

Comúnmente forma clamidosporas, intercaladas o raramente terminales, las cuales son globosas a elipsoidales, hialinas y de pared suave, (Papavizas, 1985 Citado por Ezziyyani, 2004).

La esporulación en la mayoría de las especies del género *Trichoderma*, es favorecida por su fotosensibilidad y como consecuencia de esto esporulan bien en varios sustratos, ya sean naturales o artificiales (Papavizas, 1985, citado por Ezziyyani, 2004).

Trichoderma ha sido estudiado por más de 70 años por sus propiedades como controlador biológico, de múltiples patógenos de plantas, lo que con el paso de los años ha venido implicando un alto grado de desarrollo tecnológico, que ha dado como resultado la aparición, de múltiples formulados comerciales de distintas cepas para el control de enfermedades.

Trichoderma obtiene nutrientes de los hongos (a los cuales degrada) y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual la incorporación de materia orgánica y compostaje lo favorecen. La velocidad de crecimiento de este organismo es bastante alta, por lo que es capaz de establecerse en el suelo y controlar enfermedades. (Papavizas, 1985, citado por Ezziyyani, 2004).

El primer reporte del uso de microrganismos como controlador biológico son conocidas desde 1930 (Cook *et al.*, 1989), mencionado por Castillo (2004).

Más de la mitad de los antagonistas aplicados a plántulas y suelo son Hyphomycetes, y alrededor de la mitad de estos pertenece a los géneros *Trichoderma*, *gliocladium* y *Penicillium*, (Papavizas, 1985, citado por Ezziyyani, 2004).

El modo de acción de *Trichoderma* spp., es principalmente a través de competencia y predación. Los micelios se enrollan alrededor de las hifas presa, produciendo un estrangulamiento.

Se ha observado que hifas susceptibles son penetradas siendo vacuoladas, colapsando y siendo finalmente desintegradas, luego el micoparásito se alimenta de ese sustrato (Cook *et al.*, 1989), mencionado por Castillo (2004).

Según Harman (1998), mencionado por Castillo (2004), ha trabajado con distintas razas de *Trichoderma harzianum* y ha determinado cuatro métodos efectivos de aplicaciones:

1. Tratamiento de semillas con y sin fungicidas, un agente de biocontrol debe ser capaz de proteger una semilla, de manera inmediata como lo hacen los fungicidas.
2. Puede ser utilizado en almacigueras disminuyend así el uso de pesticidas.
3. Aplicaciones granulares al suelo o aplicaciones líquidas al follaje.

Aplicaciones en floraciones o fructificación, para proteger de patógenos tales como *Botrytis cinerea*.

2.4 Fundamentación legal

La presente investigación se basará en la siguiente legislación:

CONSTITUCIÓN 2008

TÍTULO VII

REGIMEN DEL BUEN VIVIR

Sección Octava

Ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales

Art. 385.- El sistema nacional de ciencia, tecnología, innovación y saberes ancestrales , en el marco del respeto al ambiente, la naturaleza, la vida. Las culturas y la soberanía, tendrá como finalidad:

1. Generar, adaptar y difundir conocimientos científicos y tecnológicos.
2. Recuperar, fortalecer y potenciar los saberes ancestrales.
3. Desarrollar tecnologías e innovaciones que impulsen la producción nacional, eleven la eficiencia y productividad, mejoren la calidad de vida y contribuyan a la realización del buen vivir.

Art. 387.- Será responsabilidad del Estado:

1. Facilitar e impulsar la incorporación a la sociedad del conocimiento para alcanzar los objetivos del régimen de desarrollo.
2. Promover la generación y producción de conocimiento, fomentar la investigación científica y tecnológica, potenciar los saberes ancestrales, para así contribuirlo a la realización del buen vivir, al sumak kawsay.
3. Asegurar la difusión y el acceso a los conocimientos científicos y tecnológicos, el usufructo de sus descubrimientos y hallazgos en el marco de lo establecido en la Constitución y la Ley.
4. Garantizar la libertad de creación e investigación en el marco del respeto a la ética, la naturaleza, al ambiente, y el rescate de los conocimientos ancestrales.
5. Reconocer la condición de investigador de acuerdo a la Ley.

Capítulo segundo

Biodiversidad y recursos naturales

Sección primera

Naturaleza y ambiente

Art. 395.- La Constitución reconoce los siguientes principios ambientales:

1. El Estado garantizará un modelo sustentable de desarrollo, ambientalmente equilibrado y respetuoso de la diversidad cultural, que conserve la biodiversidad y la capacidad de regeneración natural de los ecosistemas, y asegure la satisfacción de las necesidades de las generaciones presentes y futuras.

EI MINISTRO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

CAPITULO IV

1.1 Producción orgánica agrícola

Art. 16.- Manejo de plagas.- El combate de plagas debe realizarse de manera integrada, de acuerdo al sistema de ciclos orgánicos y manteniendo el equilibrio ecológico. En el manejo integrado deben considerarse los siguientes aspectos:

- a) Creación de condiciones que favorezcan el desarrollo de un equilibrio ecológico, donde el combate de los enemigos naturales de los parásitos pueda funcionar;
- b) Método cultural:
 - Mejoramiento de la composición biótica y abiótica del suelo.
 - Siembra de cultivos asociados.
 - Adecuado programa de rotación de cultivos.
 - Implementación de prácticas culturales -alopatías y sinergias-, que favorezcan controles recíprocos en las poblaciones de insectos nocivos para el cultivo.
 - Implementación de espacios para poblaciones antagónicas;
- c) Método genético:
 - 1.2 Selección de especies y variedades adecuadas;
- d) Control biológico de plagas:
 - 1.3 Preparaciones en base a estiércoles, fermentos, extractos vegetales, infusiones y preparados de plantas u otros elementos biológicos;
- e) Método etológico:
 - 1.4 Uso de trampas para el combate de insectos y siembra de cultivos como trampas repelentes;
- f) Implementación de métodos mecánicos; y,
- g) Desinfección del suelo con insumos aceptados por la agricultura orgánica.

Sólo en casos de amenaza inmediata al cultivo y donde las medidas anteriormente recomendadas no resulten efectivas o suficientes para combatir plagas o enfermedades, se podrán, usar las sustancias que aparecen en la lista del Anexo 7, con la autorización de la agencia certificadora.

2.5 Categorías fundamentales

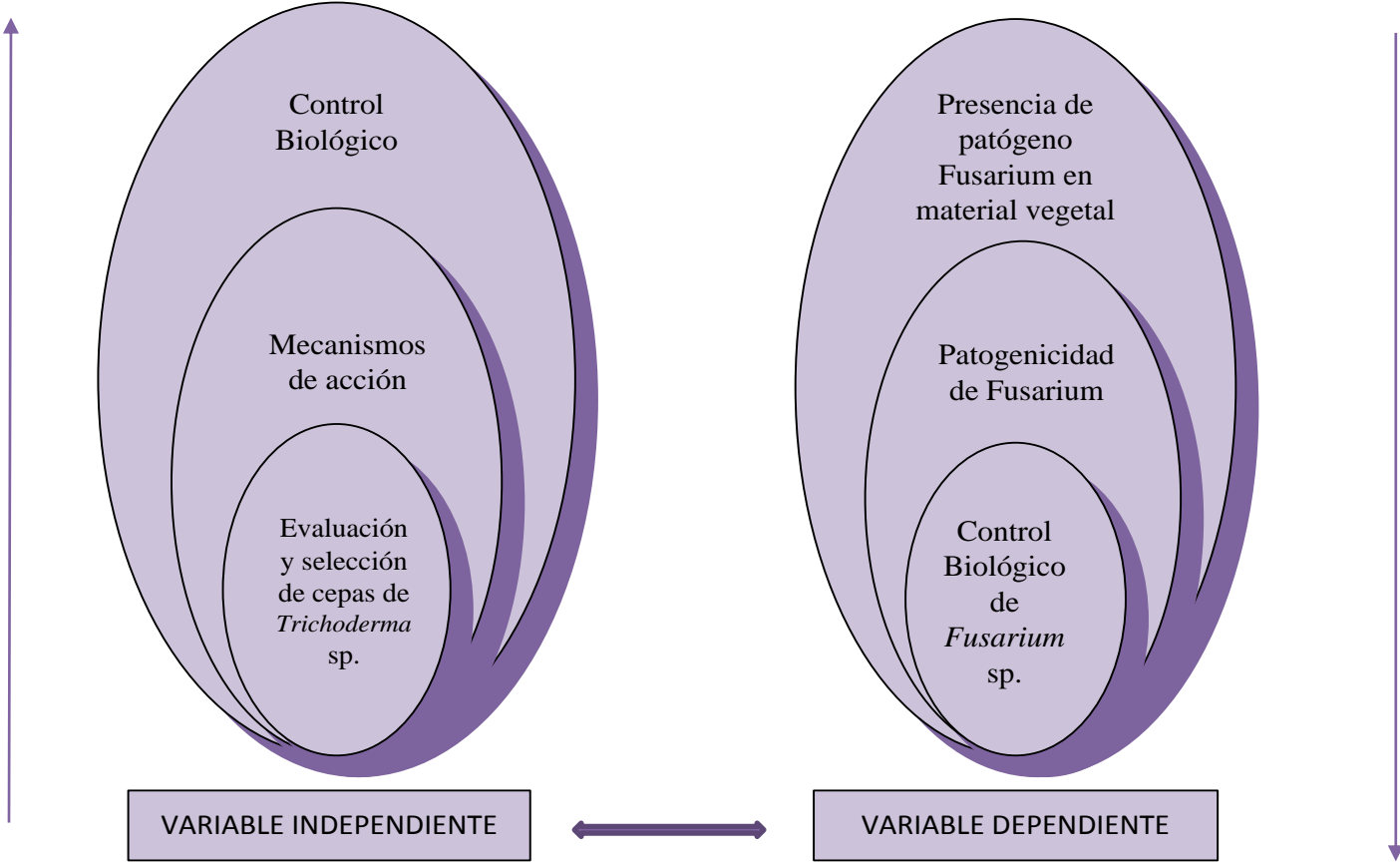


Gráfico N° 2.- Red lógica de Variables

Elaborado por: Ana Martínez

2.5.1 Subcategoría de Variable Independiente

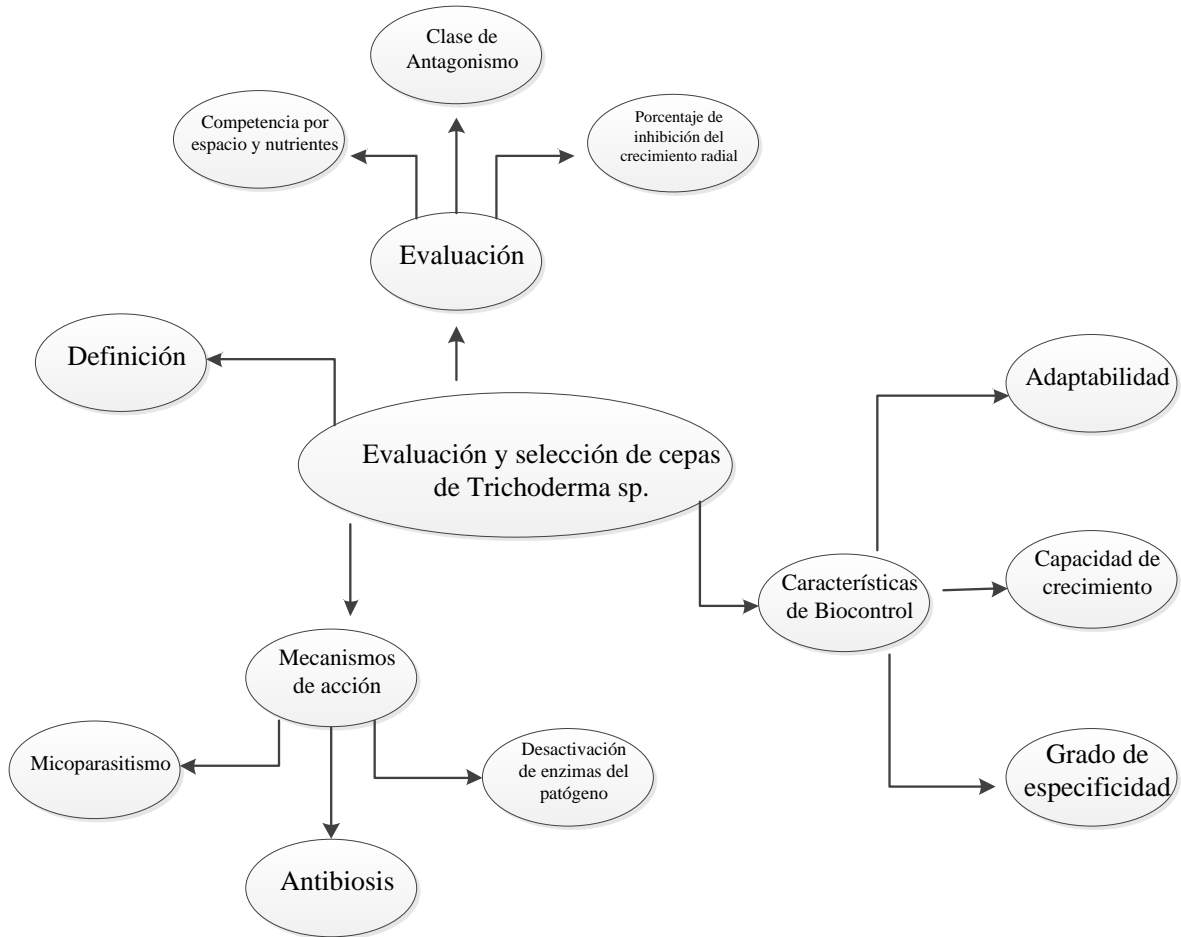


Gráfico N° 3.- Subcategorías de la Variable Independiente

Elaborado por: Ana Martínez

2.5.2 Subcategorías de Variable Dependiente

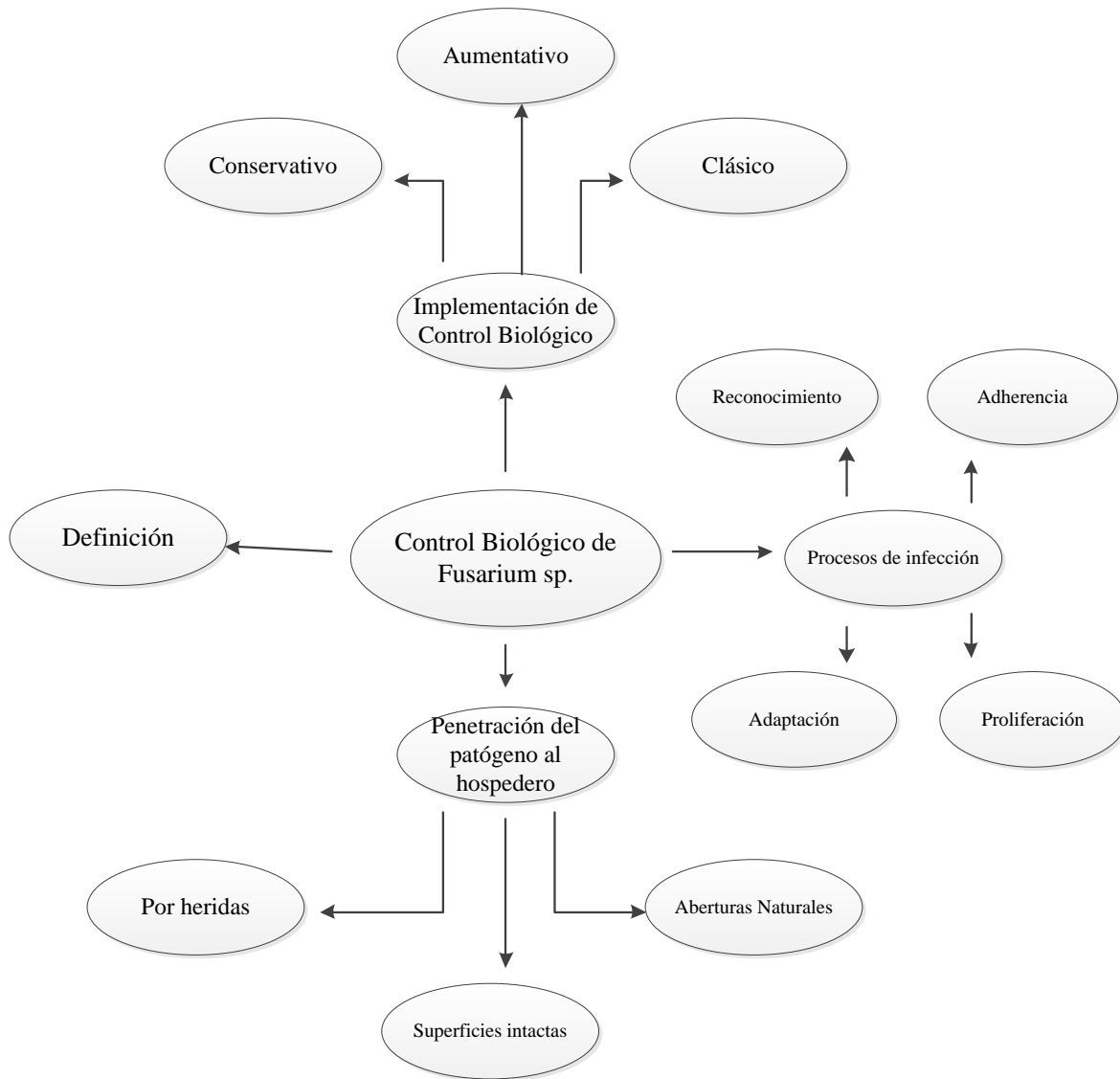


Gráfico N° 4.- Subcategorías de la Variable Dependiente
Elaborado por: Ana Martínez

2.5.3 Marco conceptual de categorías fundamentales de la Variable Independiente

2.5.3.1 Control Biológico

El control biológico puede ser definido como la reducción del inoculo o de la actividad de un patógeno mediante la acción natural de uno o más microorganismos a través de la manipulación del medio ambiente, del hospedero de los antagonistas o por una introducción masiva de uno o más microorganismos (Baker y Cook, 1983), mencionado por Cruz (2007).

El control biológico surge como una alternativa ante la necesidad de reducir los productos químicos, conservando la sanidad de los cultivos. Además, el componente más significativo del suelo que afecta la supervivencia de los esclerocios parece ser el biológico; entre los cuales se encuentran más de 30 especies de hongos y bacterias señaladas como antagonistas. (Cundom *et al.*, 2002), mencionado por Hoyos, *et al.*, (2008). En el caso de hongos, los más utilizados en control Biologico son los de la clase Hyphomycetes, (Jensen *et al.*, 1995), y de estos, varias especies de los géneros *Trichoderma*, *Penicilium* y *Gliocladium*.

Los agentes (en general, otros hongos, bacterias o virus) tienden a inferir de alguna manera con el ciclo biológico del patógeno (por destrucción directa o competencia al utilizar sus recursos vitales), o a estimular la reacción de la planta atacada favoreciendo o iniciando la creación de barreras de todo tipo. Estas últimas permiten retrasar o impedir el desarrollo del patógeno cuando entra en contacto con el cultivo (Llacer *et al.*, 1996).

Estos organismos disminuyen la incidencia de la enfermedad mediante varios mecanismos, entre los cuales se plantean competencia por espacio y nutrientes, producción de sustancias como antibióticos, enzimas o toxinas que afectan la germinación y desarrollo del patógeno. También la inducción de las defensas de las plantas es otro mecanismo importante para disminuir la incidencia y severidad de las enfermedades. Existe un gran número de factores biológicos y ambientales que dominan las interacciones entre el hongo patógeno y el antagonista, afectando al control biológico de la enfermedad. Uno de los factores

ambientales de mayor importancia, en la interacción patógeno-antagonista, es la temperatura. Pero no solo el espectro de actividad térmica del antagonista es importante, sino que posee una gran importancia también el del patógeno.

2.5.3.2 Mecanismos de acción de *Trichoderma* in vitro.

El género *Trichoderma* comprende a una gran cadena de hongos que actúan como agentes de control biológico, las propiedades antagónicas de este hongo está basada en la activación de múltiples mecanismos.

Según Harman (2001), *Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar otros hongos aprovechando una fuente nutricional adicional a través de estos *Trichoderma* puede actuar como biocontrolador y colonizador de las raíces; actuando como mecanismos de acción directa sobre el fitopatógeno.

Los mecanismos antagónicos que utiliza *Trichoderma sp.*, se describe como antibiosis, micoparasitismo y competencia, sin ser estos mutuamente excluyentes y pudiendo por lo tanto actuar a la vez (Dubos, 1987), mencionado por Cobos (2010).

Mientras que los siguientes mecanismos tienen un efecto indirecto ya que su acción es licitar o impulsar mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta.

Resistencia inducida.

2.5.3.3 Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma sp.*

El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable a ser evaluada, dadas sus características de ser eficaz contra fitopatógenos foliares y del suelo en algunos cultivos. Así mismo, se requiere detectar la presencia y diversidad de cepas nativas, con el propósito de evaluarlas como agentes potenciales de control biológico (Papavizas, 1985, citado por Cobos, 2010). Las especies de *Trichoderma* muestran gran capacidad para el control de fitopatógenos ejerciendo un efecto antagónico, debido a su ubicuidad, a su

facilidad para ser aisladas y cultivadas, su crecimiento rápido en un gran número de sustratos ya que no atacan a plantas superiores (Papavizas et al. 1982. Citado por Ezziyyani, 2004), mencionado por Cobos, 2010.

Según Cook y Baker (1989), mencionado por Castillo (2004), dicen que las habilidades de micoparasitismo de *Trichoderma* spp., son conocidas desde 1930, fecha desde la cual ha sido estudiado su uso como controlador de enfermedades fungosas.

2.5.3.4 Evaluación de Cepas con alta capacidad antagónica

En condiciones de laboratorio se han obtenido buenos resultados utilizando como control cepas de *Trichoderma* sobre diferentes patógenos entre ellos *S. rolfsii*, (Elad *et al.*, 1984; Henis *et al.*, 1983; Henríquez, 1990), mencionado por Castillo, 2004.

El mecanismo por el cual controla hongos fitopatógenos principalmente es a través de competencia por espacio y predación, los micelios se enrollan alrededor de las hifas de los hongos presa, produciendo un estrangulamiento. Además de ha observado que las hifas del hongo susceptibles son penetradas, colapsando y finalmente desintegradas (Cook y Baker. 1989), mencionado por Caballero (2004).

Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros. (Ahmad *et al.*, 1987; Hjeljord *et al.*, 1998)

La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico (Hjeljord, *et al.*, 1998; Pérez, 2004).

Para la evaluación del tipo de antagonismo se valora en escalas que dependen de acuerdo a la medida de invasión de la superficie, colonización, y esporulación de *Trichoderma* (Elías y Arcos, 1984; mencionado por Fernández *et al.*, 2009).

La forma en que *T. harzianum* probablemente inhibe el crecimiento radial, aun estando a distancia del patógeno, esta mediada por diversos mecanismos, destacándose la producción de compuestos inhibitorios al medio; antibiosis por producción de metabolitos volátiles y no volátiles, entre los cuales se encuentran, pirones, isocianatos, pépticos, y trichocinas (Howell, 2003; mencionado por Fernandez *et al.*, 2009)

2.5.3.5 Mecanismos de Acción de *Trichoderma* sp.

a. Micoparasitismo:

Se define como Micoparasitismo a “La interacción antagónica entre dos hongos”, es decir entre el parasitismo de un hongo (hospedero) por otro hongo (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedero (Manocha, 1991), citado por (Michel, 2001).

Según EC-ORGANICS (2008) mencionado por Guilcapi, (2009).El desarrollo de las hifas de *Trichoderma* spp., es directo hacia las hifas patógenas, mismas que sujeta, penetra y extrae los nutrientes provocando daños parciales en las zonas que permanecieron en contacto con el antagonista,

Según es el ataque directo de un microorganismo a otro, involucrando una serie de acciones:

- **Crecimiento quimiotrófico de *Trichoderma*:** Los exudados del patógeno atraen al antagonista.
- **Reconocimiento:** probablemente mediado por aglutininas (lecitinas) sobre la superficie celular tanto del hongo antagónico como del patógeno.

- **Adhesión y enrollamiento:** Cuando el contacto se efectúa en algunos casos se forman estructuras parecidas a los ganchos, presumiblemente apresorios, que probablemente permiten la penetración de la hifa en la célula (Elad, *et al* 1983) citado por (Michel, 2001). Se conoce que *Trichoderma* spp. Después de reconocer a su hospedero lo ataca, crece en espiral y produce un apresorios el cual lo auxilia en la penetración de la pared celular y de la nutrición del huésped (Goldman *et al* , 1994), citado por (Michel, 2001)
- **Degradación:** durante este proceso *Trichoderma* secreta enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs): celulosas, quitinasas, glucanasas, que hidrolizan la pared celular de las hifas del hospedante, facilitando la inserción de estructuras especializadas y de hifas de *Trichoderma* que absorben nutrientes del interior del hongo fitopatógeno (Eveleigh, 1986), citado por (Infante *et al* 2009).

b. Antibiosis

Estos mecanismos indirectos y directos pueden actuar coordinadamente y su importancia en el proceso del biocontrol depende de la tensión de *Trichoderma* al hongo opuesto de la planta, la cosecha, y las condiciones medioambientales, incluso la disponibilidad nutricional, pH, temperatura, y la concentración férrica. La activación de cada mecanismo implica la producción de compuestos específicos y metabolitos, como el crecimiento de la planta factoriza, enzimas hidrolíticas de los, sideróforos, antibióticos, carbono y permeases de nitrógeno. Estos metabolitos o pueden sobreproducirse o pueden combinarse con las tensiones del biocontrol apropiadas para obtener las nuevas formulaciones para el uso en el mundo más eficaz de enfermedades de la planta y aplicaciones posteriores. (Benítez, et al 2004).

c. Competencia por Nutrientes y espacio

Esto ocurre cuando dos o más organismos demandan un mismo recurso vital. La competencia entre agentes de control biológico y el patógeno puede resultar en la

aniquilación de la población perjudicial y puede darse a favor de *Trichoderma* sp., debido a su alta tasa de crecimiento y desarrollo. Dado su carácter saprófito, puede en forma rápida y eficiente hacer uso del espacio de la rizófora, creando una exclusión de nicho y física, lo que además interfiere con la dirección de la raíz por parte de los patógenos. (Cook, 1989), mencionado por Castillo (2004).

d. Desactivación de las enzimas de los patógenos

Las especies de *Trichoderma* tienen la capacidad de producir enzimas hidrolíticas; entre ellas, celulasas, quitinasas, glucanasas, proteasas y xylaninas, las cuales en presencia del patógeno incrementan su actividad (Bruce *et al*, 1995, mencionado por Michel, 2001).

e. Resistencia inducida.

Los procesos de inducción de resistencias en los tejidos vegetales son importantes y susceptibles de manipulación (Andrews, 1984), mencionado por Cueva (2007). Algunos estudios indican que agentes de biocontrol pueden interactuar con los tejidos de la planta, y esta desarrollar mecanismos de resistencia por alteraciones químicas y/u osmóticas que le favorezcan en contra del patógeno (McLaughlin *et al.*, 1990), mencionado por Cueva (2007). Además la presencia de metabolitos secundarios producidos por algunos microorganismos, pueden inducir procesos de resistencia de la planta para la producción de sustancias inhibitorias

2.5.3.6 Características Efectivas de Biocontroladores.

Se ha utilizado una gran diversidad de especies de enemigos naturales en muchos programas de control biológico, las especies que han demostrado ser efectivas poseen en común ciertas características que deben ser consideradas en la planeación y conducción de nuevos programas. En general, los enemigos naturales más efectivos comparten las siguientes características:

- Adaptabilidad a los cambios en las condiciones físicas del medio ambiente.
- Alto grado de especificidad a un determinado huésped/presa.

- Alta capacidad de crecimiento poblacional con respecto a su huésped/presa.
- Alta capacidad de búsqueda, particularmente a bajas densidades del huésped/presa.
- Sincronización con la fenología del huésped/presa y capacidad de sobrevivir períodos en los que el huésped/presa esté ausente.
- Capaz de modificar su acción en función de su propia densidad y la del huésped/presa, es decir mostrar densidad dependencia.

El atributo individual más importante es la capacidad de búsqueda, debido a que esta habilidad permite que el enemigo natural sea capaz de sobrevivir incluso a bajas densidades de su huésped/presa. Sin embargo, un enemigo natural no tendría una capacidad de búsqueda sobresaliente si no posee otra o varias de las demás características mencionadas. Por lo tanto, el enemigo natural ideal debe poseer una buena combinación de todos los atributos posibles.

Por lo tanto, para utilizar agentes de Control Biológico y tener una mayor efectividad en el control, es necesario entender los sistemas de cultivo, la epidemiología de la enfermedad, la biología, ecología y dinámica de población de antagonistas y la interacción entre todas ellas. (Adams, 1990; Decon, 1991).

2.5.4 Marco conceptual de categorías fundamentales de la Variable Dependiente

2.5.4.1 Presencia del patógenos *Fusarium sp.* en material vegetal

El suelo es un reservorio natural de hongos, nematodos, entomopatógenos, microorganismos fitopatógenos y antagonicos; se requiere detectar la presencia y diversidad de las cepas nativas de éstos últimos.(Michel, 2001).

Numerosas especies de *Trichoderma* son frecuentemente componentes dominantes de la microflora del suelo en diversos habitats. Esto es atribuible a la diversa capacidad metabólica de especies de *Trichoderma* y su naturaleza agresivamente competitiva.

Estos hongos se caracterizan por predominar en los ecosistemas terrestres (suelos agrícolas, pastizales, bosques y desiertos) y acuáticos (Zhang *etal.* 2005), según Michel (2008). Algunas especies son de vida libre en el suelo, oportunistas, simbioses de plantas, y otras

son micoparásitas. Además, pueden colonizar distintos ambientes, debido a su alta capacidad reproductiva (Bissett 1991, Harman *et al.* 2004), según Michel (2008). Los requerimientos nutrimentales de estos hongos filamentosos son pocos, aunque su crecimiento es favorecido por la materia orgánica, y su humedad y temperatura óptimas de crecimiento se encuentran en un rango de 25 a 30 °C (Papavizas 1985), mencionado por Michel (2008). Sin embargo, se pueden adaptar y sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Widden y Scattolin 1988, Jackson *et al.* 1991), según Michel (2008). Se puede encontrar en el aire, partes aéreas de plantas, pero especialmente en suelos, incluyendo humus forestales (Samuels, 1996), según Michel (2008) ,y de madera en descomposición.

Fusarium es conocido actualmente como un patógeno emergente de animales y humanos; haciendo de tal forma en el caso de los humanos que se incrementa el número de casos severos reportados (Bushelman, *et al.*, 1995). *Fusarium* actualmente representa al segundo hongo más frecuente, causante de infección fúngica invasiva en pacientes inmunocomprometidos, frecuentemente con resultados letales (Bushelman *et al.*, 1995; Ortoneda *et al.*, 2004).

El gran número de especies y poblaciones no identificadas en este género se debe al alto grado de variación en sus características morfológicas y fisiológicas, y esto explica la capacidad que tiene *Fusarium* para colonizar variados nichos ecológicos en distintas áreas geográficas (Díaz de Castro *et al.*, 2007). Las cepas de *F. oxysporum* pueden dividirse de acuerdo a su forma de interactuar con la planta ó plantas huéspedes en cepas no patogénicas y patogénicas, ambos tipos de cepas se encuentran distribuidas a nivel mundial en suelos dedicados a la agricultura asociados a plantas de interés comercial

Las cepas no patogénicas de *F. oxysporum* se encuentran dentro de los hongos, mas comúnmente aislados de plantas sanas. Aunque incapaces de producir enfermedad en estas plantas, estas cepas son colonizadoras muy efectivas de la epidermis y el cortex de la raíz de dichas plantas. El hecho de que estas cepas no produzcan marchitamiento puede deberse a su incapacidad para penetrar en los tejidos del haz vascular, o al hecho de que estas generen una rápida respuesta del huésped a la infección.

2.5.4.2 Patogenicidad de *Fusarium* sp.

2.5.4.2.1 Patogénesis

La patogénesis está definida como la capacidad en este caso de un microorganismos para causar daño en un hospedero. Por lo anterior u microorganismos para causar daño en un hospedero. Por lo anterior un microorganismo patógeno causa enfermedad solo cuando el daño incurrido en su hospedero es tal que afecta su equilibrio (Casadevall y Pirofski, 1999). El daño causado al hospedero puede ocurrir como consecuencia de la acción microbiana directa sobre los tejidos o como consecuencia de la respuesta de defensa del microorganismo o ambos (Casadevall y Pirofski, 1999).

2.5.4.3 Control Biológico de *Fusarium* sp.

Este fitopatógeno tiene una gran capacidad de esporulación, ya que una espora que ingrese a la planta es suficiente para introducir el patógeno en ella, así como sobrevivir en el suelo, haciendo difícil su control. Un método efectivo para controlar los marchitamientos ha sido el uso de variedades resistentes, ya que con el control químico se ha logrado resultados inconsistentes. Las prácticas de cultivo tales como el barbecho profundo, la rotación de cultivos, el dejar el suelo sin cultivar o la inundación de los terrenos de cultivo, han sido útiles para disminuir poblaciones del patógeno en el suelo, sin eliminarlo totalmente. La fumigación de los suelos ha tenido éxito en algunos casos, pero es demasiado costosa y su efecto es tan poco duradero que se considera inadecuada. En los invernaderos, la esterilización del suelo proporciona un control eficaz (Agrios, 2000). El uso de agentes naturales ó microorganismos como controladores biológicos de patógenos que causan enfermedades a diferentes cultivos han sido utilizados con el principal objetivo de generar una cultura de calidad que propicie condiciones y capacidades locales y sectoriales para la innovación y transferencia de tecnología en pro del desarrollo económico y social de los países, dando como respuesta a las nuevas demandas de los mercados nacionales e internacionales de productos agropecuarios en fresco o procesado que están requiriendo calidad e inocuidad garantizando salud para el consumidor, que sean producidos bajo el respeto y protección al medio ambiente, el bienestar y seguridad de los trabajadores; contribuyendo al desarrollo competitivo, sostenible y equitativo de la agroindustria.

En el control químico se utilizan mezclas de Carbendazim (Bavistin, Cekudazim, Goldazim) + hidróxido de cobre (Cuadrox, Volcan), en dosis de 200g + 200 g en 200 l de agua, y la aplicación de Vitavax.

Una alternativa al uso de productos químicos para el control de la marchitez vascular o fusariosis es la utilización de microorganismos benéficos. Dentro de los agentes de control biológicos mas utilizados para la fusariosis están los hongos antagonicos del género *Trichoderma*, *Gliocladium*, el empleo de bacterias del género *Pseudomonas*, obteniendo resultados alentadores al inocular previamente en las plantas (Agrios, 2000). Las dosis a utilizar de estos organismos antagonistas son: *Trichoderma viride* (106 UFC/ml); *Trichoderma harzianum* (107 UFC/ml) o *Gliocladium virens* (106 UFC/ml.), (MAGAP, 2011).

El uso de *Trichoderma* como agente de biocontrol representa una alternativa viable a ser evaluada, dadas sus características de ser eficaz contra fitopatógenos foliares y del suelo en algunos cultivos. Así mismo, se requiere detectar la presencia y diversidad de cepas nativas, con el propósito de evaluarlas como agentes potenciales de control biológico (Papavizas, 1985 Citado por Ezziyyani, 2004).

2.5.4.4 Implementación de Control Biológico

El control biológico aplicado generalmente se implementa de tres formas diferentes o combinaciones de las mismas:

- Conservativo: Consiste en alterar las prácticas culturales en los cultivos para favorecer el desarrollo de los agentes de control biológico natural y sus efectos.
- Aumentativo: Los agentes de control biológico se producen en forma masiva en el laboratorio y se aplican en forma inoculativa o inundativa para destruir las plagas.
- Clásico: Es la fase de aplicación compuesta por el descubrimiento, importación y establecimiento de enemigos naturales exóticos.

2.5.4.5 Penetración del patógeno

Los hongos invaden los tejidos vegetales mediante un proceso activo de penetración que puede tener lugar:

a. Penetración a través de heridas

Existe un número apreciable de especies fúngicas que penetran a sus hospederos a través de heridas. Entre ellas se destacan las que invaden tejidos lignificados o celulolíticos en el caso de las plantas (Llácer *et al.*, 2000). Las heridas pueden ser causadas por procesos naturales (caída de hojas, formación de raíces secundarias, etc.), prácticas agrícolas (poda, recolección, etc.). Las heridas naturales o artificiales pueden dar lugar a la exudación de nutrientes y a la exposición directa del xilema, hacia el cual son absorbidos los propágulos fúngicos (Llácer *et al.*, 2000).

Al parecer las bacterias y los hongos que penetran a través de las heridas germinan o se reproducen en la sabia contenida en las heridas recientes o en una película de agua o rocío que hay sobre la herida. En seguida el patógeno invade directamente a través de haustorios a las células vegetales adyacentes, o bien secreta enzimas y toxinas que destruyen y maceran a las células cercanas (Agrios, 2000).

b. Penetración a través de la superficie intacta

La mayoría de los hongos patógenos pueden penetrar directamente a través de la superficie intacta del hospedero. En algunos casos particularmente, la penetración tiene lugar por medio de un ápice del tubo germinativo o de la hifa, que invaden directamente a través de las células epidérmicas. Sin embargo, la mayor parte de los hongos desarrollan estructuras especializadas denominadas apresorios para penetrar tejidos intactos (Llácer *et al.*, 2000).

El apresorio es generalmente el ápice del tubo germinativo morfológicamente modificado y engrosado, que proporciona al patógeno la capacidad de adherencia a la superficie del huésped en preparación para la invasión subsecuente. Desde la base del apresorio en contacto con la superficie del huésped se diferencia una hifa especializada llamada hifa de penetración la cual crece en el interior del tejido a infectar. El apresorio presenta una alta

producción de enzimas líticas y glicerol para aumentar la presión, lo que permite penetración a los tejidos de la cutícula por actividad física y química (Llácer *et al.*, 2000).

c. **A través de aberturas naturales.**

La mayoría de hongos y bacterias entran en plantas a las plantas a través de sus estomas, pero algunos penetran a través de hidátodos, nectarios y lenticelas. La mayoría de los estomas son bastante abundantes en el envés de las hojas, miden aproximadamente 10 – 20 x 5 – 8 μm y se mantienen abiertos durante el día y casi siempre cerrados por la noche. Por lo general las esporas de los hongos germinan sobre la superficie de la planta y emiten un tubo germinal que se desarrolla entonces en el interior del estoma; sin embargo, es muy frecuente que el tubo germinal forme un apresorio que se adapta adecuadamente al estoma y que, por lo general, se desarrolle a partir de él una hifa fina que avanza al interior del estoma.

En la cavidad subestomática, la hifa crece y a partir de ella se desarrolla una o varias hifas pequeñas que de inmediato invaden a las células de la planta hospedante en forma directa o a través de haustorios. Aun cuando al parecer algunos hongos penetran incluso en estomas cerrados, otros entran a los estomas solo cuando éstos se mantienen abiertos y todavía otros, como es en el caso de las cenicillas, se desarrollan sobre estomas abiertos sin que penetre en ellos.

Los **hidátodos** son por lo general orificios casi siempre abiertos que se localizan al borde y en el ápice de las hojas; se encuentran unidos a las nervaduras y secretan gotas de líquido que contienen varios nutrientes. Algunas bacterias utilizan esos orificios como medio de entrada a las hojas, pero, al parecer, algunos hongos entran a las plantas a través de sus hidátodos.

Las **lenticelas** son aberturas localizadas en frutos, tallo, tubérculos, etc., que están llenas de células unidas en forma laxa y que permiten el paso del aire en esos órganos. Durante la estación de crecimiento, las lenticelas se mantienen abiertas, pero incluso así algunos hongos y bacterias penetran en los tejidos a través de ellas, y se desarrollan y avanzan principalmente entre las células de esos tejidos. La mayoría de los patógenos que penetran a

través de lenticelas pueden entrar también a través de heridas, por lo que la penetración a través de esos orificios es, al parecer, una vía secundaria de menor eficiencia.

2.5.4.6 Procesos para producir la infección

La infección es el proceso por el cual los patógenos entran en contacto con las células o tejidos susceptibles de un hospedante y en el que se producen nutrientes suficientes para ambos. Durante la infección, los patógenos se desarrollan y/o reproducen dentro de los tejidos de las plantas e invaden a éstas en forma variables. De esta manera la invasión del patógeno sobre los tejidos de las plantas, el crecimiento y reproducción de ese patógeno en los tejidos infectados, constituyen en la realidad dos fases ocurrientes en el desarrollo de una enfermedad dentro del proceso infectivo.

Para que se produzca una infección efectiva, no basta con que el patógeno entre en contacto con su hospedero, ya que debe satisfacerse otra serie de condiciones distintas. La primera de ellas establece que la variedad vegetal debe ser susceptible a un tipo particular de patógeno caso en el que se dice que el tipo del patógeno es virulento a esa variedad de planta, la planta debe pasar por una etapa susceptible debido a que algunos patógenos atacan a las plantas jóvenes, otros a plantas maduras o seniles. Algunos solo a hojas, flores o frutos, e incluso solo a frutos maduros, etc; el patógeno debe pasar por una etapa patógena, como es el caso de las esporas y el micelio de los hongos y las semillas que germinan e infectan inmediatamente sin requerir de un primer periodo de reposo.

- Reconocimiento de las raíces
- Adherencia a la superficie de la raíz y diferenciación de las hifas de penetración endodermis para alcanzar el cilindro vascular.
- Adaptación a un ambiente hostil en el interior de la raíz.
- Proliferación de hifas y producción de microconidias en los vasos xilemáticos.
- Secreción de determinantes de virulencia como péptidos o fitotoxinas.

Las enzimas que degradan las barreras celulares son consideradas porque juegan un papel importante en la patogénesis vegetal causada por hongos, debido a que estas enzimas facilitan la penetración y colonización tisular, para dar paso a continuación a los

determinantes de virulencia los cuales van a ser responsables del desarrollo de los síntomas una vez inicie el crecimiento del hongo dentro del hospedero. (Agrios, 2000). La mayoría de los fitopatógenos secretan enzimas durante toda su existencia al entrar en contacto con un sustrato. Habitualmente, el primer contacto que se establece entre los patógenos y sus hospederos se lleva a cabo en la superficie. Dichas superficies pueden estar constituidas fundamentalmente de celulosa (que es la unidad estructural de la pared de las células epidérmicas de la planta) o de lípidos y proteínas en el caso de la membrana celular. (Agrios, 2000). Las paredes de las células epidérmicas suelen contener también proteínas y lignina. La penetración de los patógenos en los tejidos parenquimatosos y la desintegración de éstos se efectúa mediante degradación de sus partes celulares (que consta de celulosa, pectinas y hemicelulosas) y de la lámina media, constituida en su mayor parte por pectinas. La desintegración total de los tejidos de una planta incluye, además, la degradación de los polisacáridos de reserva como los gránulos de almidón (Agrios, 2000).

En el caso de la patogénesis en plantas se cree que las enzimas degradativas de la pared parecen ser liberadas en secuencia, comenzando por poligalacturonasas degradativas de la lamina media, seguidas por celulasas de diversa naturaleza según las especies fúngicas (Llácer *et al.*, 2000). Así, varias enzimas, pueden actuar sinérgicamente durante la degradación de la cutícula y la pared celular vegetal, por lo que la falta de actividad de una de ellas puede no originar cambios acusados en procesos de infección y colonización.

2.6 Hipótesis

La evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. influye en el control biológico de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*.

2.7 Señalamiento de variables

- Variable Independiente:

Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp.

- Variable Dependiente:

Control Biológico de *Fusarium* sp.

CAPITULO III

METODOLOGIA

3.1 Enfoque

La presente investigación se basó en los enfoques cualitativos y cuantitativos, ya que se realizaron análisis y bioensayos relacionados a Patogenicidad de fitopatógenos del genero *Fusarium* sp. los cuales fueron aislaron de plantas de maracuyá que presentaron síntomas de la enfermedad “fusariosis o secadera”, los cuales fueron inoculados en plantas sanas de maracuyá, para lo que se evaluó la Severidad interna y externa de las plantas mediante escalas visuales de 0 - 4, Incidencia la cual resultó ser una variable binaria (enferma o sana), por ende también se obtuvo el Índice de severidad, curva epidémica de la “fusariosis”, o el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad.

Se evaluó la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp., frente a *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*, basado en velocidades de crecimiento, porcentaje de inhibición del crecimiento radial, y clase de antagonismo.

3.2 Modalidad básica de la investigación

Las modalidades de investigación que se sustentaron en el presente trabajo fueron:

Investigación de Campo: Las muestras de suelo y material vegetal se recolectaron en diferentes zonas productoras del sector La Concordia, Valle Hermoso, Viche.

Las pruebas de Patogenicidad de *Fusarium* se realizaron en Invernadero.

Investigación Experimental: Se utilizaron diferentes métodos de evaluación y aplicación de diseños experimentales.

Investigación Bibliográfica: Mediante la guía de Papers, Boletines, Libros, Folletos, Diarios, se realizó las evaluaciones requeridas en los objetivos de la presente investigación.

Investigación de Laboratorio: En los laboratorios de Protección Vegetal del INIAP en la Estación Experimental Santo Domingo, se realizaron los aislamientos de los microorganismos patogénicos y antagonicos, además se evaluaron la capacidad antagonica de los últimos.

3.3 Nivel o tipo de investigación

El presente proyecto de investigación se basó en: Investigación Descriptiva, Demostrativa y Explicativa, ya que mediante cálculos, caracterizaciones típicas del efecto de los hongos patogénicos en plantas, se demostró lo establecido en la hipótesis.

3.4 Población y muestra

La recolección de material vegetal y suelo se realizaron en diferentes sectores productores de maracuyá de las zonas de La Concordia, Valle Hermoso y Viche, mediante un muestreo al azar del suelo y plantas en fincas que presentaron problemas de fusariosis

3.5 Operacionalización de Variables

Tabla 4 : Variable Independiente: Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp.

CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEMS BÁSICOS	TÉCNICAS INSTRUMENTOS
<p>La evaluación y selección de cepas de <i>Trichoderma</i> sp. son las metodologías que nos conllevan a verificar si las cepas aisladas tienen la capacidad para inhibir el crecimiento de fitopatógenos. Para lograr este objetivo los microorganismos benéficos presentan diferentes modos de acción que les permitan ejercer su efecto biorregulador.</p> <p>Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico</p>	Control Biológico	<p>1. Velocidad de crecimiento, es mayor que en cultivos duales con patógenos.</p> <p>2. El porcentaje de viabilidad, se relacionará con la velocidad de crecimiento (competencia por espacio y nutrientes), en cultivos duales.</p>	<p>¿Por qué?</p> <p>¿Por qué?</p>	<p>Estudios en Laboratorio.</p> <p>Estudios en Laboratorio</p>
	Mecanismos de acción	<p>1. En la interacción de <i>Trichoderma</i> sp. con <i>Fusarium</i> sp. se podrá determinar la cepa que posea mejores características de antagonismo: Velocidad de crecimiento, porcentaje de inhibición del crecimiento radial, tipo de antagonismo</p>	¿Cómo?	Estudios de Laboratorio
		<p>2. Dar a conocer las cepas propicias para llevarlas a investigación de campo.</p>	¿Cómo?	Estudios de Laboratorio

Tabla 5 : Variable Dependiente: Control biológico de *Fusarium* sp.

CONCEPTUALIZACIÓN	CATEGORIAS	INDICADORES	ITEMS BÁSICOS	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS
<p>El control más efectivo de ataque al patógeno se ha obtenido con el empleo de fungicidas químicos método que presenta desventajas económicas y ecológicas por lo costoso y agresivo que resultan estos al medio ambiente.</p> <p>Por esta razón es necesario introducir otras medidas de control que al combinarse con los fungicidas químicos disminuyan el efecto negativo al ambiente.</p> <p>La tendencia actual es desarrollar nuevas alternativas para el manejo a través del uso de agentes de control biológico.</p>	<p>Patogenicidad de <i>Fusarium</i>.</p>	<p>1. Evaluación de Severidad, Incidencia y avance de la enfermedad</p>	<p>¿Cómo?</p>	<p>Evaluaciones en invernadero.</p>
	<p>Presencia de Patógeno <i>Fusarium</i> en material Vegetal.</p>	<p>1. Selección e identificación de la especie de fitopatógeno que causa marchitez vascular en plantas de maracuyá</p>	<p>¿Cómo?</p>	<p>Evaluación en invernadero y Análisis en Laboratorio</p>
	<p>Control biológico en condiciones <i>in vitro</i></p>	<p>1. El crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. se ve afectado por la presencia de <i>Trichoderma</i> sp. en cultivos duales.</p>	<p>¿Por qué?</p>	<p>Estudios de Laboratorio</p>

3.6 Recolección de información, procesamiento, análisis e interpretación

“Las técnicas que fueron utilizadas para la recolección la información se fundamentó en la observación directa, ya que se mantuvo el contacto con el objeto de estudio en escenarios y ambientes debidamente preparados y equipados los cuales condujeron a la comprobación de las hipótesis planteadas”.

3.6.1 Características del sitio experimental.

Tabla 6.- Ubicación geográfica del sitio experimental

Ubicación	Sitio Experimental
Provincia	Sto. Domingo de los Tsáchilas
Cantón	La Concordia
Sector	INIAP
Altitud	300 msnm
Longitud	0°01'36" Norte
Latitud	79°22'17"

Tabla 7. Características edafo - climáticas del sitio experimental

Características	Sitio Experimental
Temperatura promedio anual	24.2°C
Precipitación anual	3045.1 mm
Humedad relativa	85.80%
Topografía	Llano

3.6.2. Aislamiento de microorganismos patógenos y antagónicos.

3.6.2.1. Aislamiento de cepas de *Fusarium* sp. de material vegetal de plantas de Maracuyá.

En los cultivos de Maracuyá (*Passiflora edulis* var. *Flavicarpa*), se identificaron plantas enfermas a causa de *Fusarium* sp., mediante características tales como: coloración rojiza de la raíz principal, amarillamiento de las hojas nuevas, marchitamiento general de la planta. Se enmarcó la planta a sacrificar con los datos del sitio de origen de recolección, para luego ser procesarla en el laboratorio de Protección Vegetal.

Para realizar el aislamiento del fitopatógeno de la muestra vegetal, se lavaron con agua corriente las raíces, cuello de raíz y parte inferior del tallo, para eliminar residuos de tierra. Se realizó cortes del tejido enfermo para someterlo a una desinfección con hipoclorito de sodio al 2.6% de la solución comercial por el lapso de un minuto, se enjuagó las veces necesarias posibles para eliminar los excesos de cloro con agua destilada estéril. Los explantes obtenidos fueron colocara con la ayuda de pinzas estériles en papel absorbente para eliminar el exceso de agua, al instante las muestras fueron sembradas sobre el medio de cultivo PDA, para luego ser incubadas a temperatura ambiente durante 5 días. Ya identificado el hongo patogénico se lo sembró en tubo de ensayo en medio de cultivo PDA, al cual se le dejó incubar por 5 días , este tubo sirvió como primer paso para la purificación del hongo mediante la técnica de aislamiento monospórico

Se realizó la identificación fenotípica macroscópica y microscópica en PDA, e identificación de género de *Fusarium* sp., en medio específico CLA.

3.6.2.2 Aislamiento de cepas de *Trichoderma* sp. de muestras de suelo.

Se realizaron recorridos por sectores productivos de maracuyá en las zonas de La Concordia (Cantón), Valle Hermoso (Parroquia), pertenecientes a la Provincia de Sto. Domingo de los Tsáchilas y Viche (Parroquia) perteneciente a la Provincia de Esmeraldas.

Se realizaron muestreos y recolección de muestras de suelo al azar, por cada sitio elegido se recolectaron muestras que pesaron 2.5 Kg, las cuales se recogieron en fundas plásticas, enmarcada con el sitio de origen

Para el aislamiento de hongos antagonicos se procedió a pesar 50 gr de cada una de las muestras de suelo, las cuales fueron diluidas en 450 ml de agua destilada estéril originando la solución madre 10^0 , a partir de esta dilución madre se efectuaron diluciones seriadas hasta llegar a la solución 10^{-4} .

El medio utilizado en el que se sembró las diluciones fue PDA (Cuadro B1), al medio de cultivo se le agregaron cloranfenicol con el fin de inhibir el crecimiento de bacterias (Agrios, 2000). Por cada dilución se utilizó 5 cajas y en cada una de ellas se sembraron alícuotas de 100 μ l de las diluciones.

Se incubaron a una temperatura 20°C durante 5 días.

Transcurrido el tiempo de incubación se identificaron características microscópicas que presentaron los hongos antagonicos, ya identificados los hongo antagonicos se los sembró en tubos de ensayo en medio de cultivo PDA, a los cuales se los dejaron incubar por 5 días a 20°C, este tubo sirvió como primer paso para la purificación del hongo mediante la técnica de aislamiento monospórico.

3.6.3. Caracterización fenotípica de cepas de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp.

3.6.3.1 Caracterización fenotípica de *Fusarium* sp.

De los aislamientos obtenidos se identificó las siguientes características:

3.6.4. Evaluación de *Fusarium* sp. en cultivo individual

3.6.4.1. Determinación de potencial de inóculo

Se determinó las unidades formadoras de colonias (ufc) para lo cual se realizó una suspensión de esporas con cultivos de *Fusarium* sp., de dos semanas de crecimiento en

PDA al 100%, a cada caja Petri se agregó 20 ml de agua destilada y con la ayuda de una espátula plástica se removió las esporas y el micelio. La solución obtenida se filtró en un beaker por medio de una gasa y se llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada. Por cada aislamiento se realizó el conteo de las ufc utilizando un hematocímetro de Neubauer

3.6.4.2. Velocidad de crecimiento

En la mitad de la caja de medio de cultivo con PDA, con la ayuda de un asa de punta estéril se sembró una pequeña cantidad de esporas de *Fusarium* sp., se procedió a medir el diámetro de crecimiento para determinar la velocidad de crecimiento de cada uno de los hongos antagonistas aislados. (Cuadro B3).

3.6.5 Evaluación de *Trichoderma* sp., en cultivo individual

3.6.5.1. Determinación de potencial de inóculo

Se determinó las unidades formadoras de colonias (ufc) para lo cual se realizó una suspensión de esporas con cultivos de *Trichoderma* sp. de dos semanas de crecimiento en PDA al 100%, a cada caja Petri se agregó 20 ml de agua destilada y con la ayuda de una espátula plástica se removió las esporas y el micelio. La solución obtenida se filtró en un beaker por medio de una gasa y se llevó a un volumen de 100 ml con agua destilada. Por cada aislamiento se realizó el conteo de las ufc utilizando un hematocímetro de Neubauer

3.6.5.2. Velocidad de crecimiento

En la mitad de la caja de medio de cultivo con PDA, con la ayuda de un asa de punta estéril se sembró una pequeña cantidad de esporas de *Trichoderma* sp. se procedió a medir el diámetro de crecimiento para determinar la velocidad de crecimiento, (Cuadro B3), de cada uno de los hongos antagonistas aislados.

3.6.5.3. Viabilidad de esporas

La viabilidad de esporas se determinó con el porcentaje de germinación de *Trichoderma*, para lo cual se tomó una pequeña cantidad de esporas del hongo antagonista *Trichoderma*

de una colonia de 10 días de madurez, y se lo colocó en un tubo de ensayo esterilizado contenido con 10 ml de una solución Tween al 0,1%, se agitaron en un vortex por 15 minutos, y se leyó la concentración de esporas, en una Cámara de Neubauer o hematócmetro.

Se sembró 50 µl de la suspensión de esporas obtenida en PDA, se efectuaron cinco repeticiones por tratamiento, con la ayuda de una espátula de Drigalski se esparció la solución sembrada por la superficie total de la caja Petri con medio, se dejó incubar a 26°C, por el lapso de 12 horas.

Para detener la germinación después del tiempo de incubación se colocaron unas pocas gotas de azul de lactofenol en el medio que contenía las soluciones de esporas, las lecturas de germinación se lo realizó en el Microscopio con el lente de aumento 10X, se realizaron 10 lecturas por repetición.

Se aplicó el Diseño completamente al Azar (Tabla 8), para evaluar los parámetros anteriormente mencionados en cultivos individuales de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp.

Modelo Matemático

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, n \end{cases}$$

Siendo:

Y_{ij} = Variable de respuesta de la ij – ésima unidad experimental.

μ = Media general de la variable de respuesta.

τ_i = Efecto del ij- ésimo tratamiento (nivel del factor) en la variable dependiente.

ε_{ij} = Error experimental asociado a la ij – ésima unidad experimental.

Tabla 8. – Esquema ANOVA, Diseño completamente al azar: Evaluación de *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. en cultivo individual.

Fuentes de Variación (F.V.)	Grados de Libertad (G.L.)	Suma de Cuadrados (S.C.)	Cuadrados Medios (C.M.)	F ₀
Tratamientos	t-1	$\sum_{i=1}^t n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2$	$\frac{S.C.TRAT.}{t-1}$	$\frac{C.M.TRAT}{C.M.ERROR}$
Error	$\sum_{i=1}^t n_i - t$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$\frac{S.C.ERROR}{\sum_{i=1}^t n_i - t} = \sigma^2$	
Total	$\sum_{i=1}^t n_i - 1$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{..})^2$		

3.6.5. Prueba de Patogenicidad de *Fusarium* sp., en plantas de maracuyá.

Para realizar las pruebas de Patogenicidad de *Fusarium* sp., se utilizó el protocolo del postulado de Koch. (Cuadro B4)

En fundas plásticas de pre vivero se colocó 450 gr. de suelo estéril humedecido, se plantó 1 semilla de Maracuyá esterilizada con hipoclorito de sodio al 2.5%, 20 días después de la emergencia, se inoculó con 10 ml de una suspensión de 1×10^6 esp/ml. del fitopatógeno, por cada una de las cepas aisladas de los sectores de estudio, las inoculaciones se realizaron en dos variedades de Maracuyá INIAP 2009 y Variedad Local, se evaluó el avance de la enfermedad, Incidencia de la enfermedad (Cuadro C2), Severidad de la Enfermedad (Cuadro C3a, Cuadro C3b).

Se realizó la inoculación líquida al suelo de *Fusarium* sp. en plantas sanas de maracuyá utilizando colonias del fitopatógeno de dos semanas de crecimiento en medio PDA, se inoculó 1×10^6 esp/ml., se realizó pequeñas heridas en las raíces de las plantas.

Para la determinación de la concentración de esporas de *Fusarium* sp. se realizó una suspensión de esporas con cultivos de *Fusarium* sp. de dos semanas de crecimiento en PDA, para lo cual a cada caja Petri se agregó 20 ml de agua destilada y con la ayuda de una espátula plástica se removieron las esporas y el micelio. La solución que se obtuvo se

filtró en un vaso de precipitación por medio de una gasa y se aforó a un volumen de 50 ml con agua destilada.

Con la ayuda de un hematocímetro de Neubauer se realizó el conteo de las ufc y el ajuste de las concentraciones del fitopatógeno a inocular.

Se seleccionó la cepa del fitopatógeno que más daño causó a las plántulas según los parámetros a evaluar de Severidad Interna, Externa, Avance de la Enfermedad, Incidencia, aplicando un Diseño de Bloques Completamente al Azar con arreglo Factorial a x b (Tabla 9).

3.6.5.1 Diseño Experimental

Para realizar la prueba de Patogenicidad se aplicó el Diseño de bloques completamente aleatorizados con arreglo factorial a x b (Cuadro C4); donde:

Factor a hace referencia a las variedades de plantas de Maracuyá.

Nivel a0 = Variedad INIAP 2009

Nivel a1 = Variedad Local

Factor b hace referencia a los hongos *Fusarium* sp., aislados de material vegetal.

Nivel b0 = Inoculación sin hongo (Testigo)

Nivel b1 = FL – 1

Nivel b2 = FL – 2

Nivel b3 = FV – 1

Nivel b4 = FI – 1

Nivel b5 = FI -2

Nivel b6 = FI – 3

Nivel b7 = FSM – 1

Nivel b8 = FSM- 2

Modelo matemático

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \gamma_k + \varepsilon_{ijk} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, b \\ k = 1, 2, \dots, r \end{cases}$$

Dónde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta observada a medida en la ijk – ésima unidad experimental.

μ = Media general.

α_i = Efecto del i – ésimo nivel del factor “a”

β_j = Efecto del j – ésimo nivel del factor “b”

$(\alpha\beta)_{ij}$ = Efecto de la interacción entre el i – ésimo nivel del factor “a” y el j – ésimo nivel del factor “b”.

γ_k = Efecto del k – ésimo bloque.

ϵ_{ijk} = Error experimental asociado a la ijk – ésima unidad experimental.

Tabla 9. Esquema de ANOVA (Diseño de Bloques Completamente al Azar con arreglo factorial axb)

Fuente de variación (FV)	Grados de libertad (G.L.)	Suma de Cuadrados (SC)	Cuadrados Medios (CM)	F calculada
Total	$(abr - 1)$	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^c Y_{ijk}^2 - \frac{(Y_{...})^2}{abr}$		
Tratamientos	$(a - 1)(b - 1)$	$\sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \frac{Y_{ij.}^2}{r} - \frac{Y_{...}^2}{abr} - SCA - SCR$	$\frac{SCTr.}{G.L.Tra.}$	$\frac{CMTr.}{CME.Exp.}$
Factor a	$(a - 1)$	$\sum_{i=1}^a \frac{Y_{i..}^2}{rb} - \frac{Y_{...}^2}{abr}$	$\frac{SCTr a}{G.L.Tra a}$	$\frac{CMa}{CME.Exp.}$
Factor b	$(b - 1)$	$\sum_{j=1}^b \frac{Y_{.j.}^2}{ra} - \frac{Y_{...}^2}{abr}$	$\frac{SCTr b}{G.L.Tra b}$	$\frac{CMb}{CME.Exp.}$
Repeticiones (bloques)	$(r - 1)$	$\sum_{k=1}^r \frac{Y_{k..}^2}{ab} - \frac{Y_{...}^2}{abr}$	$\frac{SC Re p.}{GL Re p.}$	$\frac{CM Re p.}{CME.Exp.}$
Error Exper.	$(ab - 1)(r-1)$	$SC_{TOTAL} - SC_{BLOQUES} - SC_A - SC_B - SC_{AB}$	$\frac{SCE.Exp.}{G.L.E.Exp.}$	

3.6.6. Capacidad Antagónica de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium* sp. en condiciones in vitro

3.6.6.1. Competencia por Espacio y Sustrato

La competencia por espacio y nutrientes se valoró comparando la velocidad de crecimiento (Cuadro B3), de los hongos en estudio, para lo cual se tomaron los radios de crecimiento del patógeno y del antagonista. En una caja Petri con PDA, se colocaron en un extremo un disco de 5mm de diámetro con micelio activo de la colonia fungosa de *Fusarium*, luego se colocó un disco de 5 mm de diámetro al lado opuesto con micelio activo de *Trichoderma*, se realizó las medidas del crecimiento radial de las dos colonias cada 12 horas, hasta el momento de contacto de las colonias entre si.

3.6.6.2. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial PICR

Para determinar el (PICR) Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (Cuadro B5), se lo realizó mediante siembras duales en donde en cajas Petri con PDA, se colocó en un extremo un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo del antagonista y al extremo opuesto se colocó un disco de 5 mm con el patógeno, obtenidos con un sacabocados desde los márgenes de cultivos de 8 días de incubación, se realizaron cinco repeticiones para cada combinación fitopatógeno – antagonista, para el tratamiento testigo se colocó un disco con micelio activo del patógeno *Fusarium*, las cajas con los respectivos tratamientos y testigos se dejaron incubar en condiciones de laboratorio de 27°C, la evaluación terminó cuando el crecimiento del patógeno testigo cubrió la superficie de la caja Petri.

3.6.6.3. Clase de Antagonismo

Para evaluar la el tipo de Antagonismo al que pertenece *Trichoderma* sp. se utilizó la tabla creada por Bell, *et al* (1982), (Cuadro B6), en cultivo dual entre *Trichoderma* sp. vs. *Fusarium* sp.

3.6.6.4.- Diseño experimental aplicado a cultivos duales

Se aplicó el diseño Completamente al Azar de un solo Factor, para evaluar los parámetros anteriormente escritos en cultivos individuales de *Fusarium* sp. y *Trichoderma* sp.

Modelo Matemático

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij} \quad \begin{cases} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{cases}$$

Siendo:

Y_{ij} = Variable de respuesta de la ij – ésima unidad experimental.

μ = Media general de la variable de respuesta.

τ_i = Efecto del ij- ésimo tratamiento (nivel del factor) en la variable dependiente.

ε_{ij} = Error experimental asociado a la ij – ésima unidad experimental.

Tabla 10.- Esquema ANOVA Diseño Completamente al Azar

Fuentes de Variación (F.V.)	Grados de Libertad (G.L.)	Suma de Cuadrados (S.C.)	Cuadrados Medios (C.M.)	F ₀
Tratamientos	t-1	$\sum_{i=1}^t n_i (\bar{Y}_i - \bar{Y}_{..})^2$	$\frac{S.C.TRAT.}{t-1}$	$\frac{C.M.TRAT}{C.M.ERROR}$
Error	$\sum_{i=1}^t n_i - t$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_i)^2$	$\frac{S.C.ERROR}{\sum_{i=1}^t n_i - t} = \sigma^2$	
Total	$\sum_{i=1}^t n_i - 1$	$\sum_{i=1}^t \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij} - \bar{Y}_{..})^2$		

CAPITULO IV

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Aislamiento, caracterización macroscópica y microscópica de cepas de *Fusarium* sp. de muestras de material vegetal.

Los hongos *Fusarium* sp., fueron aislados de muestras vegetales de plantas de maracuyá, que presentaron características típicas de la enfermedad “secadera o marchitez vascular”, en diferentes zonas agrícolas que presentaron problemas fitosanitarios, se encontraron gran variedad de hongos del género *Fusarium*, los aislados en total fueron 22 hongos asociados a las raíces de plantas enfermas, al realizar las caracterizaciones visuales se seleccionaron 8 cepas (Tabla A1), de diferente morfología.

Los diferentes hongos aislados presentan características visuales microscópicas y macroscópicas comunes en hongos del género *Fusarium* sp. (Tabla A2, Tabla A3), las colonias presentan diversas coloraciones en medio PDA, debido a la gran biodiversidad de la microbiota del suelo, mostraron características microscópicas muy diferenciadas entre las cepas en estudio, aportando de manera positiva a la posible existencia de varias especies de *Fusarium*.

El diámetro de crecimiento de las colonias puras de *Fusarium* sp., a las 72 horas depende de la especie a la que este género pertenece (Tabla A2), en tanto se puede observar que existe diferencia de crecimiento radial al tercer día en todas las cepas, las cepas FL – 2, FI – 1, FI – 2, FI - 3 tienen rangos de crecimiento en las temperaturas de 25 y 30 °C, que van dentro de 25 a 40 mm de crecimiento radial, característica típica de género *oxysporum*, y del género *solani* que al tercer día después de la siembra presenta diámetros de crecimiento

que van de 21 a 29 mm de diámetro a temperatura de 25 °C, y 26 a 36 mm de diámetro a 30°C.

Para poder realizar la identificación de las especies de los aislados de *Fusarium*, se inocularon los cultivos monospóricos en el medio microbiológico Agar hoja de clavel (Cuadro B2), haciendo posible la identificación de las especies *solani*, y *oxysporum*. (Tabla A4), basándonos en la morfología haciendo comparaciones bibliográficas con los aislamientos obtenidos, en donde se destaca las características muy parecidas entre *Fusarium solani* y *oxysporum*, como la presencia de microconidias que pueden ser unicelulares o bicelulares las formas en las que pueden presentarse como oval, reniforme, ovoide con la base truncada, la presencia de Clamidosporas terminales, intercalares, solas o en pares, incluso la forma de las células apicales y basales pueden tener un gran parecido, las características que nos ayuda a diferenciar una especie de otra es que en la observación microscópica es muy notable diferencia del tamaño de las fiálides y macroconidias donde en *solani* las fiálides son largas, las macroconidias más gruesas, las células apicales y basales son más redondas que las de *oxysporum*.

4.2 Aislamiento, caracterización macroscópica y microscópica de cepas de *Trichoderma* sp. de muestras de suelo

Se aislaron 7 cepas de *Trichoderma* sp., de los diferentes sectores productivos de maracuyá (Tabla A5). El aislamiento de muestras de suelos de hongos *Trichoderma* sp., con posibles características antagónicas se han visto limitadas en los últimos años debido al manejo preventivo de enfermedades fúngicas en los cultivos de maracuyá con químicos que no solo perjudican a los hongos patógenos también a los benéficos.

En la caracterización macroscópica y microscópica de los aislados de *Trichoderma* sp., (Tabla A6, Tabla A7), se identificaron características típicas y comunes de los hongos pertenecientes a este género, tomando en cuenta que morfológicamente presentan características consistentes como color, presencia o ausencia de pigmentación en el medio, aspectos de las colonias en medio microbiológico PDA, siendo necesaria la caracterización microscópica básica, sin poder identificar las especies de cada uno de los aislados de *Trichoderma* sp., con el fin de evitar reportar información errónea.

4.3. Evaluación de *Fusarium* sp. en cultivo individual

4.3.1 Competencia por espacio y nutrientes de *Fusarium* sp.

La competencia por espacio y nutrientes está dado por la velocidad de crecimiento de los microorganismos en la superficie del medio microbiológico sintético PDA, en cuadro de análisis de varianza (Cuadro A1, Gráfico A1), se puede observar que existe diferencia de velocidad de crecimiento entre los tratamientos (Hongos *Fusarium* sp.), teniendo que aplicar la prueba de Tukey al 5%, obteniendo como resultados que los hongos FSM – 1, FSM – 2 aislados de muestras vegetales de plantas enfermas de maracuyá del sector Santa Martha presentaron diferencia de velocidad de crecimiento sobre los demás hongos, destacándose como buenos competidores por espacio y nutrientes.

4.3.2 Potencial de inóculo de *Fusarium* sp.

El potencial de inóculo está dado por la concentración de esporas de cada caja inoculada del hongo en 500 ml de agua.

En el análisis de varianza (Cuadro A2, Gráfico A2), se puede observar que existe diferencia significativa entre los tratamientos ($P = 0,0001$), obteniendo como resultado que los tratamientos FI – 3, FI – 1, presentaron mayor potencial de inóculo que el tratamiento FL – 2 y este a su vez presentó mejores resultados que los tratamientos FI – 2, FSM – 2, FL – 1, FSM – 1, FV – 1, por lo que podemos deducir que los tratamientos que mostraron diferencias significativas debe poseer las mismas cualidades en el medio natural, es decir al producir gran cantidad de inóculo pueden fácilmente colonizar la rizosfera de suelos y raíces de plantas.

4.4 Evaluación de *Trichoderma* sp. en cultivo individual

4.4.1 Determinación del potencial de inóculo

Como se puede observar en los cuadros de análisis de varianza (Cuadro A3, Gráfico A3), muestran diferencias significativa entre los tratamientos (hongos aislados), teniendo que realizar la prueba de Tukey al 5%, los resultados de Potencia de inóculo de *Trichoderma* sp., está dado por la concentración de esporas por ml que es capaz de producir una caja del

hongo antagónico en 500 ml de agua, el hongo TSM – 1, aislado del sector Sta. Martha (La Concordia), obtuvieron los mejores resultados del potencial de inóculo (esp/ml) en comparación con los demás hongos: TI – 1, TL – 1, TSM -2 , TBI – 1, TSA – 1, TI – 2, aislados de muestras de suelo y material vegetal, es decir muestran mayor capacidad para producir esporas, por lo tanto poseerá la misma tendencia de la germinación, haciéndolos aptos a estos hongos para ser utilizados como potenciales antagonistas de *Fusarium sp.*

4.4.2 Competencia por espacio y nutrientes de *Trichoderma sp.*, en monocultivo.

La competencia por espacio y nutrientes está dado por la velocidad de crecimiento en la superficie del medio por parte de los hongos antagónicos.

En el cuadro de análisis de varianza con respecto a la velocidad de crecimiento (Cuadro A4, Gráfico A4), se observa que existe diferencia significativa entre los tratamientos (hongos *Trichoderma sp.*), teniendo que realizar la prueba de Tukey al 5%, obteniendo como resultados que los hongos TSM – 1, TI – 1, aislados del sector Sta. Martha (La Concordia), y La Independencia (La Concordia), correspondientemente, mostraron mayor índice de velocidad de crecimiento, es decir crecieron más que los demás aislados y a mayor velocidad, por lo que se puede deducir que requerirán de mayor cantidad de nutrientes y espacio para poder continuar con su desarrollo biológico, optando por ser esta una de las básicas y más importantes características que debe cumplir un hongo antagónico en un medio natural, considerando a estas cepas como potencialmente cepas de control biológico.

4.4.3 Viabilidad de esporas

La viabilidad de esporas está dada por el % de germinación en condiciones *in vitro*. Como se puede observar en los cuadros de análisis de varianza (Cuadro A5), muestran diferencias significativas entre los tratamientos (hongos aislados), teniendo que realizar la prueba de Tukey al 5%, para la Viabilidad en *Trichoderma sp.* los hongos TSM – 1, TSM 2, aislados del sector Sta. Martha (La Concordia), obtuvieron los mejores resultados de viabilidad en comparación con los demás hongos TL – 1, TI – 1, TSA – 1, TBI – 1, TI – 2, aislados de muestras de suelo y material vegetal, es decir muestran mayor capacidad para germinar, por

ende el crecimiento poseerá la misma tendencia de la germinación, haciéndolos aptos a estos hongos para ser utilizados como potenciales antagonistas de *Fusarium* sp.

4.5. Prueba de Patogenicidad de *Fusarium* sp. en plántulas de maracuyá.

4.5.1 Severidad de la planta

4.5.1.1 Severidad Externa e Interna

La severidad cuantifica la cantidad del tejido vegetal que ha sido afectada por un patógeno, midiéndose la severidad externa e interna con el fin de confirmar que los síntomas que presenta la planta se ve directamente relacionada con el patógeno causante de la enfermedad, las evaluaciones se las realizo cada 7 días a partir de la inoculación.

En el análisis de varianza correspondiente a la Severidad Externa (Cuadro A6) , se acepta la hipótesis nula para el factor A (variedad de plantas), debido a que no existe diferencia significativa ($p = 0.1132$), mientras que se distingue diferencias significativas para el factor B (Hongos), (Gráfico A6), ($p = 0.0001$), por lo que se aplicó la prueba de Tukey al 5%, demostrando que el hongo FL – 2, aislado del sector Los Limones resulto ser el hongo que presentó mayor capacidad patogénica, en relación con los demás hongos aislados de muestras vegetales de plantas enfermas.

En los resultados del análisis de varianza (Cuadro A6), para la interacción de factores (Variedad x Hongos) no existe diferencia significativa ($p = 0.8774$), por lo cual se acepta la hipótesis nula.

Para determinar la severidad interna de la enfermedad sobre la planta se finalizó el ensayo para cortar a las plantas en la base del tallo y así determinar en escalas la severidad interna (Cuadro A7a), obteniendo como resultado en el análisis de varianza, no existe diferencias significativas para el factor A (Variedades), ($p = 0,0622$) por lo que se acepta la hipótesis nula, mientras que para el factor B (Hongos) existe diferencia significativa ($p = 0.0001$), aceptando la hipótesis alternativa, teniendo que aplicar la prueba Tukey al 5% (Gráfico A7a), donde se muestra que el hongo FL – 2, tiene mayor efecto que los demás hongos del mismo género que entre si no mostraron diferencias significativas.

En el análisis de varianza para la interacción de factores (Variedades x Hongos), (Cuadro A7b), (Gráfico A7b), existe diferencias significativas ($p = 0.0103$), por lo que se aplica Prueba de Tukey al 5%, obteniendo como resultado de la prueba que el hongo FL – 2 causo mayor impacto en cuanto a la severidad interna en plantas de maracuyá variedad INIAP 2009, en relación a los demás hongos que pertenecen al mismo género que no presentaron mayor efecto a la variedad INIAP 2009 y en la variedad Local, se identificó la especie a la que pertenece la cepa FL - 2 que es *Fusarium solani*.

En base a estos resultados podemos decir que la Variedad INIAP – 2009 presentó mayor susceptibilidad (2.67), al ataque del hongo *Fusarium solani*, en comparación a la variedad Local, la cual presentó menor índice de severidad 2.17 (Tabla A8a).

4.5.2 Incidencia de la enfermedad

La incidencia de la enfermedad es la cantidad de individuos enfermos en la población.

Se puede observar (Tabla A8a), que la enfermedad presentó una incidencia del 100% en el tratamiento de plantas variedad INIAP 2009, inoculadas con el hongo patogénico FL – 2 (*Fusarium solani*) con índices de severidad del 2.67 resultando este el índice máximo de severidad indicando una vez más que el patógeno está relacionado directamente como causante de la enfermedad con índices de mortalidad del 50% de plantas, y el otro 50% presentaron grados de severidad que de 1 y 2, de igual forma para el tratamiento Tf planta variedad Local inoculada con la cepa patogénica FL – 2 (*Fusarium solani*), presentaron incidencia del 100% con índice de severidad de 2.16, de donde el 33% de plantas murieron y el 67% de plantas presentaron síntomas de la enfermedad.

El tratamiento Tg mostró un porcentaje de incidencia del 83%, es decir las plantas mostraron grados de severidad de 1, con un índice de severidad del 0.83 lo cual nos indica que la cepa FV – 1, no provoca mayor daño en las plantas Variedad INIAP 2009.

El tratamiento Tq (variedad INIAP - 2009 inoculada con la cepa FSM – 2), presento una incidencia del 67%, con un índice de severidad de 0.67, indicando que el grado de severidad de las plantas enfermas llego a 1, lo que indica que el hongo no causa mayor daño en plántulas de maracuyá.

El tratamiento Tc (Variedad INIAP – 2009 inoculada con hongo FL – 1), mostró una incidencia del 50% , con un índice de severidad de 0.5%, el tratamiento Tj (Variedad Local inoculada con hongo FI – 1), (Tabla A8b), mostro incidencia de la enfermedad del 50%, con índices de severidad de 0.5, Tratamientos Tm (Variedad INIAP – 2009 inoculada con la cepa FI – 3), Tn (Variedad Local inoculada con cepa FI – 3), y To (Variedad INIAP – 2009 inoculada con cepa FSM – 1), (Tabla A8c), mostraron una incidencia del 50%, con índices del 0.5.

Los índices de severidad es la media de grados de severidad del tratamiento, para completar los análisis se puede observar el Cuadro A6b, en donde el resultado del análisis de varianzas indica que el hongo FL – 2 (*Fusarium solani*), en la variedad INIAP – 2009, muestra ser diferente en comparación con los demás tratamientos.

4.6. Capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*.

4.6.1 Competencia por Espacio y Sustrato

En el Análisis de Varianza (Cuadro A8), se puede observar que los datos obtenidos de la velocidad de crecimiento de *Trichoderma* sp. en cultivo dual con *Fusarium solani*, no existe diferencia significativa en los antagonista ($p = 0.1091$), los resultados de análisis no presenta diferencia significativa entre los tratamientos (Cuadro A9) para velocidades de crecimiento de *Fusarium solani* en cultivo dual con 7 cepas de *Trichoderma* sp., existe diferencia significativa ($p = 0.0001$), teniendo que aplicar la prueba de Tukey al 5% (Gráfico A9), donde se obtuvo que el patógeno FL – 1 en cultivo dual con TSA – 1, presento mayor velocidad de crecimiento (media de 0.17 mm/h), en comparación con los tratamientos (patógeno FL – 1 en cultivo dual con los antagonicos TSM – 2, TI – 1, TI – 2,) donde se obtuvieron velocidades de crecimiento del patógeno de 0.1, 0.1, 0.11 mm/h, en cultivo dual respectivamente, dando como indicio a que los tres antagonicos inhibieron su crecimiento en mayor proporción que los otros del mismo género.

4.6.2 Porcentaje de inhibición del crecimiento radial PICR

El análisis de varianza del PICR (Cuadro A10), muestra diferencias significativas en los tratamientos ($p = 0.0003$), al realizar la prueba de Tukey al 5%, (Gráfico A9) se observa que existió inhibición del crecimiento mostrando medias de 60,45 (FL – 1 – TSA – 1) , mostró menor PICR, y los tratamientos que no mostraron diferencia significativa entre ellos pero manifestaron altos porcentajes de inhibición del crecimiento radial del patógeno en cultivo dual son: 69.7% (FL – 1 – TSM – 1), 71.01% (FL – 1 – TI- 1), 71,96% (FL – 1 – TSM – 2), 72,31% (FL – 1 – TI – 2), 72, 35% (FL – 1 – TL – 1).

4.6.3 Clase de Antagonismo

El análisis de varianza de la Clase de antagonista de *Trichoderma* en cultivo dual nos muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 0.5269$), (Cuadro 11), aceptando la hipótesis nula en donde los tratamiento expresa tener iguales resultados, dando una media de calificación de 2.

4.7. Verificación de la Hipótesis

Hipótesis Nula (H₀):

La evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. no influye en el control biológico de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*

Hipótesis Alternativa (H₁):

La evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. si influye en el control biológico de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*

Decisión:

En base a los resultados experimentales de las diferentes evaluaciones realizadas sobre la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp., sobre *Fusarium* sp., se rechaza la hipótesis nula, aceptando la hipótesis alternativa la cual dice que: La evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. si influye en el control biológico de *Fusarium* sp. en condiciones *in vitro*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- En el presente trabajo de investigación se evaluó y seleccionó cepas de *Trichoderma* sp., para aplicarlo como controlador biológico de *Fusarium solani* en cultivos de maracuyá, mediante pruebas antagónicas *in vitro*.

La selección de las cepas de *Trichoderma* sp., con buenas características biocontroladoras se lo realizó en base a los resultados obtenidos de las evaluaciones antagónicas realizadas en condiciones *in vitro* en cultivos duales, las cepas de *Trichoderma* sp., que presentaron alta capacidad para Inhibir el crecimiento radial del patógeno, donde se obtuvo inhibiciones de crecimiento del patógeno *Fusarium solani* en porcentajes que van desde 69,7 a 72.35%, los antagónicos inhibieron la velocidad de crecimiento del fitopatógeno, y se determinó la clase de antagonista las cuales fueron de tipo 2 las cepas: TSM – 1; TI- 1, TSM – 2, TI – 2, TL – 1.

- Se aisló 8 cepas de *Fusarium* sp, de tejido vegetal de plantas de maracuyá que presentaron síntomas de la enfermedad “marchitez vascular o secadera” a las cuales se las caracterizó morfológica, macroscópica y microbiológicamente, llegando a determinar que 3 cepas pertenecían a la especie *oxysporum* y una de ella a la especie *solani*.

- Mediante la realización de pruebas de Patogenicidad que involucraron las 8 cepas del hongo *Fusarium* sp., inoculadas en las dos variedades de maracuyá, la especie fue identificada en base a su morfología, características microscópicas en medios microbiológicos PDA y CLA (estos medios permitieron que las forma de las conidias mantengan uniformidad), y a la sintomatología que la enfermedad presentó en plantas de maracuyá inoculadas con el fitopatógeno concluyendo que *Fusarium solani* es agente causal de la marchitez “vascular o secadera” en las zonas de *La Concordia, Viche, Sto. Domingo*.
- Se propuso la evaluación de capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno *Fusarium*, en condiciones *in vitro*, con el fin de mantener un buen manejo microbiológico en la selección de las mejores cepas antagónicas y verificando la viabilidad de la utilización de cada uno de los protocolos de laboratorio.

5.2 Recomendaciones

- Se recomienda realizar la identificación de las especies de cada una de las cepas de *Trichoderma* sp., que fueron seleccionadas como potenciales controladores biológicos de *Fusarium solani*.
- Realizar ensayos de biocontrol de *Fusarium solani* en condiciones de invernadero aplicando las cepas seleccionadas de *Trichoderma* sp.
- Realizar pruebas de promoción de crecimiento en plantas de maracuyá. aplicando las cepas de *Trichoderma* sp., asiladas en el presente estudio.
- Realizar un estudio en otras zonas productoras de maracuyá con problemas fitosanitarios relacionados con la marchitez vascular, para determinar si

Fusarium oxysporum se encuentra asociado como agente causal de la enfermedad, en el Ecuador.

- Realizar ensayos de promoción de crecimiento en plántulas de maracuyá, aplicando las cepas de *Fusarium oxysporum* identificadas en la presente investigación, las cuales no causaron la enfermedad en plantas.

CAPITULO VI

PROPUESTA

6.1 Datos Informativos

- ❖ **Título:** Evaluación de la capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* sp. sobre el fitopatógeno *Fusarium* sp., en condiciones *in vitro*.
- ❖ **Unidad Ejecutora:** Universidad Técnica de Ambato (UTA), a través del INIAP – Santo Domingo, Área de Protección Vegetal - Laboratorios de Control biológico.
- ❖ **Beneficiario:** El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias, Estudiantes de Fitopatología, Productores de Maracuyá, Estudiantes de Universidades.
- ❖ **Director del Proyecto:** Ing. Juan Ramos.
- ❖ **Personal Operativo:** Egda. Ana María Martínez Bolaños.
- ❖ **Tiempo de Duración:** Tres meses.
- ❖ **Lugar de Ejecución:** INIAP – Santo Domingo, Área de Protección Vegetal - Laboratorios de Control biológico
- ❖ **Costo:** \$ 2000,00

6.2 Antecedentes de la propuesta

Fernández, *et al.* 2009, realizaron pruebas *in vitro* empleando la técnica de cultivo dual en platos Petri con Agar Sabouraud. Se evaluó competencia por nutrientes y espacio, micoparasitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR), por 10 días a 28 °C. Establecieron un diseño completamente aleatorio, con 13 tratamientos y 3 repeticiones. Todos los aislamientos de *T. harzianum* superaron en crecimiento a *F. oxysporum* con radios de de 7,42 cm en cultivo dual. Mientras que el patógeno mostró un radio de 1,99 cm. TCN-009 y TCC-006 expresaron los mejores radios al crecer 4 veces mas rápido que *F. oxysporum* y reducir 3 veces menos el RCP con respecto al testigo, sin diferencias significativas entre estos tratamientos ($P=0,0001$); además, produjeron el mayor PICR a los 10 días con valores de 64,61 y 65,91%, respectivamente. No hubo diferencias significativas al comparar los aislamientos comerciales y nativos; sin embargo, por la naturaleza autóctona TCN-009, resulta ser a nivel *in vitro*, el aislamiento más promisorio en el biocontrol de *F. oxysporum* por hallarse en condiciones agroclimáticas similares en la Zona Bananera Colombiana.

Martínez, *et al.* 2009, obtuvieron que el 81,35 % de los aislados en estudio se ubicaron en los grados 1 y 2 de la Escala de Bell, a los tres días de evaluados, lo que expresa el gran potencial de competencia que presenta *Trichoderma* dado fundamentalmente por su velocidad de crecimiento que es superior a la del patógeno, y oscila en este caso, entre 0,15 mm.h^{-1} a 0,79 mm.h^{-1} en cultivo dual en la totalidad de los aislados evaluados. El testigo de *Rhizoctonia* alcanzó su máximo crecimiento a los cuatro días, iniciando la formación de esclerocios a partir de las 72 horas, completando el crecimiento micelial de la placa Petri después de los siete días.

Yumbay, 2011., evaluó la actividad antagonista de *Trichoderma* spp., según la escala de Bell *et al.*, (1982), encontró diferencias significativas. El tipo de antagonismo según Bell *et al.*, (1982) fue de clase 1 al observar el crecimiento de los dos hongos, las cepas de *Trichoderma* 7c, 3c, 5b, 9a, 7b, 12b, 13b, 8a, C19, 16c y 7a fueron capaces de atacar el hongo *Botrytis cinerea* y cubrirlo totalmente, mientras que las cepas 2c, 15b, 6b, 10a, 10b, 8b, 15a, 10c y 5c sobrecreció aproximadamente las dos terceras partes de la superficie del

medio. Para las cepas 11b y 13c ninguno de los dos hongos fue dominante, cada uno cubrió el 50% de la superficie del medio de cultivo, que correspondió a la clase 3. También analizó el crecimiento de *Botrytis cinerea* durante las pruebas de antagonismo se encontró que el conglomerado 1 (cepas 8a, 10a, 8b, 6b, C19, 5b y 7b) presentó un menor crecimiento, es decir que las cepas de *Trichoderma* spp., presentaron una mayor capacidad de inhibición. El conglomerado 2 y 3 (cepas 15a, 13b, 11b, 9a, 10b, 12b, 3c, 10c, 7c, 7a, 2c, 15b, 5c, 13c y 16c) se consideró un solo grupo ya que no presentan diferencias significativas.

6.3 Justificación

La evaluación de la capacidad antagónica en condiciones *in vitro* de microorganismos con posibles capacidades biocontroladora sobre patógenos, es necesaria realizarla ya que estas actividades nos permitirán conocer las características favorables de los posibles antagonistas y así se procederá a realizar la selección de los mismos basándonos en el conocimiento de la biología, comportamiento frente a otros microorganismos de interés en condiciones *in vitro* para en cierta forma predecir un supuesto comportamiento en condiciones *in situ* frente a otros microorganismos de interés, su inocuidad, facilidad de reproducirlos en los laboratorios.

6.4 Objetivos

6.4.1 Objetivo General

- Evaluar la capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* sobre el fitopatógeno *Fusarium*, en condiciones *in vitro*.

6.4.2 Objetivo Específico

- Evaluar la competencia por espacio y nutrientes de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium* sp.

- Evaluar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial de *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium* sp.
- Determinar el tipo de antagonismo que presenta *Trichoderma* sp. sobre *Fusarium* sp.

6.5 Análisis de factibilidad

La propuesta de investigación es de tipo bibliográfico y experimental debido a que se utilizaron protocolos establecidos mundialmente para la evaluación de las capacidades antagónicas de los potenciales hongos biocontroladores *Trichoderma* sp., el utilizar un hongo que crece fácilmente en casi cualquier sustrato hace que sea factible su utilización y por ende nos acerquemos a obtener excelentes resultados de las pruebas de laboratorio, para después reproducirlos a gran escala para su aplicación en invernadero y campo.

La evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp, resulta factible ya aporta positivamente al factor socioeconómico, ambiental, cultural, y científico ya que se estará manteniendo la sustentabilidad con el medio ambiente se aportara con conocimientos a la investigación agronómica y microbiológica acerca de la utilización de controladores biológicos.

6.6 Fundamentación

Según (Ahmad, *et al.*, 1987 y Hjeljord, *et al.*, 1998), mencionado por Infante, *et al.*, 2009, la competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros.

La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy

eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico, según Pérez, 2004. Hjeljord, 1998. Mencionado por Infante, *et al.*, 2009.

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros), y microelementos. Villegas., 2005; Eveleigh, *et al.*, 1986. Mencionado por Infante, *et al.*, 2009.

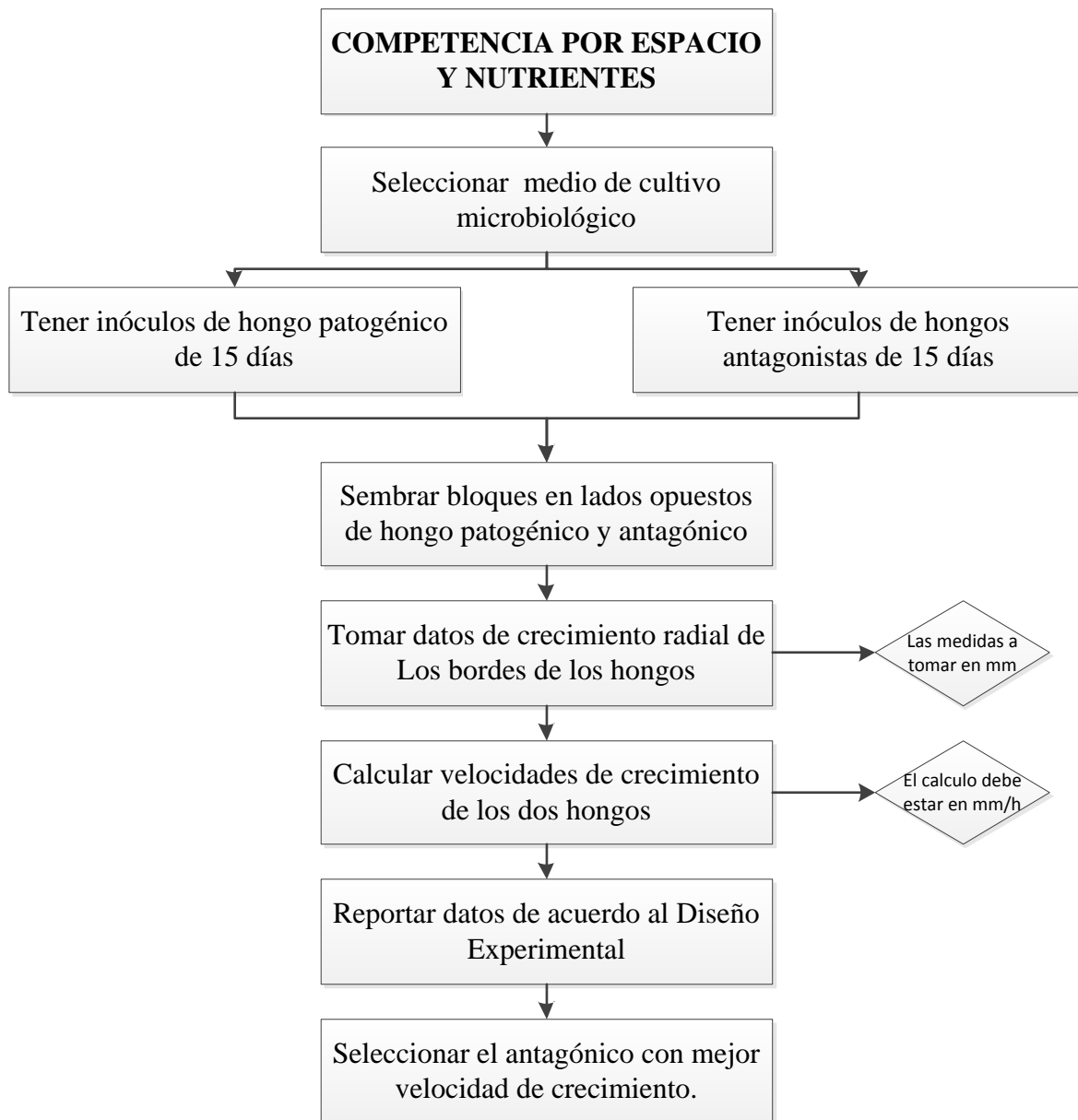
La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato.

6.7 Metodología Modelo Operativo

Fases	Metas	Actividades	Responsables	Recursos	Presupuesto	Tiempo
Formulación	Investigar las características que debe poseer un antagonista	Investigación Bibliográfica	Investigador	Humanos Económicos	100 dólares	2 semanas
Desarrollo	Evaluar la capacidad antagónica de <i>Trochodema</i> sp.	Realizar los protocolos experimentales para determinar las capacidades antagónicas de <i>Trichoderma</i> sp.	Investigador	Humanos Económicos Tecnológicos	400 dólares	1 meses
Ejecución	Selección de cepas antagónicas con mejores cualidades biocontroladoras.	Realizar los análisis estadísticos de los resultados experimentales.	Investigador	Humanos Tecnológicos Económicos	300 dólares	1 mes
Valoración	Producción a gran escala de los hongos biocontroladores en laboratorio.	Verificar que el efecto sobre patógenos no se altere en los procesos de producción masiva.	Investigador	Humanos Tecnológicos Económicos	400 dólares	1 mes

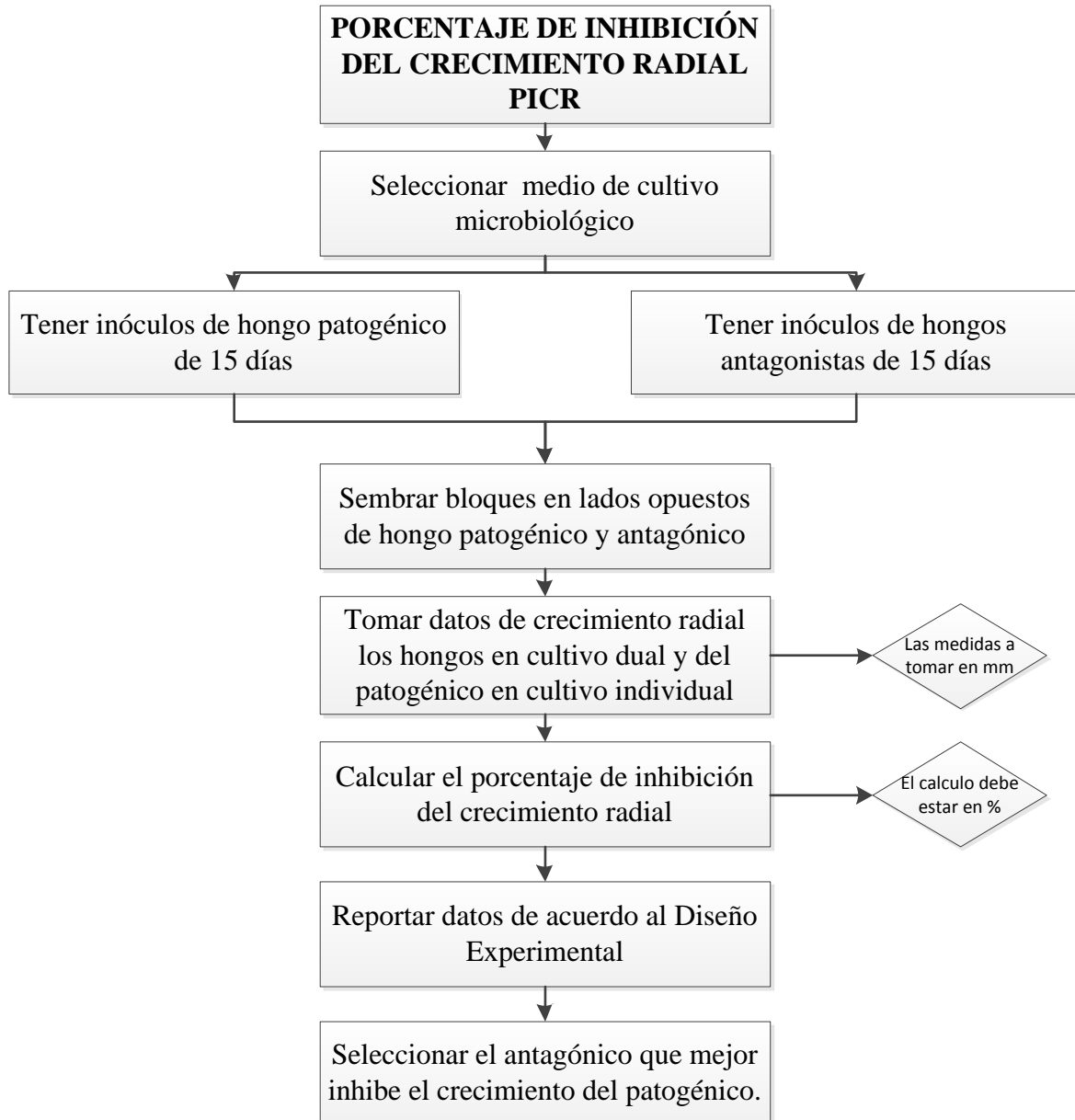
6.7.1 Evaluar la competencia por espacio y nutrientes

Para evaluar la competencia por espacio y nutrientes se realizará los siguientes pasos:



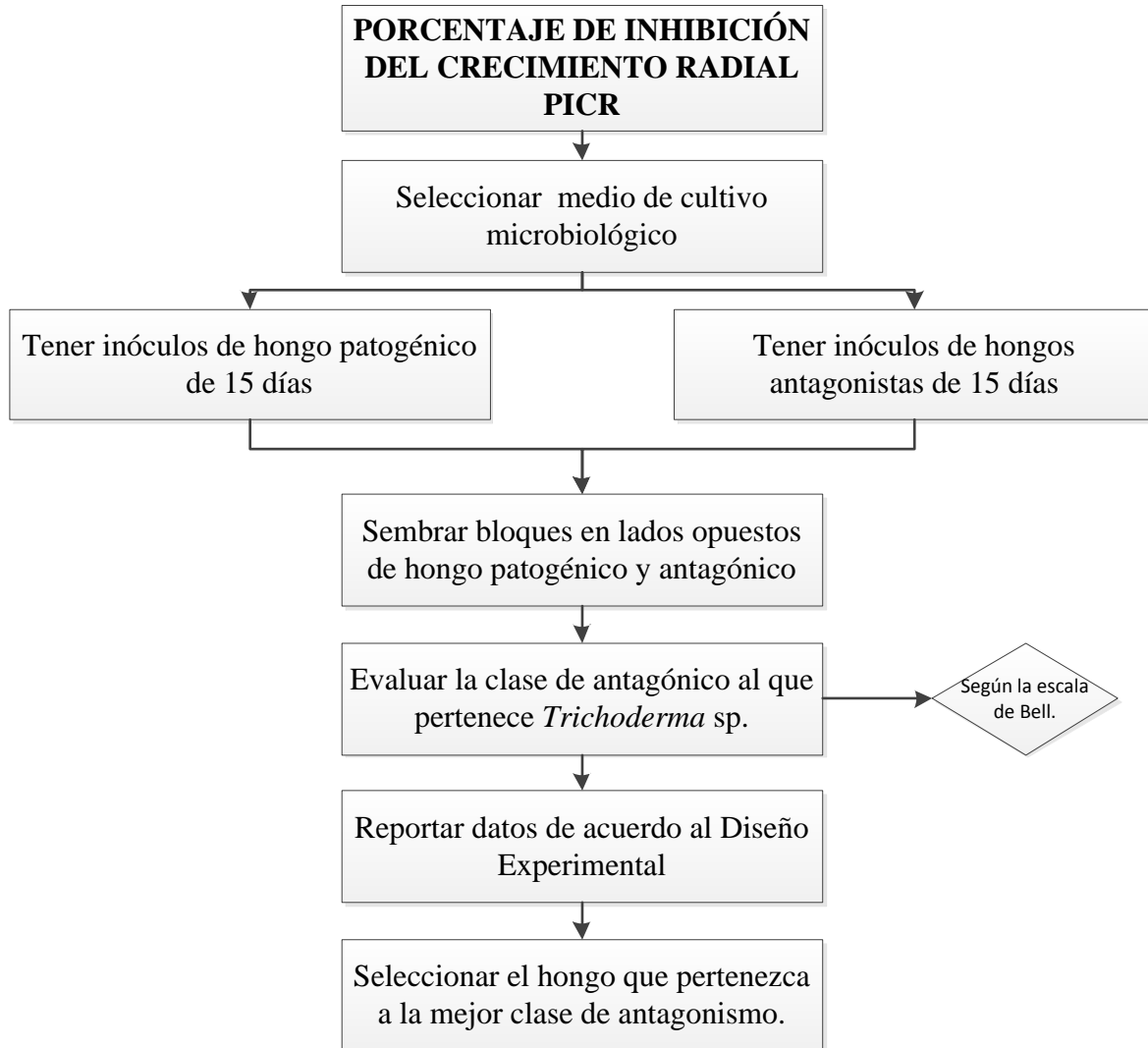
6.7.2. Evaluar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial PICR

Para evaluar el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento PICR se realizará los siguientes pasos:



6.7.3. Evaluación de la capacidad antagónica

Para evaluar la clase de Antagónico al que pertenece *Trichoderma* sp. se debe seguir los siguientes pasos.



6.8 Administración

Para realizar la ejecución de la propuesta, estará dirigida por los responsables del proyecto Egda. Ana María Martínez e Ing. Juan Ramos para lo cual se debe tener en cuenta varios aspectos como:

❖ Indicadores a Mejorar

Se puede mejorar el manejo de las técnicas en el laboratorio, con el fin de que las condiciones controladas del laboratorio no tengan diferencia con el medio natural.

❖ Situación Actual

En la actualidad existen otros métodos de suma importancia como pruebas bioquímicas de degradación de compuestos vegetales, degradación de compuestos que conforman la pared celular de hongos y bacterias que causan enfermedades a los cultivos; para identificar con mayor precisión la capacidad antagónica de microorganismos benéficos, siendo aún necesarios realizarlos en el laboratorio de microbiología o control biológico, y para ser más exactos se puede aplicar técnicas biotecnológicas tales como PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa), y a continuación la electroforesis.

❖ Resultados esperados

Los resultados que se espera al momento de desarrollar esta propuesta, es el que los hongos que presenten las mejores características de un buen antagonista, es que estos mantengan su alto comportamiento como biocontrolador tanto en condiciones “*in vitro*” como “*in situ*”, con el fin de seguir manteniendo como protocolo de selección de las mejores cepas las pruebas en laboratorio.

❖ Actividades

Al conocer las características biocontroladora de los hongos en condiciones de laboratorio se podrán lanzar las mejores cepas a pruebas de invernadero, y después a ensayos de

campo, con esto se podrá disminuir la aplicación de fungicidas químicos que degradan la microbiota del suelo, y la salud humana.

❖ Responsables

Los responsables para que la ejecución de esta propuesta sea viable son:

- Coordinada y evaluada por el Ing. Juan Ramos docente de la Universidad Técnica de Ambato Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos.
- Desarrollada por: Ana María Martínez, egresada de la Carrera de Ingeniería Bioquímica

6.8.1 Recursos Humanos

RECURSOS HUMANOS		Valor Unitario
Director	Ing. Juan Ramos MSc.	800, 00
Tesista	Ana Martínez	423,00

6.8.2 Recursos Materiales

RECURSOS MATERIALES				
Recursos Materiales e Insumos	Unidad	Cantidad	Valor	
			Unitario	Total
Glucosa	Gramo	40	0,16	6.4
Carbonato de Calcio	Gramo	5	0,2	1
Agar Papa Dextrosa	Gramo	1000	0,2	200
Agar–Agar	Gramo	200	0,15	30

Alcohol	Litro	9	1,4	12,6
Cajas de vidrio monopetri	Unidad	400	0.6	240
Micropipeta de 1000 ul	Unidad	1	345	345
Micropipeta de 20 – 100 ul	Unidad	1	345	345
Micropipeta de 0.5 ul – 20 ul	Unidad	1	345	345
Puntas amarillas 200 ul	Unidad	350	0,04	14
Puntas azules 1 ml	Unidad	350	0,04	14
Tubos de almacenamiento de 15ml	Unidad	220	0,5	110
Portaobjetos	Unidad	50	0,05	2.5
Cubreobjetos	Unidad	50	0,05	2.5
Vasos plásticos	Unidad	500	0.05	25
Semillas de Maracuyá	Gramo	30	1	30
SUBTOTAL RECURSOS MATERIALES				1723

6.8.9 Recursos Técnicos

RECURSOS TÉCNICOS			
RECURSO	CANTIDAD	COSTO UNITARIO	COSTO TOTAL
		\$	\$
Programa InfoStat	1	Shareware	shareware
SUBTOTAL RECURSOS TÉCNICOS			shareware

6.9 Predicción de la Evaluación

Preguntas Básicas	Explicación
¿Quiénes solicitan evaluar?	Pequeños y grandes productores de maracuyá de la zona Costera. Sector Agrícola y Científico.
¿Por qué evaluar?	Eliminar la utilización de fungicidas químicos
¿Para qué evaluar?	Proteger la microbiota de suelos agrícolas. Mantener la sustentabilidad.
¿Qué evaluar?	Técnica a emplearse. Datos obtenidos
¿Quién evalúa?	Director del proyecto. Tutor. Calificadores.
¿Cuándo evaluar?	Una evaluación efectiva sería cuando las mejores cepas antagónicas de <i>Trichoderma</i> sp. se las ponga a prueba en condiciones de laboratorio.
¿Cómo evaluar?	Mediante parámetros microbiológicos, agronómicos, fitopatológicos.
¿Con qué evaluar?	Método establecido

MATERIALES DE REFERENCIA

1. BIBLIOGRAFÍA

Libros

AGRIOS, G. 2000. Manual de Fitopatología. 2da Edición. Editorial Limusa. México DF, México. Pp. 838

BURGESS, L. SUMMERELL, B. BULLOCK, S. GOTT, K. BACHKHOUSE, D. “Laboratory Manual for *Fusarium* Research”, 3rd. Edición. Pp. 133

GÓMEZ M; SCHWENTESIUS, R ; GÓMEZ A. 1995. “La producción y El Mercado Mundial del Maracuyá, Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA), Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y la Agricultura Mundial (L,- IESTAAM)”, Pp. 271

LLACER, G., LÓPEZ, M., TRAPERO, A. BELLO, A. 1996. “Patología Vegetal Tomo II”. Ed. Sociedad Española de Fitopatología y Phytoma, España, Pp. 1165.

ROOG, H. 2000. Manejo Integrado de plagas en cultivos de la Amazonia Ecuatoriana, Edición Imprenta Mossaico, Quito – EC; Pp. 73 – 74; 90

Vásquez, J; Y Chacón C. 1989. El Cultivo de Maracuyá, Federación Nacional de Cafeteros, CO, Pp. 21

WASILWA, L. WAFULA, V. NYONGESA, D., GITONGA, L., NAMBIRO E, MULI. 2004. Granadilla (*Passiflora edulis* Sims) enfermedades de importancia económica en Kenia: Las necesidades de investigación.

Tesis y Trabajos de Investigación

CABALLERO, A. 2011. “Uso de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza tropical 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA)”, Tesis para obtener el grado de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica (CATIE),Turrialba, Costa Rica, 2011. Pp. 104.

CASTILLO, L. 2004. “Evaluación *in vitro* de la capacidad Biocontroladora de tres cepas nativas de *Trichoderma* spp. A tres temperaturas de incubación, sobre *Sclerotium rolfsii*, agente causal de pudrición blanca en remolacha”. Tesis de Grado para obtener el título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca. Talca – Mexico.

COBOS, G. 2010.“Evaluación de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el control de sigatoka negra (*Paracercospora fijiensis* m.) en el cultivo de banano (*Musa paradisiaca*) en fase de laboratorio”. ESPE - Departamento de Ciencias de la Vida. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agropecuario. Santo Domingo – Ecuador.

CRUZ, L. 2007.”Estandarización del proceso de producción masiva del hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto”. Tesis para obtener el grado de Microbióloga Industrial. Bogotá, D.C. Pp. 148.

CUEVA, D. 2007. “Producción de inoculantes a base de *Trichoderma* spp. para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae* en injertos de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco)”. Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. ESPE – IASA. Sangolquí – Ecuador.

ESTUPIÑAN, H. OSSA, J. 2007. “Efecto del agente causal de la Marchitez Vasculare de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo”. Tesis para optar por el Título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Pontificada Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Bogotá –Colombia.

GUILCAPI, E. 2009. “ Efecto de *Trichoderma harzianum* Y *Trichoderma viride*, en la producción de plantas de café (*Coffea arabica*) variedad caturra a nivel de vivero”. Tesis para obtener el grado de Ingeniero agrónomo. ESPOCH, Riobamba – Chimborazo. Pp. 95

MANOTOA, David. 1997. Producción de plantas de Maracuya *Passiflora edulis* en semillero evaluando cuatro abonos orgánicos, Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo, UTA, Ambato – Ecuador.

OBREQUE, M. 2004. “Evaluación de aplicaciones preinfección del fungicida Benomilo y del Biocontrolador *Trichoderma harzianum* en el control de *Fusarium* sp. en Proteáceas “, Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca. Talca – Chile. Pp. 31.

PALOMARES, J. 2009; “Estudio de los mecanismos de interacción entre *Meloidogyne artiellia* y *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* en genotipos de garbanzo”, Tesis para obtener el grado de Doctor, Cordova - Es. Pp. 307.

YUMBAY, R. 2011. “Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. en el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosas”. Trabajo de Investigación para obtener el grado de Ingeniera Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejercito. Sangolqui – Ecuador. Pp: 100.

Revistas científicas – Talleres – Cursos.

ARZATE, J., MICHEL, A. C., DOMÍNGUEZ, V.M., SANTOS, O. A. 2006. “Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la sigatoka negra del plátano (*Musa sp.*) in vitro e invernadero”. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 24. Número. 002. Pp. 8. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Obregón – Mexico.

CUBILLOS, Juan. PAEZ, Alberto. VALERO, Nelson. MEJÍA, Lauris. GÁMEZ, Rocío. 2008. Efecto Biocontrolador de *Trichoderma harzianum* contra *Fusarium oxysporum* causante de la secadera del Maracuyá en la Zona Bananera del Magdalena – Colombia. Revista de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines “ASCOLFI”, Volumen 32 Número 1.

ESCOBAR, W., CABRERA, C. 2006. “Manual técnico del cultivo de maracuyá (*Passiflora edulis.L*) en el departamento del Huila”, Primera Edición, Litocentro Ltda. Huila - Colombia Pp. 34.

FERNÁNDEZ, R. SUÁREZ, C. 2009. “Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis Sims var. Flavicarpa*) del municipio zona Bananera Colombiana”, Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín 62(1): 4743-4748.

GALINDO, F. VILLAVICENCIO, M. 2000. *Seminario de Agro Negocios Maracuyá, Universidad del Pacífico, Facultad de Administración y Contabilidad. Pp: 21*

GONZALES, M. TORRES, I. GUZMAN, H. 2002. Búsqueda de resistencia natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsii*. *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. Tampico: Proceeding of the 16th Internacional Pepper.

GUILLERMO, J. MARINELLI, A. ODDINO, C. 2007. “Análisis del progreso de Epidemias y pérdidas que causan”. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE) INTA, Segundo Curso Internacional sobre Caracterización, Diagnóstico, Epidemiología, y Manejo de Enfermedades Virales y Mollicutes en plantas. Córdoba – Argentina. Pp. 86

HOYOS, L.CARVAJAL. DUQUE, G. ORDUZ, S. 2008. “Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp.”, Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas - Vol. 2 - No. 1 - pp. 76-86, 2008.

INFANTE, D. MARTÍNEZ, B. GONZÁLEZ, N. REYES, Y. 2009 “Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos”, Rev. Protección Veg. Vol. 24 No. 1 (2009): 14-21.

KIELY, T., COX, J. 1961. Fusarium wilt disease of passion vines. *The Agricultural Gazette of New South Wales* **72** , 275-276.

McKNIGHT, T. 1951. A wilt disease of the passion vine (*Passiflora edulis*) caused by a species of *Fusarium* . *Queensland Journal of Agricultural Society* 8. 1 -4.

MARTÍNEZ, B. REYES, Y. INFANTE, D. GONZÁLEZ, E. BAÑOS H. CRUZ, A. 2009. “Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz”, Revista de Protección Vegetal. Vol. 23 No: 118-125.

MUÑOZ, C. 2002. Modelo de producción sostenible de plátano para la Zona Norte De Costa Rica. I Congreso Nacional de Agricultura Conservacionista San José, 28-29 Noviembre 2002.

NELSON, P. TOUSSOUN, T. COOK, R. 1981. “*Fusarium*: Diseases, Biology and Taxonomy,

PÉREZ, Vicente, L. 2004. “Fusarium wilt (panama disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent”. Publication especial XVI Reunion.

REGLAMENTO NACIONAL DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA. 2006. Registro Oficial N° 384

TORRES, C., M. SÁNCHEZ Y L. GOMEZ. 2000. Enfermedades fungosas y bacterianas en el cultivo del Maracuyá *Passiflora edulis Sims var. Flavicarpa* Degener en dos agroecosistemas. Revista de la Asociación Colombiana de la Fitopatología y Ciencias Afines ASCOLFI 24(2): 47-53.

Páginas electrónicas

BENÍTEZ, T., RINCÓN, A.M., LIMÓN, M.C., CODÓN, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. International Microbiology.NCBI, disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15666245>, consultado el 24 de agosto del 2011.

Diario HOY; Maracuyá Domina el Mundo, publicado el 15 de Septiembre del 1998. Disponible en: <http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/maracuya-domina-el-mundo-98995-98995.html>, consultado el 12 de Abril del 2011.

EZZIYYANI M., PÉREZ C., SID A., REQUENA M., CANDELA M. 2004. “*Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum L.*). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia. Murcia, España. Consultado 27 Marzo. 2011. Disponible en: <http://www.um.es/analesdebiologia/numeros/26/PDF/05-TRICHODERMA.pdf>

FISCHER, I. REZENDE, J. 2008. “Enfermedades de la flor de la pasión (*Passiflora spp.*) Tecnologías de plagas 2008 Libros Ciencia Global. Disponible en la web: [http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0812/PT_2\(1\)1-19o.pdf](http://translate.google.com.ec/translate?hl=es&langpair=en%7Ces&u=http://www.globalsciencebooks.info/JournalsSup/images/0812/PT_2(1)1-19o.pdf), consultado el 21 de noviembre del 2011.

MAGAP(Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca). 2011. Disponible en http://www.magap.gob.ec/sigagro/spr/spr_maracuya.htm#, Consultado el 12 de Abril del 2011.

MALDONADO, E.. CRUZ-NEIRA, J. RODRIGUEZ, E. 2003. Influencia de la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* sobre el rendimiento del algodónero Pima. *Fitopatología*, ISSN 0430-6155, Vol. 38, N° 4, 2003 , págs. 159-169. Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=896613>, Consultado el 14 de Diciembre del 2011.

MICHEL-ACEVES, OTERO-SÁNCHEZ, SOLANO-PASCACIO. 2008. Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., Agentes Causales de la “Escoba de Bruja” del Mango (*Mangifera indica* L.) *Revista Mexicana de Fitopatología* ISSN (Versión impresa): 0185-3309. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C.MX, Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=61211414003>, consultado el 31 de agosto del 2010

ROCHA, S, H., APARECIDA X, A., DARIVA, J, M., FERREIRA, R, R., SOARES, I., GONÇALVES S, J. 2011. “Infectividade de *Fusarium solani* e *f. oxysporum* f. sp. *passiflorae* em três híbridos de maracujazeiro-azedo”, disponible en: <http://www.fepeg.unimontes.br/index.php/eventos/forum2011/schedConf/presentations>, consultado el 20 de Diciembre del 2011.

2. ANEXOS

ANEXO A

DATOS Y RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla A1. Sectores de aislamientos de *Fusarium* sp.

N°	PARTE VEGETAL DE AISLAMIENTO	N° RECOLECCIÓN	SECTOR	CÓDIGOS
1	Raíz	1	Los Limones	FL – 1
2	Raíz	1	Los Limones	FL – 2
3	Raíz	3	Viche	FV – 1
4	Tallo	7	INIAP	FI – 1
5	Tallo	7	INIAP	FI – 2
6	Tallo	7	INIAP	FI – 3
7	Corteza de Raíz	5	STA. MARTHA	FSM – 1
8	Raíz	5	STA. MARTHA	FSM – 2

Elaborado por: Egda. Ana Martínez

Tabla A2. Características macroscópicas de colonias de *Fusarium* sp.

CEPA	COLOR		SUPERFICIE	BORDE	CONSISTENCIA	ASPECTO	DESARROLLO
	COLONIA	MEDIO					
FL – 1	Borde: Crema Centro: Café y Amarillo	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial
FL – 2	Borde: Blanco Centro: Plomo	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial
FV – 1	Borde: Blanco Centro: Lila	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial
FI – 1	Borde: Lila Centro: Blanco y Fucsia	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial
FI – 2	Completamente: Salmón	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial
FI – 3	Borde: Rosa pálido Centro: Blanco	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial
FSM – 1	Borde: Blanco Centro: Amarillo y Blanco	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial
FSM – 2	Borde: Blanco Centro: Amarillo y Blanco	–	Lisa	Regular	Semicompacta	Algodonosa	Radial

Elaborado por: Egda. Ana Martínez

Tabla A3.- Caracterización macroscópica de *Fusarium* sp.

CEPA	PIGMENTO	DIÁMETRO DE COLONIA A LAS 72 h		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	
		25 C	30 C	mm/h	
FL – 1	-	16.80	26.90	0.23	0.37
FL – 2	-	26.28	26.40	0.37	0.37
FV – 1	-	17.75	27.10	0.25	0.38
FI – 1	-	25.05	30.90	0.35	0.43
FI – 2	-	28.79	30.12	0.40	0.42
FI – 3	-	26.0	0.29	0.36	0.40
FSM – 1	-	15.1	32.61	0.21	0.45
FSM – 2	-	14.50	33.74	0.20	0.47

Elaborado por: Egda. Ana Martínez

Tabla A4.- Caracterización microscópica de *Fusarium* sp. en CLA. Según Burgess, et al.

CEPA	MICROCONIDIAS			FIALIDES ²	CLAMIDIOSPORAS ²	FORMA DE MACROCONIDIAS ¹	ESPECIES
	*/- ²	CABEZAS EN CADENAS ²	FORMA ¹				
FL - 1	*	*	Septos: 0 – 1 Forma: a, b, c,	* Polifiálides Largas	Abundantes	Septos: 3 – 9 (7)	ND
FL - 2	*	*	Septos: 0 – 1 Forma: a, b	* Monofiálides Largas	Abundantes	Septos: 3 – 5 (3) Apical: 1 ; Basal r	<i>Fusarium solani</i>
FV - 1	*	*	Septos: 0 -1 Forma: a, b, c	* Monofiálides Cortas	Abundantes	Septos: 3 – 5 Apical: m; Basal: q	<i>Fusarium oxysporum</i>
FI - 1	*	*	Septos: 0 - 1 Forma: a, b, c	* Monofiálides Cortas	Escasas	Septos: 3 – 5 Apical: m; Basal: o	<i>Fusarium oxysporum</i>
FI - 2	*	*	Septos: 0 – 1 Formas: a, b	* Monofiálides Cortas	Abundantes	Septos: 3 – 5 Apical: 1, Basal: q	<i>Fusarium oxysporum</i>
FI - 3	*	*	Septos:0 Formas: b, c	* Monofiálides Cortas	Abundantes	Ausencia de Macroconidias	ND
FSM -1	*	*	Septos: 0 – 1 Forma: a, b, c	*Polifiálides Largas	Escasas	Septos: 2 – 4 Apical: k ; Basal r	ND
FSM -2	*	*	Septos: 0 – 1 Forma: a, b, c	*Polifiálides Largas	Escasas	Septos: 2 – 5 3Septos: A: k; B: r 4 Septos :A: j; B: r	ND

Elaborado por: Egda. Ana Martínez

¹: Ver Anexo Cuadro B7. Formas de microconidias y Macroconidias en CLA.

²: Ver Anexo Cuadro D. Identificación de especies de *Fusarium*.

Tabla A5.- Sectores de aislamiento de Trichoderma sp.

N°	Recolección de <i>Trichoderma</i>	N° Recolección	Sector	Código
1	Corteza Los Limones	1	LOS LIMONES	TL – 1
2	Suelo 8 ^a	2	LA INDEPENDENCIA	TI -1
3	Suelo 8b	4	LA INDEPENDENCIA	TI – 2
4	Raíz P3 S13	6	SAN ANTONIO	TSA – 1
5	Suelo 17	5	SANTA MARTHA	TSM – 1
6	Suelo 18	6	SANTA MARTHA	TSM – 2
7	Suelo de Bosque	6	BOSQUE – INIAP	TBI – 1

Elaborado por: Egda. Ana Martínez

Tabla A6. Características macroscópicas de colonias de *Trichoderma* sp.

CEPA	COLOR		SUPERFICIE	BORDE	CONSISTENCIA	ASPECTO	DESARROLLO
	ANVERSO	REVERSO					
TL - 1	Verde	-	Lisa	Regular	Compacta	Algodonoso	Circular
TI - 1	Verde	-	Lisa	Regular	Compacta	Algodonoso	Circular
TI - 2	Verde	-	Semirugosa	Regular	Compacta	Algodonoso	Anillos concéntricos
TSA - 1	Verde	-	Lisa	Regular	Compacta	Algodonoso	Circular
TSM - 1	Verde	-	Semirugosa	Regular	Compacta	Algodonoso	Circular
TSM - 2	Verde	-	Semirugosa	Regular	Compacta	Algodonoso	Circular
TBI - 1	Verde	-	Lisa	Regular	Compacta	Algodonoso	Anillos concéntricos

Elaborado por: Egda. Ana Martínez

Tabla A7. Caracterización macroscópica en PDA.

CEPA	PIGMENTO	DIÁMETRO DE COLONIA		VELOCIDAD DE CRECIMIENTO	
		25 C	30 C	MM/DÍA	
TL – 1	–	55.9	61.98	1.23	1.26
TI – 1	–	44.85	52.23	1.28	1.32
TI – 2	–	36.88	39.76	0.80	1.00
TSA – 1	–	34.77	36.98	1.01	1.07
TSM – 1	–	50.17	55.87	1.30	1.38
TSM – 2	–	53.50	55.65	1.13	1.16
TBI – 1	–	57.06	62.87	1.03	1.10

Elaborado por: Egda. Ana Martínez

Cuadro A1. Cuadro de análisis de Varianza, con prueba Tukey al 5%, en la competencia por espacio y nutrientes de *Fusarium sp.*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VEL. CRECIMIENTO mm/h	40	0,74	0,67	7,67

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	0,08	8	0,01	10,88	<0,0001	
TRATMIENTOS	0,08	7	0,01	12,32	<0,0001	
REPLICAS	7,2E-04	1	7,2E-04	0,80	0,3775	-3,0E-03
Error	0,03	31	9,0E-04			
Total	0,11	39				

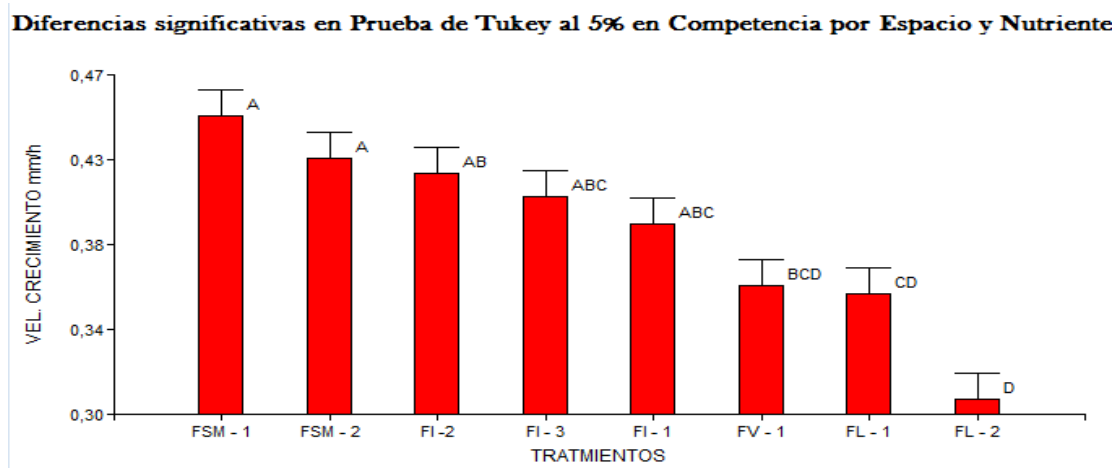
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,06153

Error: 0,0009 gl: 31

TRATMIENTOS	Medias	n	E.E.	
FSM - 1	0,45	5	0,01	A
FSM - 2	0,43	5	0,01	A
FI - 2	0,42	5	0,01	A B
FI - 3	0,41	5	0,01	A B C
FI - 1	0,39	5	0,01	A B C
FV - 1	0,36	5	0,01	B C D
FL - 1	0,36	5	0,01	C D
FL - 2	0,30	5	0,01	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Gráfico A1. Diferencia de tratamientos en prueba de Tukey al 5%, en competencia por espacio y nutrientes de *Fusarium sp.*



Cuadro A2.- Cuadro de análisis de varianza y prueba de Tukey al 5%, Potencial de inóculo de *Fusarium* sp.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
POT. INOCULO esp/ml	24	0,91	0,86	16,49

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	8127836643613,19	8	1015979580451,65	18,28	<0,0001	
TRATAMIENTOS	7668265635538,89	7	1095466519362,70	19,71	<0,0001	
REPETICIONES	459571008074,31	1	459571008074,31	8,27	0,0116	169479,17
Error	833749364833,10	15	55583290988,87			
Total	8961586008446,29	23				

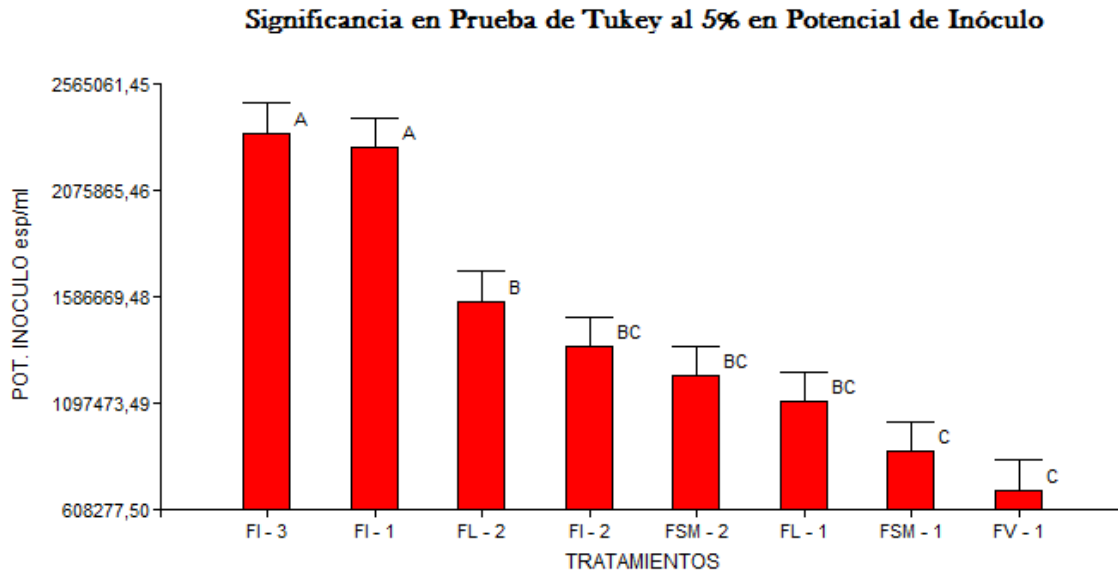
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=672401,60900

Error: 55583290988,8734 gl: 15

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
FI - 3	2340000,00	3	136116,73	A
FI - 1	2273333,33	3	136116,73	A
FL - 2	1566666,67	3	136116,73	B
FI - 2	1358333,33	3	136116,73	B C
FSM - 2	1223333,33	3	136116,73	B C
FL - 1	1105555,55	3	136116,73	B C
FSM - 1	875000,00	3	136116,73	C
FV - 1	697222,22	3	136116,73	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Gráfico A2. Diferencia de tratamientos en prueba de Tukey al 5%, en Potencial de Inoculo de *Fusarium* sp.



Cuadro A3.- Cuadro de Análisis de Varianza y prueba Tukey al 5%, en la capacidad de potencial de inóculo de *Trichoderma sp.*

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
POT. INOCULO esp/ml	35	0,89	0,86	13,89

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	6385447142857,14	7	912206734693,88	31,89	<0,0001	
TRATAMIENTO	6341697142857,14	6	1056949523809,52	36,96	<0,0001	
REPETICIONES	43750000000,00	1	43750000000,00	1,53	0,2268	25000,00
Error	772220000000,00	27	28600740740,74			
Total	7157667142857,14	34				

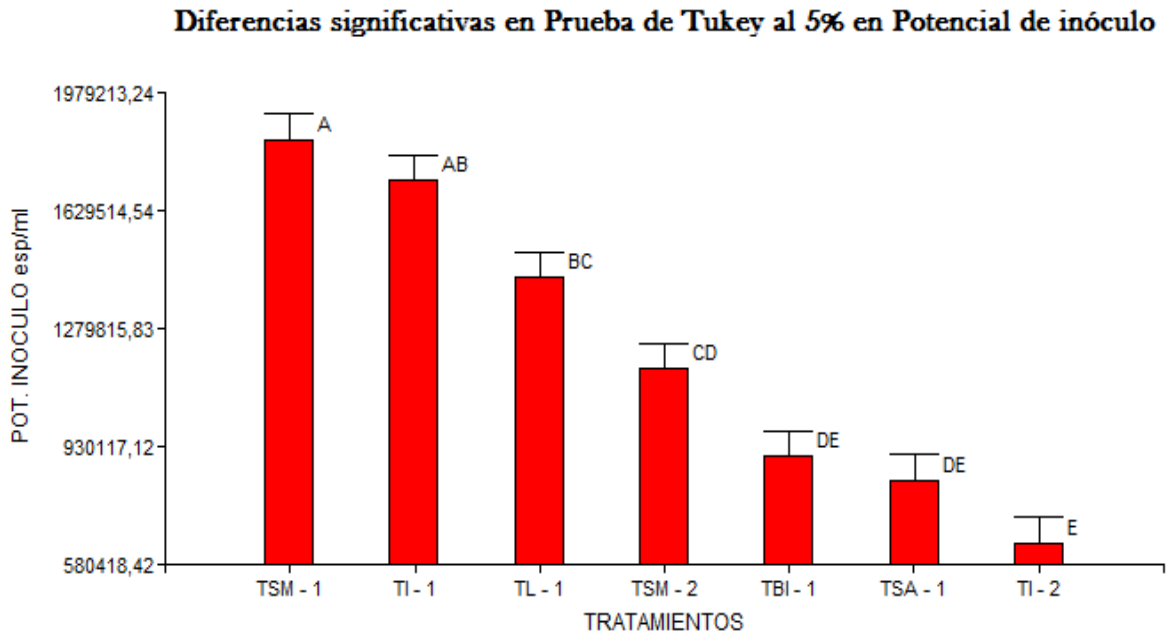
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=340212,54007

Error: 28600740740,7408 gl: 27

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.
TSM - 1	1840000,00	5	75631,66 A
TI - 1	1720000,00	5	75631,66 A B
TL - 1	1430000,00	5	75631,66 B C
TSM - 2	1160000,00	5	75631,66 C D
TBI - 1	900000,00	5	75631,66 D E
TSA - 1	830000,00	5	75631,66 D E
TI - 2	644000,00	5	75631,66 E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Gráfico A3. Diferencia de tratamientos en prueba de Tukey al 5%, en Potencial de inóculo de *Trichoderma sp.*



Cuadro A4.- Cuadro de Análisis de Varianza y prueba Tukey al 5%, Competencia por espacio y nutrientes de *Trichoderma sp.* en monocultivo.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VEL. CRECIMIENTO mm/h	33	0,87	0,83	6,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	0,83	7	0,12	23,05	<0,0001	
TRATAMIENTO	0,82	6	0,14	26,46	<0,0001	
REPETICIONES	0,02	1	0,02	4,79	0,0381	-0,02
Error	0,13	25	0,01			
Total	0,96	32				

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,15062

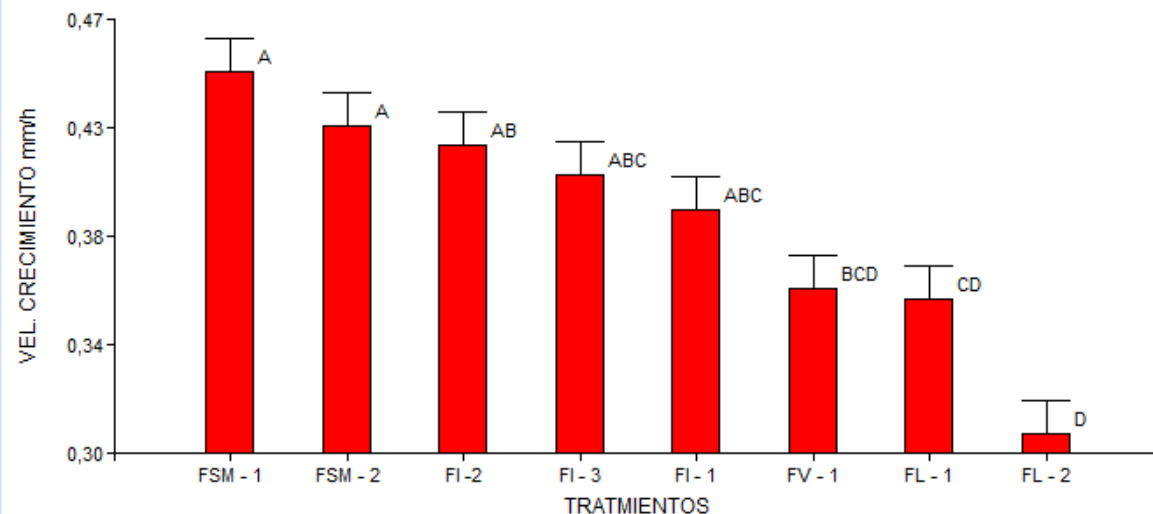
Error: 0,0051 gl: 25

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
TSM - 1	1,30	5	0,03	A
TI - 1	1,28	5	0,03	A
TL - 1	1,26	5	0,03	A B
TSM - 2	1,13	5	0,03	B C
TBI - 1	1,02	5	0,03	C
TSA - 1	1,01	5	0,03	C
TI - 2	0,79	3	0,04	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Cuadro A4. Diferencia de tratamientos en prueba de Tukey al 5%, en Competencia por Espacio y Nutrientes de *Trichoderma sp.*

Diferencias significativas en Prueba de Tukey al 5% en Competencia por Espacio y Nutrient



Cuadro A5.- Cuadro de Análisis de Varianza y prueba Tukey al 5%, viabilidad de cepas de *Trichoderma* sp.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VIABILIDAD %	35	0,90	0,87	4,76

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	3280,55	7	468,65	34,91	<0,0001	
TRATAMIENTO	3264,96	6	544,16	40,53	<0,0001	
REPETICIONES	15,59	1	15,59	1,16	0,2907	0,47
Error	362,50	27	13,43			
Total	3643,06	34				

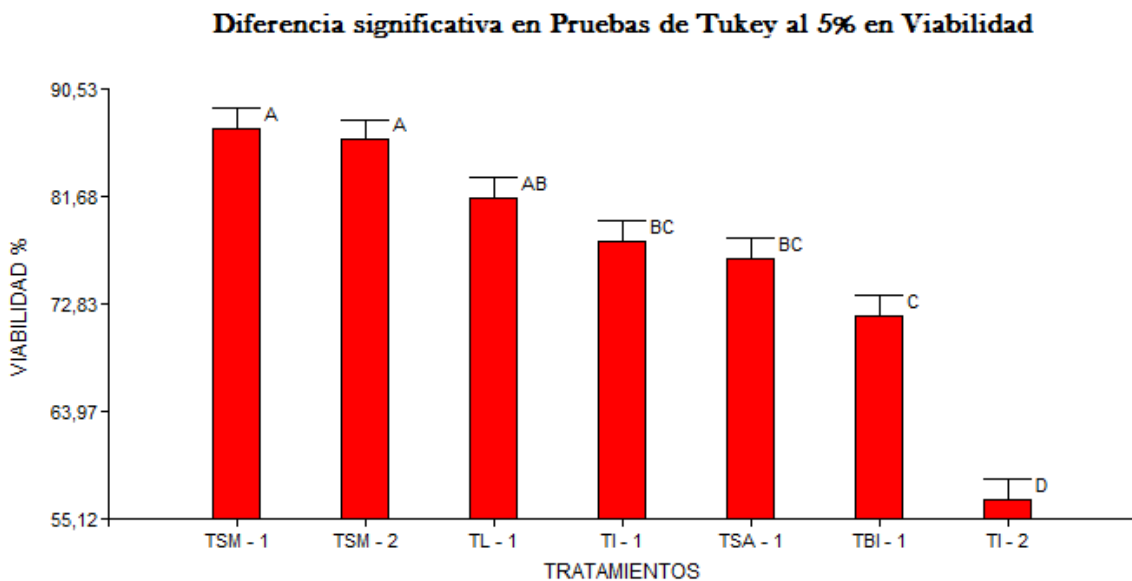
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=7,37116

Error: 13,4261 gl: 27

TRATAMIENTO	Medias	n	E.E.	
TSM - 1	87,28	5	1,64	A
TSM - 2	86,38	5	1,64	A
TL - 1	81,58	5	1,64	A B
TI - 1	77,99	5	1,64	B C
TSA - 1	76,58	5	1,64	B C
TBI - 1	71,88	5	1,64	C
TI - 2	56,73	5	1,64	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Gráfico A5. Diferencia de tratamientos en prueba de Tukey al 5%, en Viabilidad de *Trichoderma* sp.



Cuadro A6.- Cuadro de análisis de varianza y prueba de Tukey al 5%, Severidad externa.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SEVERIDAD EXTERNA	108	0,57	0,48	109,93

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	50,92	18	2,83	6,46	<0,0001	
VARIEDADES	1,12	1	1,12	2,56	0,1132	
HONGOS	46,96	8	5,87	13,41	<0,0001	
BLOQUES	1,21	1	1,21	2,76	0,1003	0,06
VARIEDADES*HONGOS	1,63	8	0,20	0,47	0,8774	
Error	38,96	89	0,44			
Total	89,88	107				

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,85879

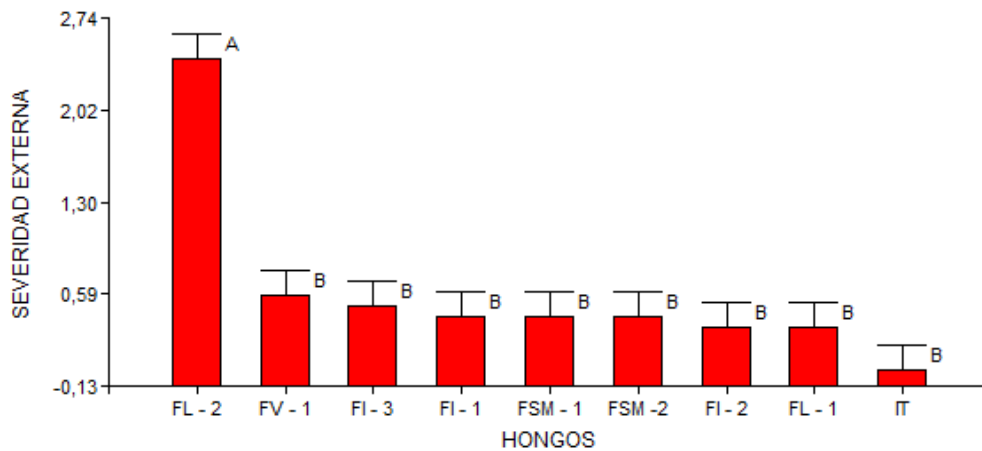
Error: 0,4377 gl: 89

HONGOS	Medias	n	E.E.	
FL - 2	2,42	12	0,19	A
FV - 1	0,58	12	0,19	B
FI - 3	0,50	12	0,19	B
FI - 1	0,42	12	0,19	B
FSM - 1	0,42	12	0,19	B
FSM - 2	0,42	12	0,19	B
FI - 2	0,33	12	0,19	B
FL - 1	0,33	12	0,19	B
IT	0,00	12	0,19	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Gráfico A6. Diferencia de Factor B en prueba de Tukey al 5%, Severidad Externa

Diferencia significativa de Factor B, Prueba de Tukey 5%



Cuadro A7a.- Cuadro de análisis de varianza y prueba de Tukey al 5%, Severidad Interna.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SEVERIDAD INTERNA	108	0,47	0,36	113,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	39,90	18	2,22	4,36	<0,0001	
VARIETADES	1,81	1	1,81	3,57	0,0622	
HONGOS	26,69	8	3,34	6,56	<0,0001	
BLOQUES	0,38	1	0,38	0,75	0,3872	0,03
VARIETADES*HONGOS	11,02	8	1,38	2,71	0,0103	
Error	45,28	89	0,51			
Total	85,19	107				

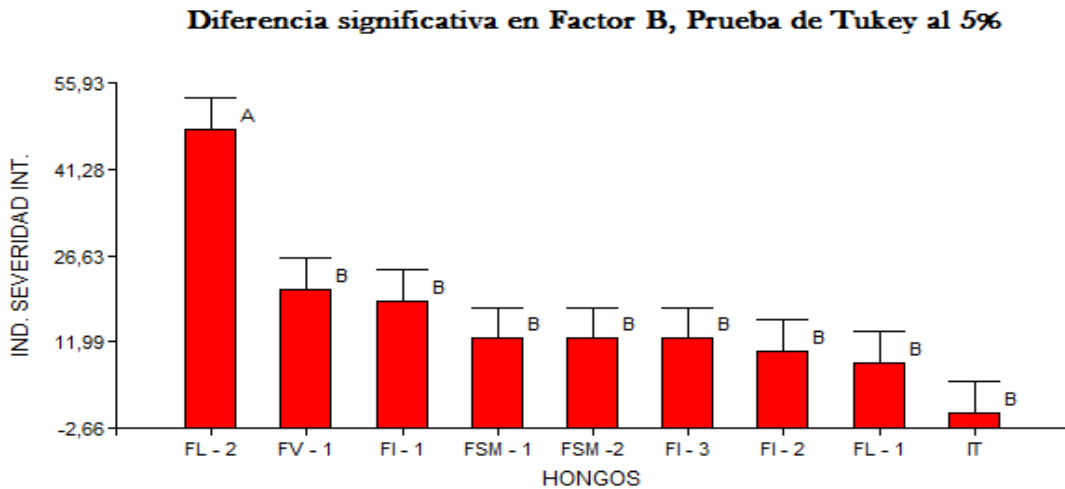
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,92586

Error: 0,5088 gl: 89

HONGOS	Medias	n	E.E.	
FL - 2	1,92	12	0,21	A
FV - 1	0,75	12	0,21	B
FI - 1	0,67	12	0,21	B
FSM - 2	0,50	12	0,21	B
FSM - 1	0,50	12	0,21	B
FI - 3	0,50	12	0,21	B
FI - 2	0,50	12	0,21	B
FL - 1	0,33	12	0,21	B
IT	0,00	12	0,21	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Gráfico A7a. Diferencia significativa de Factor B con prueba de Tukey al 5%, Severidad Interna



Cuadro A7b. Cuadro de análisis de varianza y prueba de Tukey al 5%, Severidad externa.

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,47987

Error: 0,5088 gl: 89

VARIETADES	HONGOS	Medias	n	E.E.	
INIAP 2009	FL - 2	2,83	6	0,29	A
INIAP 2009	FV - 1	1,00	6	0,29	B
LOCAL	FI - 1	1,00	6	0,29	B
LOCAL	FL - 2	1,00	6	0,29	B
INIAP 2009	FSM - 2	0,67	6	0,29	B
LOCAL	FI - 2	0,50	6	0,29	B
LOCAL	FI - 3	0,50	6	0,29	B
LOCAL	FSM - 1	0,50	6	0,29	B
LOCAL	FV - 1	0,50	6	0,29	B
INIAP 2009	FL - 1	0,50	6	0,29	B
INIAP 2009	FSM - 1	0,50	6	0,29	B
INIAP 2009	FI - 3	0,50	6	0,29	B
INIAP 2009	FI - 2	0,50	6	0,29	B
LOCAL	FSM - 2	0,33	6	0,29	B
INIAP 2009	FI - 1	0,33	6	0,29	B
LOCAL	FL - 1	0,17	6	0,29	B
LOCAL	IT	0,00	6	0,29	B
INIAP 2009	IT	0,00	6	0,29	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$)

Gráfico A7b.- Diferencia significativa de interacción de factores con Prueba de Tukey al 5%.

Diferencia significativa de Interacción de Factores en Prueba de Tukey al 5%

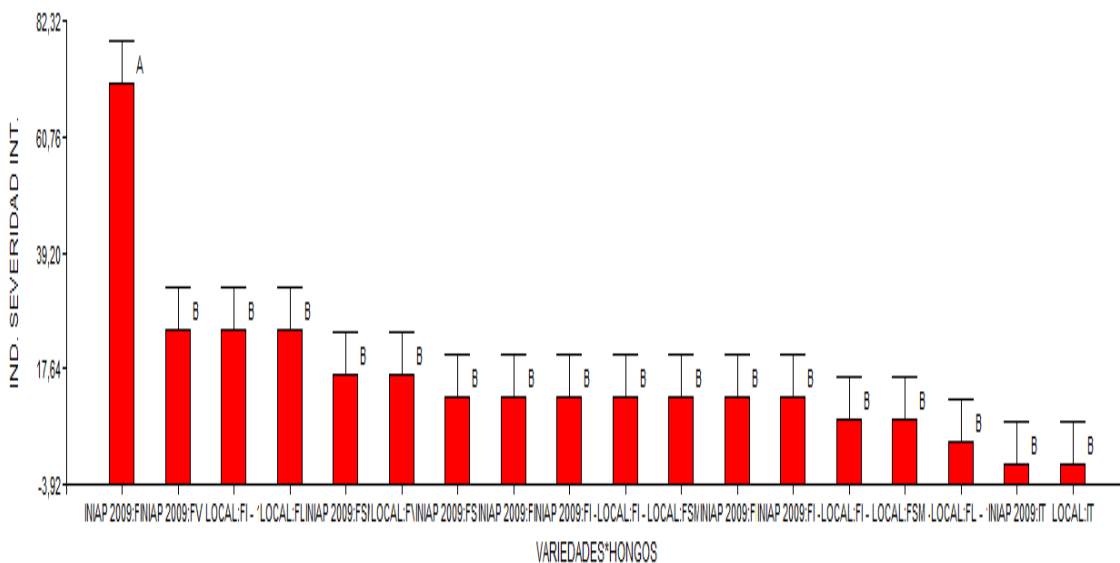


Tabla A8a.- Incidencia de la enfermedad e Índice de la enfermedad

Tratamiento	G. Severidad	Incidencia por gr.	Incidencia	IS
Ta Testigo INIAP	0	0	0	0
	1	0		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tb Testigo Local	0	0	0	0
	1	0		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tc INIAP - FL - 1	0	3	50	0.5
	1	3		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Td Local - FL - 1	0	5	16.66	0.17
	1	1		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Te INIAP - FL - 2	0	0	100	2.67
	1	2		
	2	1		
	3	0		
	4	3		
Tf Local - FL - 2	0	0	100	2.16
	1	3		
	2	1		
	3	0		
	4	2		
Tg INIAP - FV -1	0	1	83	0.83
	1	5		
	2	0		
	3	0		
	4	0		

Tabla A8b.- Incidencia de la enfermedad e Índice de la enfermedad

Tratamiento	G. Severidad	Incidencia por gr.	Incidencia	IS
Th Local - FV -1	0	4	33	0.33
	1	2		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Ti INIAP - FI - 1	0	4	33	0.33
	1	2		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tj Local - FI -1	0	3	50	0.5
	1	3		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tk INIAP - FI - 2	0	4	33	0.33
	1	2		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tl Local - FI- 2	0	4	33	0.33
	1	2		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tm INIAP - FI - 3	0	3	50	0.5
	1	3		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tn Local - FI - 3	0	3	50	0.5
	1	3		
	2	0		
	3	0		
	4	0		

Tabla A8c.- Incidencia de la enfermedad e Índice de la enfermedad

Tratamiento	G. Severidad	Incidencia por gr.	Incidencia	IS
To INIAP - FSM - 1	0	3	50	0.5
	1	3		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tp Loal - FSM - 1	0	4	33	0.33
	1	2		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tq INIAP - FSM - 2	0	2	67	0.67
	1	4		
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Tr Local - FSM - 2	0	4	33	0.33
	1	2		
	2	0		
	3	0		
	4	0		

Cuadro A8. Análisis de Varianza de la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. por competencia de espacio y nutrientes, en cultivos duales, in vitro.

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	6	2,7E-03	2,02	0,0964
TRATAMIENTOS	0,02	6	2,7E-03	2,02	0,0964
Error	0,04	28	1,3E-03		
Total	0,05	34			

Cuadro A9. Análisis de Varianza de la por competencia de espacio y nutrientes de *Fusarium* sp. en cultivos duales, in vitro.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
VEL. CRECIMIENTO FUS	35	0,77	0,72	11,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	0,02	7	2,4E-03	13,21	<0,0001	
TRATAMIENTOS	0,02	6	2,8E-03	15,31	<0,0001	
REPLICAS	1,2E-04	1	1,2E-04	0,63	0,4327	1,3E-03
Error	4,9E-03	27	1,8E-04			
Total	0,02	34				

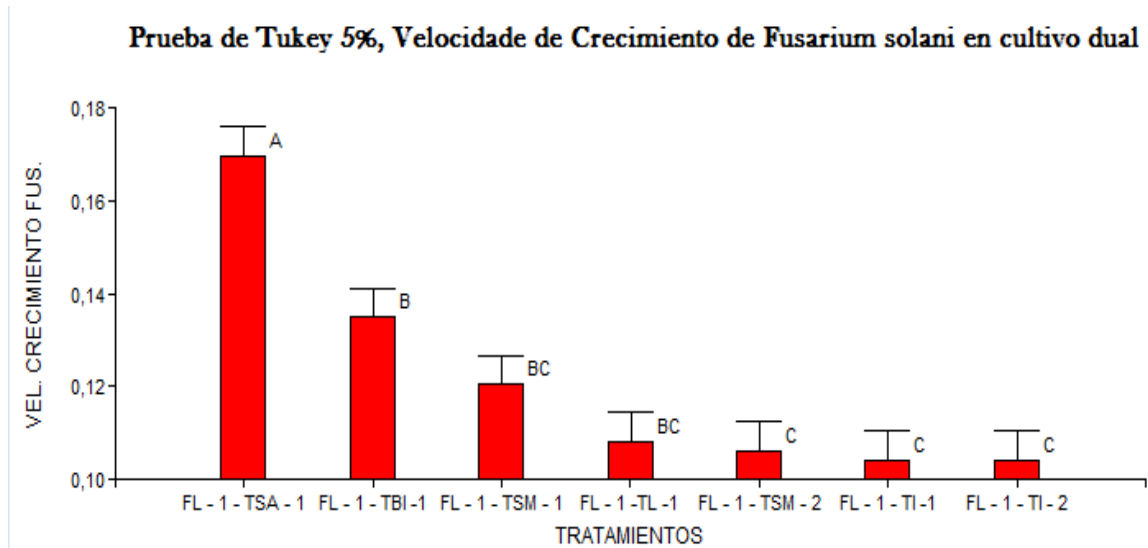
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,02717

Error: 0,0002 gl: 27

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.
FL - 1 - TSA - 1	0,17	5	0,01 A
FL - 1 - TBI - 1	0,13	5	0,01 B
FL - 1 - TSM - 1	0,12	5	0,01 B C
FL - 1 - TL - 1	0,11	5	0,01 B C
FL - 1 - TSM - 2	0,11	5	0,01 C
FL - 1 - TI - 1	0,10	5	0,01 C
FL - 1 - TI - 2	0,10	5	0,01 C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0,05)

Gráfico 8. Diferencia significativa en Prueba de Tukey al 5%, en competencia por espacio y nutrientes de *Fusarium* sp. en cultivo dual.



Cuadro A10. Análisis de Varianza en Porcentaje de Inhibición del crecimiento radial, en cultivos duales, in vitro.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
PICR	35	0,66	0,57	6,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	879,31	7	125,62	7,35	0,0001	
TRATAMIENTOS	638,81	6	106,47	6,23	0,0003	
REPLICAS	240,50	1	240,50	14,08	0,0008	-1,85
Error	461,28	27	17,08			
Total	1340,59	34				

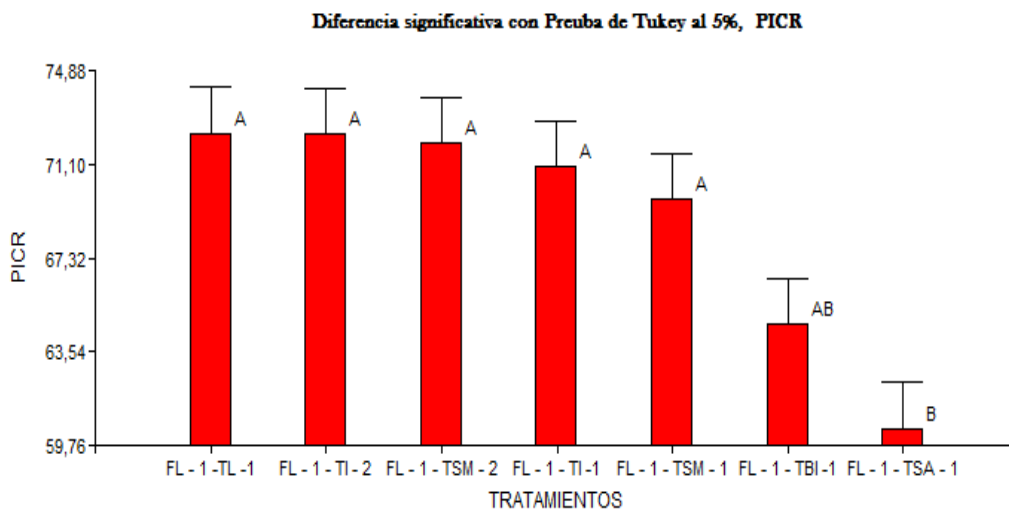
Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=8,31498

Error: 17,0844 gl: 27

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
FL - 1 - TL - 1	72,35	5	1,85	A
FL - 1 - TI - 2	72,31	5	1,85	A
FL - 1 - TSM - 2	71,96	5	1,85	A
FL - 1 - TI - 1	71,01	5	1,85	A
FL - 1 - TSM - 1	69,70	5	1,85	A
FL - 1 - TBI - 1	64,62	5	1,85	A B
FL - 1 - TSA - 1	60,45	5	1,85	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p <= 0,05)

Gráfico A9. Diferencia significativa en Prueba de Tukey al 5%, en competencia por espacio y nutrientes de *Fusarium sp.* en cultivo dual.



Cuadro A11. Análisis de Varianza de la Clase de antagonico en cultivos duales, in vitro.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
ANTAGONISMO	35	0,22	0,02	12,02

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	Coef
Modelo.	0,41	7	0,06	1,09	0,3994	
TRATAMIENTOS	0,29	6	0,05	0,87	0,5269	
REPLICAS	0,13	1	0,13	2,36	0,1362	0,04
Error	1,47	27	0,05			
Total	1,89	34				

ANEXO B

Técnicas de Laboratorio

Cuadro B1.- Medio de Cultivo PDA

Reactivos	Cantidad
PDA	39 gr
Agua destilada	1000 ml.

Cuadro B2.- Medio de Cultivo CLA

Reactivos	Cantidad
Pedazos de hoja de clavel secos	20 gr.
Agar – Agar	20 gr.
Agua destilada	1000 ml

Cuadro B3. Velocidad de Crecimiento de *Trichoderma* sp. vs. *Fusarium* sp. en cultivo dual.

$$Y = m\chi + b$$

Dónde:

- Y:** Área de crecimiento
m: Velocidad específica de crecimiento
x: Tiempo (h)
b: Ordenada de origen
-

Cuadro B4.- Postulados de Koch

1. El patógeno debe encontrarse asociado con la enfermedad en todas las plantas que se examinen
2. El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios de cultivos y se debe describir sus características (parásito no obligado), o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedante susceptible (parásito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca.
3. El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas.
4. El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto.

Conclusión: En caso de que los puntos mencionados se cumplan, se tendrá la certeza de que el patógeno aislado es la causa de la enfermedad.

Cuadro B5.- Porcentaje de Inhibición de Crecimiento Radial (PICR)

$$PICR = \frac{R_1 - R_2}{R_1} \times 100$$

Dónde:

R_1 = Radio de crecimiento de *Fusarium* sin inhibición a los 10 días.

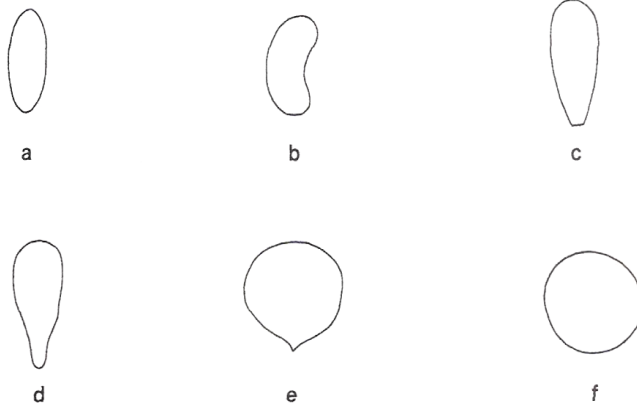
R_2 = Radio de crecimiento de *Fusarium* con inhibición de *Trichoderma*

Cuadro B6. -Clasificación del tipo de Antagonismos según Bell, *et al.* (1982)

Clasificación	Características
1	<i>Trichoderma</i> sobrecrece completamente al patógeno y cubre totalmente la superficie del medio
2	<i>Trichoderma</i> sobrecrece las dos terceras partes de la superficie del medio
3	<i>Trichoderma</i> y el patógeno colonizan cada uno aproximadamente la mitad de la superficie y ningún organismo parece dominar al otro
4	El patógeno coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio y parece resistir a la invasión por <i>Trichoderma</i>
5	El patógeno sobrecrece completamente a <i>Trichoderma</i> y ocupa la superficie total del medio

Cuadro B7. Formas de Microconidias y Macroconidias

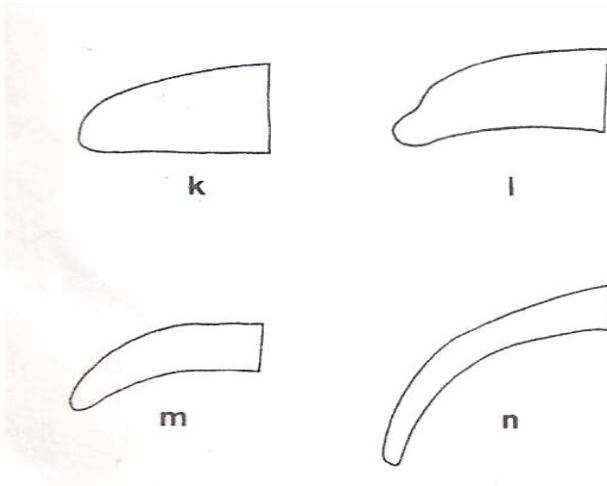
Formas de microconidias de *Fusarium*



Nombre de Formas de Microconidias

- a. Oval
- b. Reniforme
- c. Ovoide con la base truncada
- d. Piriforme
- e. Napiforme
- f. Globosa

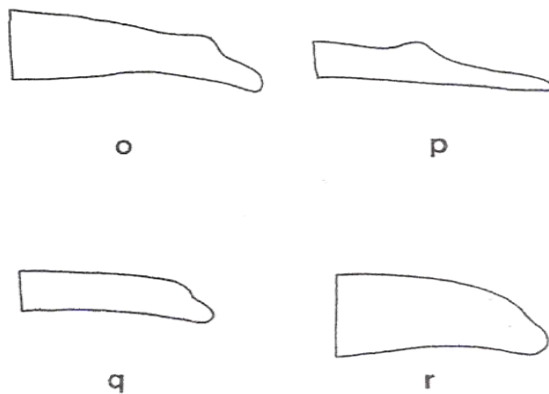
Formas de Célula Apical en Macroconidias de *Fusarium*



Nombre de Formas de Célula Apical

- k. Célula apical despuntada.
- l. Célula apical en forma de
- m. Célula apical en forma de gancho.
- n. Célula apical larga y delgada.

Forma de Célula Basal en Macroconidias de *Fusarium*



Nombre de Formas de Célula Apical

- o. Célula basal en forma de pie.
- p. Célula basal en forma de pie alargado y delgado
- q. Célula basal en forma claramente de ranura
- r. Célula basal presenta escasamente la forma de ranura

ANEXO C

TÉCNICAS DE CAMPO

Cuadro C1. Sustancias permitidas para la producción agrícola orgánica.

A. Plaguicidas.

1. Productos fitosanitarios

I. Sustancias de origen vegetal o animal

Denominación	Descripción, requisitos y condiciones de utilización
Azadiractina extraída de <i>Azadirachta indica</i> (Árbol neem)	Insecticida Necesidad reconocida por la agencia de certificación
(*) Cera de abejas	Agente para la poda
Gelatina	Insecticida
(*) Proteínas hidrolizadas	Atrayente Solo en aplicaciones autorizadas en combinación con otros productos apropiados de la Parte B de este anexo
Lecitina	Fungicida
Extracto de nicotina (solución acuosa) de <i>Nicotina tabacum</i>	Insecticidas Solo contra los áfidos de los árboles frutales subtropicales (por ejemplo naranjas, limoneros) y de plantas tropicales (por ejemplo plátanos); utilícese solo al principio del periodo de vegetación. Necesidad reconocida por la agencia de certificación
Aceites vegetales (por ejemplo, aceite de menta, aceite de pino, aceite de alcaravea)	Insecticida, acaricida, fungicida e inhibidor de la germinación
Piretrinas extraídas de <i>Chrysanthemum cinerariaefolium</i>	Insecticida Necesidad reconocida por la agencia de certificación
Quassia extraída de <i>Quassia amara</i>	Insecticida y repelente
Rotenona extraída de <i>Derris</i> spp, <i>Lonchocarpus</i> spp y <i>Terphrosia</i> spp.	Insecticida Necesidad reconocida por la agencia de certificación

II. Microorganismos utilizados sólo para el control biológico de plagas.

Denominación	Descripción, requisitos y condiciones de utilización
Microorganismos (bacterias, virus y hongos), por ejemplo, <i>Bacillus thuringiensis</i> , Granulosis virus, etc)	Únicamente productos que no se hayan modificado genéticamente

Cuadro C2. Incidencia de la Enfermedad

$$(Incidencia) I = \left(\frac{N^{\circ} \text{ de Individuos afectados}}{\text{Total de Individuos}} \right) \times 100$$

Cuadro C3a . Severidad Externa de la Enfermedad- escala de Marchitez (aplicada por Farías, 2005).

Clasificación	Características
0	Sin Marchitez
1	Marchitez Leve
2	Marchitez Moderada
3	Marchitez Severa
4	Muerte

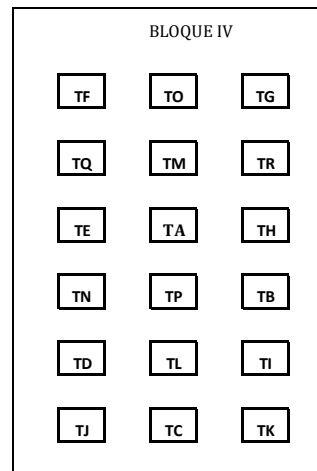
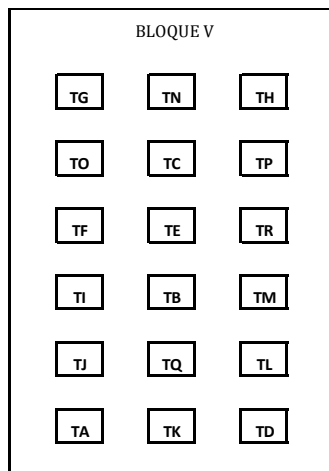
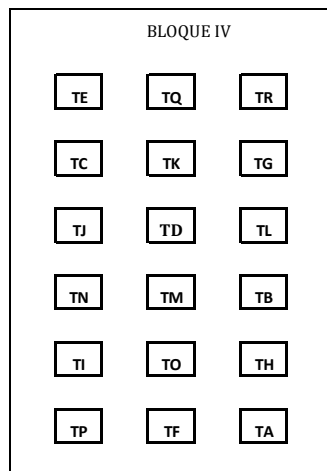
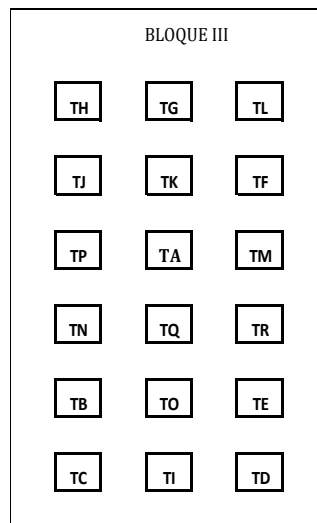
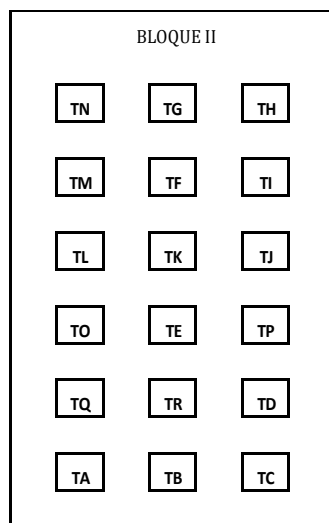
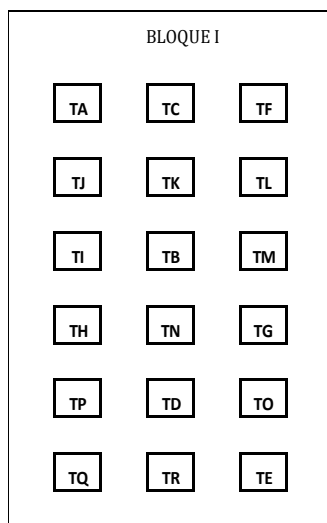
Fuente: Farías, 2005.

Cuadro C3a . Severidad Interna de la Enfermedad- escala de Marchitez – Según Orjeda, 1998, aplicada por Caballero, 2011; modificada por Martínez, 2012.

Clasificación	Características
0	Ausencia de síntomas
1	Puntos dispersos de color rojo pardo en el tejido vascular
2	Coloración rojo pardo del tejido vascular menor a 50%
3	Coloración rojo pardo del 50% al 75% del tejido vascular
4	Color rojo pardo del 75% a 100% del tejido vascular.

Fuente: Caballero, 2011.

Cuadro C4. Diseño del ensayo – Pruebas de Patogenicidad



Códigos de Tratamientos:

TA: Tratamiento testigo Variedad INIAP 2009

TB: Tratamiento testigo Variedad Local

TC: Variedad INIAP 2009 – FL – 1

TD: Variedad Local – FL – 1

TE: Variedad INIAP 2009 – FL – 2

TF: Variedad Local – FL – 2

TG: Variedad INIAP 2009 – FV - 1

TH: Variedad Local – FV - 1

TI: Variedad INIAP 2009 – FI - 1

TJ: Variedad Local – FI - 1

TK: Variedad INIAP 2009 – FI - 2

TL: Variedad Local – FI - 2

TM: Variedad INIAP 2009 – FI - 3

TN: Variedad Local – FI - 3

TO: Variedad INIAP 2009 – FSM - 1

TP: Variedad Local – FSM - 1

TQ: Variedad INIAP 2009 – FSM - 2

TR: Variedad Local – FSM - 1

ANEXO D

FOTOS DE ENSAYOS

Foto 1. Raíz de planta de maracuyá con síntomas de “marchitez vascular”.



Foto 2. Cultivos de maracuyá afectado por La “marchitez vascular”



Foto 2- 3. Cultivos monospóricos de patógenos *Fusarium* sp., aislados de muestras vegetales.

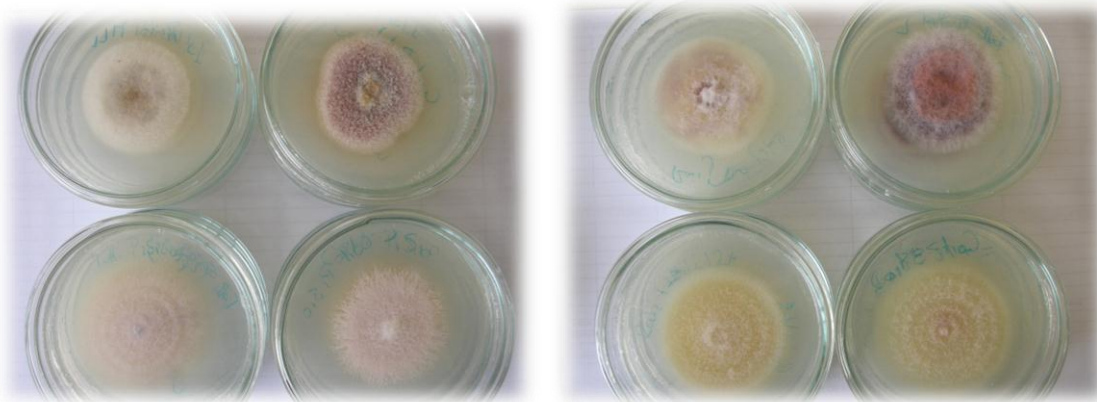
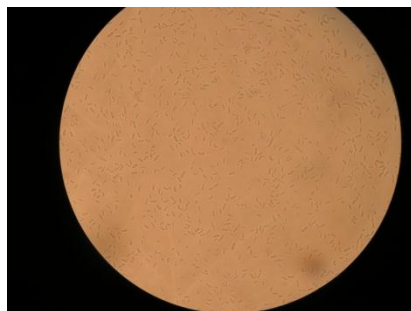


Foto 4. Identificación de *Fusarium solani*

a. Microconidias



b. Macroconidias



d. Clamidosporas



e. Micelio



Foto 5. Preparación de concentración 1×10^6 esp/ml.

a. Raspado de micelio patogénico



b. Filtrado de solución obtenida en el raspado.



d. Aforo de la solución fúngica



e. Ajuste de la concentración

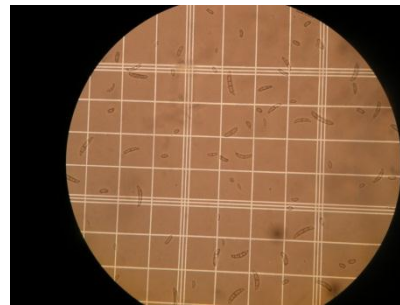


Foto 6. Antagonismo *Trichoderma* sp. vs. *Fusarium* sp.



Foto 7. Avance de la enfermedad

N° Plantas: 6

DÍAS (t)	ENFERMAS		Proporción $y=(I+0,5)/(N+1)$	$(y_i + y_{i+1})/2$	$(t_{i+1} - t_i)$	$[(y_i + y_{i+1})/2] * (t_{i+1} - t_i)$
	OBS.	OBS. (%)				
1	0	0.0	0.0000	0.0850	6	0.51
7	1	16.7	0.1700	0.2500	7	1.75000
14	2	33.3	0.3300	0.4150	7	2.905
21	3	50.0	0.5000	0.5000	7	3.5
28	3	50.0	0.5000	0.5850	7	4.095
35	4	66.7	0.6700	0.8350	7	5.845
42	6	100.0	1.0000			

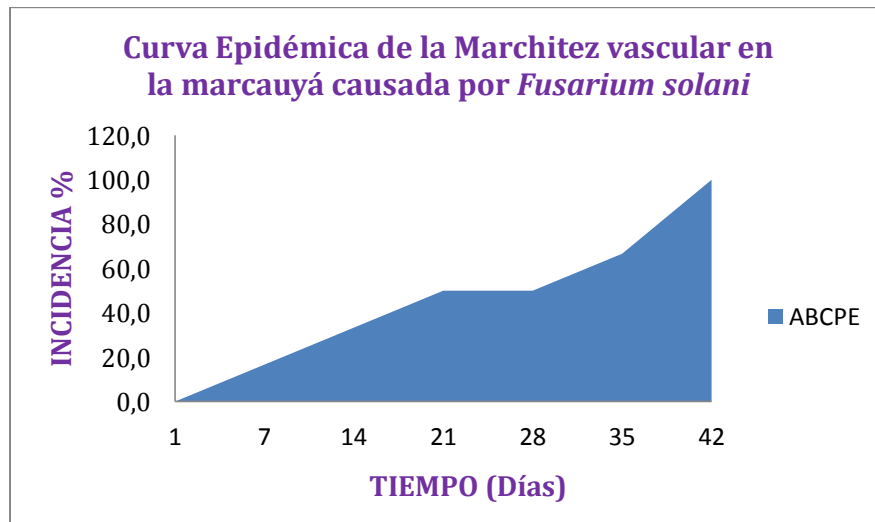


Foto 8. Pruebas de Patogenicidad

Foto 8a



Foto 8b



Foto 8c



Foto 8d



Foto 8e



Foto 8f



En las imaginas se observan:

Foto 8a. El testigo a la izquierda no presenta síntomas visibles de la enfermedad, mientras que las otras plantas inoculadas con el hongo *Fusarium solani* a una concentración de 1×10^6 esp/ml, presentan los síntomas que son defoliación.

Fotos 8b – 8c. El testigo a la izquierda presenta un sistema radical de mayor tamaño y color blanco, mientras que los tallos y sistemas radicales de las demás plantas inoculadas con *Fusarium solani* presentan un sistema radical casi inexistente y el cuello presenta coloraciones pardas.

Foto 8d. Parte de tallo y raíz de planta de maracuyá afectada por los síntomas de *Fusarium solani*, colocados en cámara húmeda.

Fotos 8e – 8f. Hongo *Fusarium solani* identificados directamente de tallo y cuello de raíz al microscopio en lente 10x.