



**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA AGROPECUARIA DE
MANABÍ**

MANUEL FÉLIX LÓPEZ

CARRERA AGRÍCOLA

**TESIS PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERO AGRÍCOLA**

TEMA:

**CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS CELULOLÍTICOS
FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.***

AUTOR:

NÉSTOR LEOPOLDO TARAZONA MEZA

TUTOR:

ING. ANGEL M. GUZMAN CEDEÑO, Mg. As.

CALCETA, ABRIL 2015

DERECHOS DE AUTORÍA

Néstor Leopoldo Tarazona Meza, declara bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración cedo mi derecho de propiedad intelectual, de este trabajo, a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

.....
NÉSTOR L. TARAZONA MEZA

CERTIFICACIÓN DEL TUTOR

Ángel Monserrate Guzmán Cedeño certifica haber tutelado la tesis titulada CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS CELULOLÍTICOS FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.*, que ha sido desarrollada por Néstor Leopoldo Tarazona Meza, previa la obtención del título de ingeniero Agrícola, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....
ING. ÁNGEL M. GUZMÁN CEDEÑO, Mg. As.

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

Los suscritos integrantes del tribunal correspondiente, declaran que han APROBADO la tesis titulada CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE HONGOS CELULOLÍTICOS FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.*, que ha sido propuesta, desarrollada y sustentada por Néstor Leopoldo Tarazona Meza, previa la obtención del título de Ingeniero Agrícola, de acuerdo al REGLAMENTO PARA LA ELABORACIÓN DE TESIS DE GRADO DE TERCER NIVEL de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López.

.....
ING. CARLOS O. VALAREZO BELTRÓN
MIEMBRO

.....
ING. JOSÉ J. MENDOZA VARGAS
MIEMBRO

.....
ING. LUIS E. PÁRRAGA MUÑOZ
PRESIDENTE

AGRADECIMIENTO

“La gratitud es uno de los sentimientos más nobles del ser humano”

Dejo constancia de mi imperecedero agradecimiento a la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí ESPAM, a sus autoridades, docentes, personal administrativo y de servicio, quiénes dejaron huellas imborrables en mi mente y corazón.

A mi estimado tutor Ing. Ángel Guzmán Cedeño quién me supo guiar con sabiduría y paciencia hacia el logro de mis objetivos profesionales.

Gracias a mi docente, guía y sobre todo amigo Ing. Sergio Vélez Zambrano, quién con su gran capacidad, profesionalismo e inteligencia, me demostró que la amistad verdadera va más allá de los títulos y triunfos que se puedan obtener en la vida. Amigo eres un gran ejemplo a seguir.

La vida me dio una nueva oportunidad, encontrar la solución a mis problemas a través del Programa Narcóticos Anónimos NA a quiénes les agradezco su motivación y amistad. Recordando que solo hay que vivir un día a la vez.

Las mejores obras son las que nacen de nobles corazones, mi inmensa gratitud al Ing. Juan Ramón Moreira amigo y gran profesional, al Ing. Alfredo Pinargote y al Ing. Diego Zambrano quienes sabiamente me colaboraron con sus ideas y sugerencias.

Gracias a Dios por preciarme de mis amistades, vecinos y compañeros de trabajo, quiénes han sido luz de bondad, compañerismo y alegría.

Somos caminantes...depende de cada uno el camino que escojas.

DEDICATORIA

Dios me regaló dos ángeles sobre la tierra, mi padre Néstor Tarazona de quién he aprendido que el trabajo honesto lo puede todo. Y mi adorada madre Carmen Meza quién con su inmenso amor, paciencia y ternura me ha impulsado a seguir adelante, sus esfuerzos y sacrificios han dado los resultados deseados, tres hijos profesionales. Gracias Madre porque eres mi mayor ejemplo de tenacidad y amor sincero. Para ustedes este fruto como resultado de su dedicación y responsabilidad como padres.

Soy un hombre bendecido tengo una mujer que me ama y la amo a quién le dedico este primer gran logro profesional. Gracias Cleopatra Avellán García por tu paciencia, amor leal y apoyo constante. Comparto contigo este de muchos más logros que obtendremos para nuestra familia.

No soy el mejor hombre del mundo, pero si soy el más amado por mi familia. Por eso les dedico este trabajo a mis hermanas Katherine y Nadia Tarazona Meza quiénes me han impulsado a seguir adelante y junto a mis sobrinos Tadeo Barros y Said Obando son mi fuente de motivación permanente.

Gracias a la vida que me ha dado tanto...

CONTENIDO GENERAL

DERECHOS DE AUTORÍA.....	II
CERTIFICACIÓN DEL TUTOR.....	III
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL.....	IV
AGRADECIMIENTO.....	V
DEDICATORIA.....	VI
CONTENIDO GENERAL.....	VII
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES.....	1
1.1 Planteamiento y formulación del problema.....	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Hipótesis.....	3
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1 Hongos:.....	4
2.1.1 Generalidades.....	4
2.1.2 Ecología fúngica.....	5
2.1.3 Mecanismos de control.....	5
2.1.4 Antibiosis.....	6
2.1.5 Competencia.....	7
2.1.5.1 Competencia por carbono.....	8
2.1.5.2 Competencia por elementos menores.....	8
2.1.6 Parasitismo.....	9
2.2 Control biológico con hongos.....	10
2.2.1 <i>Trichoderma</i> en el control biológico.....	10
2.2.2 <i>Penicillium oxalicum</i> en el control biológico.....	11
2.3 Hongos fitopatógenos.....	12
2.3.1 <i>Fusarium sp.</i>	12
2.3.1.1 Enfermedades causadas por <i>Fusarium sp.</i>	13
2.3.2 <i>Macrophomina sp.</i>	17
2.3.2.1 Enfermedades causadas por <i>Macrophomina sp.</i>	18
CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO.....	20
3.1 Ubicación.....	20

3.2 Duración del estudio	20
3.3 Factores en estudio	20
3.4 Niveles.....	20
3.5 Tratamientos.....	21
3.6 Delineamiento experimental.....	21
3.7 Manejo del experimento.....	22
3.7.1 Crecimiento <i>in vitro</i> de hongos celulolíticos.....	22
3.7.2 Crecimiento <i>in vitro</i> de hongos fitopatógenos.....	23
3.7.3 Capacidad antagónica de los hongos celulolíticos frente a los hongos fitopatógenos <i>Fusarium sp.</i> y <i>Macrophomina sp.</i> a nivel <i>in vitro</i>	23
3.7.4 Actividad antagónica de los hongos celulolíticos seleccionados frente a <i>Fusarium sp.</i> y <i>Macrophomina sp.</i> a través de cocultivos en medio líquido	24
3.7.5 Control biológico de la cepa seleccionado frente a <i>Fusarium sp.</i> y <i>Macrophomina sp.</i> en plantas de pimiento infectadas	25
3.7.5.1 Tratamientos.....	25
3.7.5.2 Delineamiento experimental.....	26
3.8 Datos evaluados en el cultivo	28
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
4.1 Capacidad antagónica de los hongos celulolíticos frente a los hongos fitopatógenos <i>Fusarium sp.</i> y <i>Macrophomina sp.</i> a nivel <i>in vitro</i>	30
4.2 Actividad antagónica de los hongos celulolíticos seleccionados frente a <i>Fusarium sp.</i> y <i>Macrophomina sp.</i> a través de cocultivos en medio líquido	34
4.3 Control biológico de la cepa de hongo celulolítico, seleccionado, frente a <i>Fusarium sp.</i> y <i>Macrophomina sp.</i> en plantas de pimiento infectadas con estos patógenos.	35
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXOS.....	45

CONTENIDO DE CUADROS Y GRÁFICOS

CUADROS:

3.1.Tratamientos	21
3.2.Esquema de análisis de varianza	22
3.3.Escala para evaluación de la capacidad antagónica	24
3.4.Análisis de varianza	26
4.1.Porcentaje de inhibición radial de <i>Macrophomina</i>	30
4.2.Porcentaje de inhibición radial de <i>Fusarium</i>	31
4.3.Evaluación cualitativa de la capacidad antagónica contra <i>Macrophomina</i>	33
4.4.Evaluación cualitativa de la capacidad antagónica contra <i>Fusarium</i>	33
4.5.Promedio de la variable altura de planta de pimiento (cm).....	36
4.6.Promedio de las variables peso seco y húmedo tanto en la raíz y el follaje.....	37

GRÁFICOS:

4.1. Actividad antagonista de la cepa A.O-5 frente a <i>Fusarium</i> en cocultivo medio líquido.....	34
4.2. Actividad antagonista de la cepa A.O-5 frente a <i>Macrophomina</i> en cocultivo medio líquido.....	35

RESUMEN

El objetivo de esta investigación fue evaluar la capacidad antagónica de ocho hongos celulolíticos nativos frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* En primera instancia se determinó la cepa promisoría del hongo celulolítico, para lo cual, en caja Petri se colocó un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio de una cepa antagonista y en el extremo opuesto, a una distancia de 5 cm aproximadamente, otro disco de 4 mm con micelio de un patógeno. La capacidad antagónica se determinó por el grado de micoparasitismo y la competencia por nutrientes y espacios, registrando el porcentaje de inhibición del crecimiento radial. Con la cepa del hongo celulolítico que tuvo el mejor comportamiento antagonista se realizó un cocultivo independiente con cada patógeno, aquí se evaluó las UFC/mL⁻¹, crecidas en medio PDA. También se inoculó junto a las cepas fitopatógenas en plantas de pimiento para conocer el nivel de antagonismo en macetas. En la evaluación cualitativa, la cepa A.O-5 mostró una invasión y esporulación total en la superficie en ambos patógenos; mientras que en el cocultivo inhibe el crecimiento de los patógenos a la 96 h. Igualmente demostró su acción antagonista frente a *Fusarium* y *Macrophomina* en las plántulas de pimiento. Por lo encontrado, se estima que la cepa A.O-5 es un potencial agente antagonista de los fitopatógenos evaluados.

PALABRAS CLAVE: invasión, cocultivo, crecimiento radial, fitopatógenos

ABSTRACT

This research aimed to evaluate the antagonistic activity of eight native cellulolytic fungi against the phytopathogenic fungi *Fusarium sp.* and *Macrophomina sp.* First, the promissory cellulolytic fungus strain was identified, for the purpose, the mycelial plugs (4 mm diameter) of pathogens and fungal antagonists were placed on the same dish at about 5 cm from each other. The antagonistic activity was determined by the level of mycoparasitism, competition for nutrients and space, recording the percentage of inhibition of the radial growth. A co-culture of the tested cellulolytic fungus strain that showed the best antagonistic activity and each pathogen strain was performed, then the colony forming units (CFU/ml⁻¹) cultured in PDA were evaluated. They were also inoculated in pepper plants in pots to know the antagonistic potential. According the qualitative analysis, the strain A.O5 showed invasion and complete sporulation over the pathogens; while the co-culture inhibits the growth of pathogens at 96 h. The antagonistic activity was also showed against *Fusarium* and *Macrophomina* in pepper seedlings. The results showed that the A.O-5 strain is a potential antagonist for the pathogens evaluated.

KEY WORDS: Invasion, co-culture, radial growth, phytopathogens.

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1 PLANTEAMIENTO Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

El impacto ecológico que ha ocasionado la agricultura convencional pone en evidencia sus enormes limitaciones para resolver el problema de la seguridad alimentaria, especialmente en los países en vía de desarrollo, más aun al incrementarse la demanda de los productos de exportación al ser cada vez más rigurosas las normas que permiten su entrada y comercialización, ya que solo se reciben y comercializan productos de alta calidad y con trazas mínimas de químicos, de manera que el riesgo a la salud del consumidor sea minúsculo, y casi sin consecuencias a largo plazo; una de estas causas es el uso indiscriminado en los cultivos de productos de síntesis química sobre todo de fungicidas para combatir y contrarrestar el ataque de enfermedades provocadas por hongos que causan serias pérdidas económicas.

En los actuales momentos en el Ecuador existen fungicidas que resultan muy eficientes en el control de enfermedades que logran reducir su incidencia, pero esto conlleva a fortalecer la resistencia del agente causal hacia algunos productos; lo que ha conducido a buscar la implementación de otras técnicas agrícolas que reduzcan el uso de productos de síntesis química en el control de las enfermedades que destruyen los cultivos.

Como respuesta a esto la agroecología presenta varias técnicas para minimizar el impacto del uso excesivo de fungicidas, uno de estos métodos es el de aplicar hongos con características antagonistas que ayuden a controlar y prevenir el ataque de las enfermedades. Los hongos celulolíticos se presentan como una buena opción a ser usada en los cultivos.

Los estudios existentes en el Ecuador, sobre este tipo de hongos, sirven como pauta para determinar en la práctica la capacidad antagonista frente a hongos fitopatógenos. Un ejemplo de estos trabajos lo reportan Guzmán *et al.* (2014),

quienes aislaron un grupo de hongos de diferentes ambientes de Manabí-Ecuador con la intención de seleccionar los de mayor actividad celulolítica; además, se vienen evaluando otras posibles aplicaciones agronómicas en fases de laboratorio y campo en la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí.

Por lo expuesto se plantea la siguiente interrogante: ¿De qué forma Los hongos celulolíticos realizaran su efecto antagonista sobre los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.*?

1.2 JUSTIFICACIÓN

Es ya una necesidad encontrar nuevos métodos que sustituyan a los productos químicos de síntesis para el control de plagas y enfermedades de los cultivos, por ello una alternativa sería aprovechar las ventajas que ofrecen los hongos como agentes de biocontrol frente a otros sistemas de lucha, bien por ellos mismos o a través de sus metabolitos fúngicos. Así mismo, está reconocido que el control biológico se produce de forma natural sin intervención del hombre, puesto que las plagas tienen sus antagonistas naturales.

Al conocer los mecanismos de interacción entre un patógeno y los organismos antagónicos, el control biológico puede mantener el equilibrio entre las poblaciones. Los organismos dificultan la actividad patogénica de otros utilizando una gran variedad de mecanismos de acción como, la antibiosis, la competencia por los nutrientes y el espacio, y el parasitismo. En ocasiones, no es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre antagonistas y patógenos, pero en general, no tienen un único tipo de acción, y sí el antagonista posee varios de ellos reduce el riesgo de que el patógeno desarrolle sistemas de resistencia; por ello poseer distintos mecanismos les convierte en posibles agentes de biocontrol (Roselló, 2003).

Las razones expuestas son argumentos, para tomar como desafío el desarrollo de un proyecto que permita evaluar la capacidad antagónica de las cepas de hongos celulolíticos aislados en ambientes de Manabí-Ecuador frente a hongos fitopatógeno.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad antagónica de hongos celulolíticos, aislados en Manabí-Ecuador, frente a hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* como potenciales agentes de control biológico.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar la capacidad antagónica de los hongos celulolíticos frente a los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* a nivel *in vitro*.
- Determinar la actividad antagónica de los hongos celulolíticos seleccionados frente a *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* a través de cocultivos en medio líquido.
- Definir el nivel de control biológico de la cepa de hongo celulolítico, seleccionado, frente a *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* en plantas de pimiento infectadas con estos patógenos.

1.4 HIPÓTESIS

Las cepas de hongos celulolíticos autóctonos ejercen acción antagónica frente a *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.*

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 HONGOS:

2.1.1 GENERALIDADES

El término hongo procede del latín fungus, que significa hongo. Dichos seres constituyen un grupo muy numeroso de organismos y han sido considerados tradicionalmente más próximos a las plantas que a otros seres vivos debido a su similitud en la composición química y a su estructura ultramicroscópica, aunque en la actualidad son grupos que se estudian por separado (García, 2012). A esto Arístegui (2002) menciona que con la aplicación de la biología molecular en los estudios taxonómicos se ha observado que los hongos están más próximos al reino Animalia que al Plantae.

Los hongos celulolíticos tienen la capacidad de penetrar en los residuos celulósicos y excretan celulasas en sitios internos de las partículas celulósicas, en estos sistemas, las enzimas no forman complejos y son denominados sistemas no agregativos. Por el contrario, las bacterias anaeróbicas carecen de la capacidad de penetrar en este material y presentan sistemas agregativos (Castillo *et al.*, 2005).

Las especies de hongos celulolíticos más frecuentemente estudiadas pertenecen al género *Trichoderma* por ser los mejores productores de celulasas. Sin embargo otros géneros y especies de hongos tales como *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Neurospora crassa*, incluyendo además hongos comestibles como: *Lentinula edodes*, *Volvariella volvacea*, *Pleurotus sp.*, también producen celulasas. El hongo *Trichoderma reesei* es el mejor productor de celulasa extracelular, por lo que la mayoría de los estudios concernientes a la naturaleza, modo de acción y aspectos en general de las celulasas han sido realizados usando este microorganismo (Vilches, 2002).

Los microorganismos del suelo (hongos y bacterias) son propagadores anónimos que hacen que este sea fértil, descomponiendo la materia orgánica hasta la más mínima expresión haciendo posible la absorción de muchos compuestos y elementos por las plantas. Un suelo fértil es aquel que tiene una gran biodiversidad de microorganismos que mediante las actividades liberan nutrientes en forma permanente para alcanzar un balance que permita un buen desarrollo vegetal (Borrero *et al.*, 2005).

2.1.2 ECOLOGÍA FÚNGICA

En la naturaleza ningún organismo que viva en una comunidad existe de forma aislada. Cada organismo interviene en toda una serie de interacciones, tanto con otros organismos como con los factores del ambiente que lo rodean. Por ello, el crecimiento y desarrollo de los hongos se ve influenciado por los factores bióticos (interacciones con hongos y otros organismos) y por los factores abióticos, como la actividad de agua, la temperatura, la composición gaseosa y el pH del sustrato (Roselló, 2003).

El mismo autor sostiene que entre los factores ambientales muestran especial importancia la actividad de agua y la temperatura, puesto que influyen en la capacidad de los hongos para usar los nutrientes del suelo y para crecer en ellos. La temperatura afecta al crecimiento del micelio y a la germinación de los conidios, mientras que la disponibilidad de agua determina si una spora fúngica puede germinar y con qué rapidez lo hace. Existe poca información disponible sobre los requerimientos nutricionales y ambientales de la mayoría de los hongos, por lo que el conocimiento de los mismos es necesario para comprender la eficacia de los hongos en el control biológico.

2.1.3 MECANISMOS DE CONTROL

El control de enfermedades puede resultar de un antagonismo directo contra el patógeno, o por acción indirecta a través de la resistencia inducida de la planta hospedera. El antagonismo directo implica interacción directa entre dos

microorganismos que comparten el mismo nicho ecológico. Se pueden caracterizar tres modos de acción directa: parasitismo, competición por nutrientes y antibiosis. Estas interacciones no son exclusivas de cada uno sino que cada cepa puede poseer varios modos de acción (Carballo *et al.*, 2004).

El mismo autor indica que existe una gran variedad de mecanismos por medio de los cuales los organismos dificultan la actividad patogénica de otros, aunque, en general, pueden ser resumidos en tres: antibiosis, competencia y parasitismo. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general, no tienen un único tipo de acción, y el poseer varios de ellos les convierte en posibles agentes de biocontrol.

2.1.4 ANTIBIOSIS

La antibiosis, en sentido estricto, es el antagonismo ejercido por los metabolitos de origen microbiano con actividad biocida, entre los cuales se encuentran los agentes líticos, las enzimas, los compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas. Estos organismos, tienen el potencial para actuar como fuente de compuestos antifúngicos de uso en la agricultura. Los posibles antagonistas deben ser capaces de producir metabolitos activos, no sólo en medios artificiales sino también en condiciones naturales. Por ejemplo los metabolitos producidos por *Trichoderma harzianum* se han evaluado para el control de patógenos de plantas (Jarvis 1998 citado por Roselló, 2003).

Además manifiesta que este hongo produce un metabolito denominado harzianopiridona. Las piridonas fúngicas son relativamente raras y este es el primer ejemplo de un compuesto de este tipo producido por especies de *Trichoderma*. Muestras de extracto puro han sido producidas por fermentación y se ha demostrado que son moderadamente activas contra la costra de la manzana (*Venturia inaequalis*), el tizón tardío del tomate (*Phytophthora infestans*) y *Botrytis cinérea*.

Carballo *et al.* (2004) menciona que la antibiosis es el antagonismo que resulta cuando un microorganismo produce metabolitos secundarios que son tóxicos para otro microorganismo o que inhiben las actividades celulares vitales. Esta capacidad les provee de un margen competitivo, especialmente en la colonización de sustratos orgánicos donde la competencia por espacio y alimentos puede ser feroz.

Este autor sostiene que la antibiosis es un fenómeno muy común, responsable de la actividad biocontroladora de muchos organismos tales como *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, o *Trichoderma spp.*, que han sido desarrolladas como agentes de control biológico de patógenos. Una variedad de diferentes metabolitos como antibióticos, bacteriocinas, enzimas y compuestos volátiles se han descrito y están involucrados en la supresión de diferentes patógenos.

2.1.5 COMPETENCIA

La competencia puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de ellos, reduzca la cantidad necesaria para los demás.

Además constituye un mecanismo de acción antagónico muy importante, puede producirse por los nutrientes o bien por el espacio (Martinez *et al.*, 2013).

Fernández *et al.* (2001) menciona que un factor esencial para que exista competencia, es la escasez o limitación de un elemento, porque si hay exceso no hay competencia. Por ejemplo, *Botrytis* y *Penicillium expansum* son hongos típicamente de poscosecha, y para que sus esporas germinen necesitan alimentos, los cuales se encuentran en las heridas de las frutas, y es allí donde ambos competirán para conseguir el alimento.

También indican que la competencia por los nutrientes se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los otros. La competencia por el espacio también ha sido evaluada. Las levaduras son eficaces colonizadoras de la superficie de las plantas y destacan por producir compuestos extracelulares, principalmente polisacáridos, que restringen el espacio para que otros microorganismos lo colonicen.

2.1.5.1 COMPETENCIA POR CARBONO

Este tipo de competencia ocurre en el suelo y es considerada responsable del fenómeno conocido como fungistasis, que consiste en la inhibición de la germinación de esporas del hongo en el suelo. Esta supresión resulta de la actividad combinada de varias poblaciones microbiales y cualquier agente de biocontrol aplicado al suelo puede ser sometido a fungistasis. Algunas especies o razas de antagonistas son más competitivas que otras y pueden ser seleccionadas para el control biológico. La competición por carbono también ha sido involucrada en el antagonismo expresado por diferentes cepas de *Trichoderma sp.* contra varios patógenos de plantas, especialmente *Fusarium oxysporum* (Fernández *et al.*, 2001).

2.1.5.2 COMPETENCIA POR ELEMENTOS MENORES

Carballo *et al.* (2004) sostiene que este tipo de competencia es muy frecuente en el suelo. Así por ejemplo, la competencia por hierro (uno de los mejores documentados ejemplos de competencia por micronutrientes) es uno de los modos de acción por los cuales *Pseudomonas fluorescens* limita el crecimiento de hongos patogénicos y reduce la incidencia o severidad de las enfermedades. Bajo condiciones de estrés de hierro, estas bacterias sintetizan sideróforos, llamados pseudobactinas opioverdinas que muestran una mayor afinidad para Fe^{+3} que los sideróforos fungales.

Además señalan que los micronutrientes (Cu, Mn y Zn) también juegan un papel en el control de enfermedades inducidas por patógenos del suelo. La asociación de dos microorganismos antagonistas compitiendo con el patógeno por dos diferentes nutrientes, puede resultar en un incremento en la eficacia del biocontrol.

2.1.6 PARASITISMO

En la naturaleza el parasitismo es muy corriente, y se trata de la acción directa de un microorganismo parasitando a otro, donde el patógeno es utilizado como alimento por su antagonista. Este tipo de mecanismo se basa en la producción, por parte del antagonista, de enzimas extracelulares, como la quitinasa, la celulasa, la β ,1-3-glucanasa y la proteasa, que utilizará para romper las estructuras del patógeno, y poderlo parasitar. Los ejemplos más conocidos de hongos parásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. En *Trichoderma*, el parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, el engrosamiento de hifas, la producción de haustorios, y la desorganización del contenido celular (Fernández y Larrea, 2001).

Carballo y Guharay (2004) mencionan que el término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasita a otro, en este caso a un patógeno de plantas. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium*. El parasitismo juega un papel principal en el antagonismo expresado por algunas razas de *Trichoderma* contra *Rhizoctonia solani*. Sin embargo, discriminar entre parasitismo y otros mecanismos de acción, es difícil ya que enzimas que degradan la pared celular como quitinasas y glucanasas están involucradas en el proceso de parasitismo.

Además señalan que con otros patógenos, también actúan enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, Beta-1-3-glucanasas y proteasas que rompen las estructuras de los hongos parasitados. Hongos del género *Trichoderma* también han sido muy estudiados como antagonistas de

otros patógenos del suelo como *Sclerotium rolfsii* y *Sclerotium cepivorum* y existen varias formulaciones comerciales desarrolladas a partir de ellos.

2.2 CONTROL BIOLÓGICO CON HONGOS

2.2.1 *Trichoderma* EN EL CONTROL BIOLÓGICO

Las especies de *Trichoderma* son importantes como agentes de biocontrol y es uno de los géneros fúngicos con mayor potencial para el control de las plagas que afectan a la agricultura. Estos hongos son empleados en numerosas ocasiones, con o sin registro legal, para el control de enfermedades de las plantas. Diversas especies de este género se utilizan en el tratamiento de semillas e incluso contra hongos que causan la degradación de la madera. Además las especies de *T. viride* y *T. harzianum* se han reconocido como bioplaguicidas principalmente contra *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Sclerotinia* y *Botrytis* (Santamarina *et al.*, 2001).

Estos autores señalan que ahora se sabe que *Trichoderma* utiliza varios mecanismos de acción para controlar el desarrollo de los patógenos. Algunos de ellos son el micoparasitismo, la antibiosis, la competencia por los nutrientes y la producción de compuestos volátiles de todos ellos, el que tiene un papel principal es el parasitismo. El presentar más de un mecanismo de control le confiere una característica importante para poder ser seleccionado como agente de biocontrol. En algunos casos, *Trichoderma* actúa sobre los patógenos gracias a su capacidad de colonizar rápidamente el sustrato.

Roselló (2003) indica que algunos hongos son inhibidos por compuestos volátiles o por metabolitos solubles. Entre los compuestos volátiles las alquilpironas son las más efectivas, y entre los metabolitos solubles se encuentra la ciclosporina producida por *T. polysporum*, los antibióticos de tipo isonitrilo y la tricodermina producidos por *T. hamatum* y como principal agente soluble antifúngico las trichoianinas. *T. harzianum* además de producir

trichozianinas sintetiza una gran variedad de compuestos solubles como la harziandiona, la furanona, la harzianolida y el *harzianum A*.

Sigue manifestando que aunque la versatilidad, adaptabilidad y fácil manejo de los hongos de *Trichoderma* han permitido su utilización en el control biológico, existen ciertas limitaciones para el avance en las investigaciones, debido a las deficiencias en las tecnologías de formulación, así como en buscar un sistema homogéneo de reparto para ser utilizado en condiciones de campo.

El biocontrol de fitopatógenos de suelo con especies de *Trichoderma* ha sido objeto de estudio desde 1930, y se ha aplicado a pequeñas escalas directamente al suelo o en el tratamiento de las semillas encontraron que *T. harzianum* induce altos niveles de enzimas líticas (1-3 β glucanasa y quitinasa) sobre las células de las paredes de los patógenos *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum*. Hay informes sobre diversos intentos para el biocontrol de las poblaciones de *Fusarium oxysporum* causantes de marchiteces en diferentes hospedantes (Sandoval *et al.*, 1994).

2.2.2 *Penicillium oxalicum* EN EL CONTROL BIOLÓGICO

Algunas especies de *Penicillium sp*, además de causar daños pudriendo frutos, bulbos o granos, también pueden ser importantes como agentes de biocontrol frente a diversos patógenos vegetales. Así, *P. funiculosum* contra *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici*; *P. lilacinum* contra *Phomopsis sclerotioidea*; *P. vermiculatum* contra *Verticillium dahliae*; y *P. oxalicum* contra diversos patógenos del guisante frente a *Pythium ultimum* así como contra *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. *P. oxalicum* es considerado por distintos autores como un prometedor agente fúngico para el control de las enfermedades del suelo y ha sido referenciado como productor de un amplio rango de polisacáridos y enzimas que degradan la pectina también glucanasas, celulasas, hemicelulasas y otras enzimas (Roselló, 2003).

Por otra parte, este autor indica que una cepa de *P. oxalicum* que actúa como antagonista de distintas cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* que

causan la fusariosis vascular del tomate. Lo que ha permitido demostrar que *P. oxalicum* es capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* en estudios “in vitro” de crecimiento dual, al producir enzimas líticas que degradan la pared celular del patógeno. También en experiencias en invernadero han podido comprobar que *P. oxalicum* disminuye la fusariosis del tomate, tanto al inocularlo en suelos que han sido esterilizados como en los que no.

Así como, que es capaz de inducir resistencia en las plantas de tomate frente a *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, activando los mecanismos de defensa de la planta, consiguiéndose una reducción de la enfermedad del 20-50%, después de aplicar distintos tratamientos con *P. oxalicum* según la severidad de la enfermedad. La inmunidad, que *P. oxalicum* confiere a las plantas, se mantuvo durante 60-100 días después de inocular el patógeno (Fernández y Larrea 2001).

2.3 HONGOS FITOPATÓGENOS

2.3.1 *Fusarium sp.*

Las especies del género *Fusarium* son muy variables debido a sus características genéticas y a los cambios que el ambiente causa en la morfología de los cultivos. Estos hongos son habitantes del suelo que pueden ser transportados por los residuos vegetales y recuperados de las raíces profundas como de las flores más altas. Se han hecho revisiones históricas acerca de la taxonomía de *Fusarium* que recorren el desarrollo del concepto genérico desde el diagnóstico original de Link llegando al concepto morfológico empleado hoy (Flores *et al.*, 2005).

Muchas claves taxonómicas en uso están basadas en la morfología de las estructuras anamórficas: macroconidios, microconidios, conidióforos y clamidoconidios, considerando medidas, formas, número de tabiques, células basales, ubicación, tipo de fiálides, esporodoquios. El proceso de

reconocimiento de las especies se simplifica si además se dispone de información adicional tal como hospedante, síntomas de enfermedades y observaciones realizadas durante el proceso de aislamiento (Summerell *et al.*, 2003).

2.3.1.1 ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Fusarium sp.*

Las especies de *Fusarium* están referenciadas como hongos de campo, pero no es extraño encontrarlos, ocasionalmente, como hongos de almacén, sobre todo cuando la disponibilidad de agua es alta y las temperaturas bajas. Por ello suelen estar involucradas en el desarrollo de distintas fitopatologías, concretamente son los causantes de los marchitamientos vasculares (fusariosis vascular), de las podredumbres de cuello y raíces, y los mohos amarillos y rosados de las enfermedades de poscosecha (Roselló, 2003).

MARCHITAMIENTOS VASCULARES

Agrios (1999) señala que los marchitamientos vasculares son enfermedades típicas del suelo y son muy destructivas, espectaculares y alarmantes. Se manifiestan en un marchitamiento más o menos rápido, empardecimiento y muerte de hojas y vástagos, dando como resultado la muerte de la planta. Los marchitamientos se deben a la presencia y actividad del patógeno en los tejidos vasculares xilemáticos de las plantas.

Además este autor menciona que generalmente, el patógeno continúa propagándose por el interior, en forma de micelio o conidios, a través de los vasos xilemáticos hasta que muere toda la planta. Mientras que la planta siga viviendo, el hongo se limita a los tejidos vasculares y a algunas células circundantes; sólo cuando la planta infectada muere, el hongo se propaga hacia otros tejidos y esporula sobre ella. Tres géneros son los causantes de los marchitamientos vasculares: *Ceratocystis*, *Fusarium* y *Verticillium*.

FUSARIOSIS VASCULAR

Como se dijo anteriormente, esta enfermedad afecta y ocasiona pérdidas considerables en la mayoría de las flores y hortalizas anuales, plantas de ornato, árboles de sombra y plantas de cultivo (algodón, tabaco, plátano, llantén, café, caña de azúcar, tomate, etc.). La mayoría de los hongos de este género pertenecen a la especie *Fusarium oxysporum* y, según el huésped que infecta se encuentran distintas formas especiales (*F.sp.*) dentro de una especie (Agrios, 1999).

Así por ejemplo señala que el hongo que ataca al tomate se designa *Fusarium oxysporum F.sp. lycopersici*; el de las cucurbitáceas *Fusarium oxysporum f.sp.niveum*; el de la col *Fusarium oxysporum f.sp. conglutinans*; el del plátano *Fusarium oxysporum f.sp. cubense*; el del algodón *Fusarium oxysporum f.sp. vasinfectum*; el del clavel *Fusarium oxysporum f.sp. dianthii*; el del gladiolo *Fusarium oxysporum f.sp.gladioli*, etc. Considera que en la rizosfera hay una competencia intensa con otros microorganismos y en particular con otros *Fusarium*; aunque muchas cepas de *F. oxysporum* son capaces de penetrar en los tejidos corticales de la raíz, las cepas específicas del huésped son la únicas que penetran hasta el tejido vascular y causan la fusariosis.

Finalmente indica que *Fusarium* es un hongo que vive en el suelo e hiberna en él o entre los restos vegetales, en forma de micelio o esporas (clamidosporas). Se propaga a cortas distancias a través del agua del suelo y el equipo agrícola contaminado, y a grandes distancias por los trasplantes infectados o por el suelo que va en ellos. Es frecuente que una vez se haya instalado en un área se mantenga así por tiempo indefinido. Las marchiteces son más comunes y destructivas en las regiones templadas más cálidas y son menos dañinas en climas templados fríos; excepto en los cultivos de invernadero de esas áreas.

PODREDUMBRES DE CUELLO Y RAÍCES

Según Aparicio *et al.* (1991) muchos Ascomicetos atacan a las raíces y a la parte inferior del tallo de las plantas. Los más importantes son *Cochliobolus*, *Gibberella* y *Gaeumannomyces*, pero en la mayoría de los casos, la enfermedad se debe estrictamente a las etapas asexuales de los mismos; es decir especies de *Bipolaris* en el caso de *Cochliobolus* y especies de *Fusarium* respecto a *Gibberella*.

Sin embargo este autor indica que distintas especies de *Fusarium*, sobre todo *F. solani* y sus *F.sp.*, así como algunas *F.sp.* de *F. oxysporum*, producen, en vez de fusariosis vascular, la podredumbre de semillas y plántulas (ahogamiento), podredumbres de raíces, del cuello del tallo, de cormos, bulbos, tubérculos, etc.

PODREDUMBRES DE RAÍCES

Según Borrego (2014) los síntomas de la enfermedad incluyen podredumbres y coloración vascular de raíces, rizomas y tallos; lesiones necróticas sobre las superficies de la raíz y del tallo; reducción del tamaño de la planta; amarilleo y senescencia de los tallos y turiones y, en casos graves, la muerte de la planta.

Por otro lado SINAVIMO (2010) cita que la podredumbre basal por *Fusarium* se confirma si se observa la decoloración castaña y la destrucción, parcial o total de las raíces, así como una pudrición parda de las catáfilas carnosas que avanza desde el disco y que frecuentemente se encuentra acompañada por un micelio blanquecino o rosado.

Aparicio *et al.* (1991) mencionan que en plantas jóvenes de guisantes, cacahuete, soja, espárragos, tomate, entre otras; las raíces principales muestran al principio una mancha rojiza que más tarde cambia a rojo oscuro o pardo, y que se extiende hasta cubrir toda la raíz y la porción del tallo que se encuentra por debajo de la superficie del suelo, o bien aparecen rayas que se

extienden por arriba de ella. En la raíz principal aparecen fisuras y las pequeñas raíces laterales son destruidas. En general el crecimiento de la planta se retrasa y las hojas se vuelven amarillas y caen.

Además expresa que en ocasiones, si las condiciones climáticas son las idóneas, la planta puede llegar a recuperarse y producir una cosecha bastante buena; aunque en la mayoría de los casos mueren (Agrios, 1999). Esta enfermedad se ve favorecida por temperaturas bajas (18-20 °C), pero el estrés hídrico y térmico sufrido por las raíces también influyen en la enfermedad.

PODREDUMBRE DEL CUELLO

En las plantas infectadas por *Fusarium*, éstas se marchitan y mueren debido a que la base del tallo (cuello) se pudre. Las lesiones aparecen en el tallo a nivel de la superficie del suelo o por debajo de ella, a modo de manchas rojas o de color rosa, y en ocasiones se observa un chancro oscuro. Estas lesiones se producen de fuera hacia adentro, y es frecuente que no afecten a la parte interna del tallo, aunque a veces, en secciones longitudinales del tallo, se aprecia necrosis vascular desde la base hasta unos 50 cm como máximo, y parte de la médula oscura (Aparicio *et al.*, 1991).

PODREDUMBRE DE BULBOS, CORMOS Y TUBÉRCULOS

García (2010) describe que las pudriciones de bulbos, cormos y tubérculos son originadas por *Fusarium* en el campo y durante el almacenamiento. Son enfermedades comunes en plantas como la cebolla, el lirio y el gladiolo. La pudrición suele comenzar en las superficies sanas de los bulbos, cormos o tubérculos, pero con frecuencia se inician en las heridas, o en las raíces dañadas. Los bulbos o cormos invadidos a primera vista no suelen mostrar los síntomas externos de la enfermedad, aunque es común que la placa basal y las escamas carnosas, así como las raíces, adquieran una tonalidad café previa a la muerte.

Las hojas de las plantas se vuelven amarillas, después adquieren color púrpura o café y mueren prematuramente. En los tubérculos aparecen pequeñas manchas café que en poco tiempo se extienden y hunden. Finalmente, porciones del tubérculo o todo éste son destruidas por el hongo y se transforma en una masa dura y momificada, a menos que estén húmedas y sean invadidas por las bacterias de las podredumbres blandas (Agrios, 1999).

ENFERMEDADES DE POSCOSECHA

El género *Fusarium* produce los “mohos amarillos o rosados” en plantas de ornato y hortalizas. En naranjas y limones, que se almacenan durante mucho tiempo, ocasiona la podredumbre café. En la mayoría de los casos la contaminación se produce en el campo antes o durante la cosecha, aunque también puede desarrollarse en el transcurso del almacenamiento. Al principio, los tejidos afectados se ablandan y, a medida que se extiende la infección, las áreas putrefactas se hunden y aparece sobre ellas un penacho de pelo blanquecino, rosa o amarillento del moho. En el caso del tomate y cucurbitáceas, la infección se desarrolla con mayor rapidez (Agrios, 1999).

2.3.2 *Macrophomina sp.*

Es una enfermedad de alto riesgo para la producción (Díaz, 1993, citado por Díaz *et al.*, 2008). Se presenta principalmente en las regiones tropicales y subtropicales. Este hongo infecta un amplio rango de plantas cultivadas y silvestres (Songa 1996 citado por Williams *et al.*, 2009).

Macrophomina phaseolina es un agente causal de la pudrición carbonosa, es un hongo patógeno con un amplio intervalo de hospedantes que ocurre en regiones con climas variados, desde áridos hasta tropicales, en todo el mundo. En México, se ha observado que *M. phaseolina* causa daños significativos, principalmente en frijol común, ajonjolí, sorgo y soya. En el caso del frijol común, la pudrición carbonosa ataca particularmente en condiciones de sequía

y de altas temperaturas durante ciertas etapas del crecimiento del cultivo, en regiones áridas (Díaz 1992 citado por Mayek *et al.*, 2002).

Macrophomina phaseolina sobrevive como microesclerocios en el suelo y en restos de plantas infectadas. El microesclerocios sirve como la principal fuente de inóculo y puede persistir en el suelo hasta tres años. Son de color negro, esféricos a las estructuras alargadas que se producen en el tejido receptor y publicado en el suelo cuando decae la planta infectada. Estas estructuras multicelulares permiten la persistencia del hongo en condiciones adversas, tales como los bajos niveles de nutrientes del suelo y la temperatura por encima de 30 °C. Las semillas también pueden transmitir el hongo en su cubierta, cuando está infectada no germinan o produce plántulas que mueren poco después de la emergencia (Dhinga, 1977).

Los síntomas del marchitamiento causado por *M. phaseolina* se presentan como una lesión que se inicia en la planta a nivel del suelo por debajo de éste, para extenderse luego hasta las ramas, en las ramas viejas se forman lesiones similares a chancros que luego se alargan y presentan corpúsculos diminutos de color negro que corresponden a picnidios y esclerocios del hongo. Muchas plantas mueren sin llegar a producir y quedan reducidas en su tamaño (Jaramillo *et al.*, 1983 citado por Navarrete, 2000).

2.3.2.1 ENFERMEDADES CAUSADAS POR *Macrophomina sp.*

PUDRICIÓN DE LA RAÍZ

El agente causante de esta enfermedad es *Macrophomina phaseolina* (tasis) goidanich. Goid. Otros nombres que tiene esta enfermedad en América latina son: pudrición gris del tallo, mancha ceniza del tallo, pudrición carbonosa de la raíz, tizón cenizo del tallo y podredumbre carbonosa. Este ocasiona daños importantes al frijol y otros cultivos (Fernández *et al.*, 2004).

SINTOMATOLOGÍA

Generalmente los síntomas aparecen cuando el micelio o los esclerocios presentes en el suelo germinan e infectan los tallos de las plántulas o base de los cotiledones en desarrollo. El hongo produce chancos negros de bordes muy definidos, los cuales con frecuencia presentan anillos concéntricos. El meristemo apical puede morir o el tallo puede quedarse (Azpíroz, 2000).

Por otro lado la infección en plantas adultas puede causar atrofiamiento, clorosis, defoliación prematura, descomposición de la raíz y del hipocótilo y finalmente la muerte de la planta. La infección es a menudo más severa en una parte de la planta; las lesiones se vuelven grises y frecuentemente contienen picnidios negros o esclerocios, signos estos del patógeno. Condiciones de humedad moderada a baja y temperatura moderada a alta favorecen el desarrollo de la enfermedad (Jaramillo *et al.*, 1983, citado por Navarrete, 2000).

CAPÍTULO III. DESARROLLO METODOLÓGICO

3.1 UBICACIÓN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Superior Politécnica Agropecuaria de Manabí Manuel Félix López, ubicada en el sitio El Limón, situado geográficamente entre las coordenadas 0°49'23" Latitud Sur; 80°11'01" Longitud Oeste y una altitud de 15 msnm^{1/}.

3.2 DURACIÓN DEL ESTUDIO

El trabajo de investigación se llevó a cabo desde agosto del 2013 hasta agosto del 2014.

3.3 FACTORES EN ESTUDIO

- a) Hongos celulolíticos
- b) Hongos fitopatógenos

3.4 NIVELES

A. Cepas de hongos celulolíticos.

- A.O-1
- A.O-2
- A.O-3
- A.O-5
- A.O-6
- A.O-8
- A.Q-8
- R.C-3

^{1/}. Estación meteorológica de la ESPAM-MFL (2010). Ubicación geográfica proporcionada por el Instituto Nacional de Meteorología e Hidrología.

B. Hongos fitopatógenos

- *Fusarium sp.*
- *Macrophomina sp.*

3.5 TRATAMIENTOS

La combinación de los niveles de los factores en estudio da como resultado los siguientes 16 tratamientos.

Cuadro 3.1. Tratamientos

N°	Tratamientos
1	A.O-1 + <i>Fusarium sp.</i>
2	A.O-1 + <i>Macrophomina sp.</i>
3	A.O-2 + <i>Fusarium sp.</i>
4	A.O-2 + <i>Macrophomina sp.</i>
5	A.O-3 + <i>Fusarium sp.</i>
6	A.O-3 + <i>Macrophomina sp.</i>
7	A.O-5 + <i>Fusarium sp.</i>
8	A.O-5 + <i>Macrophomina sp.</i>
9	A.O-6 + <i>Fusarium sp.</i>
10	A.O-6 + <i>Macrophomina sp.</i>
11	A.O-8 + <i>Fusarium sp.</i>
12	A.O-8 + <i>Macrophomina sp.</i>
13	A.Q-8 + <i>Fusarium sp.</i>
14	A.Q-8 + <i>Macrophomina sp.</i>
15	R.C-3 + <i>Fusarium sp.</i>
16	R.C-3 + <i>Macrophomina sp.</i>

3.6 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

Diseño Experimental.- Para la primera etapa del experimento se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con tres replicas.

Esquema del análisis de varianza

Cuadro 3.2. Esquema de análisis de varianza

ADEVA	
Fuente de variación	Grados de libertad
Total	47
Tratamientos	15
Error	32

Pruebas funcionales

Coeficiente de variación.- que indica la variabilidad existente entre los resultados de las distintas variantes. Se aplicaron a todas las variables y se expresaron en porcentaje.

Prueba de comparación de medias.- que permitió categorizar las diferencias significativas entre los tratamientos, se realizó Tukey al 0.05 % de probabilidad de error.

3.7 MANEJO DEL EXPERIMENTO

3.7.1 CRECIMIENTO IN VITRO DE HONGOS CELULOLÍTICOS

Para esta actividad se usaron las cepas de los hongos celulolíticos aislados y purificados, pertenecientes al cepario del laboratorio de Biología Molecular de la ESPAM MFL.

Se repicaron las cepas de los hongos celulolíticos colocando un disco de 4 mm de diámetro en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a 25 °C, a los que se les midió diariamente el diámetro de crecimiento miceliar en mm/día, con la ayuda de un calibrador pie de rey hasta que alcanzaron los bordes de la caja Petri.

3.7.2 CRECIMIENTO IN VITRO DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Para esta actividad se usaron las cepas aisladas y purificadas de los hongos fitopatógenos *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* pertenecientes al departamento de protección vegetal de la EETP de INIAP.

Se repicaron las cepas de los hongos fitopatógenos colocando un disco de 4 mm de diámetro en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) a 25 °C, a los que se les midieron diariamente el diámetro de crecimiento micelial en mm/día con la ayuda de un calibrador pie de rey hasta que alcanzaron los bordes de la caja Petri.

3.7.3 CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LOS HONGOS CELULOLÍTICOS FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.* A NIVEL *in vitro*

Se confrontaron cada uno de los hongos celulolíticos contra cada una de los patógenos, colocándose en un extremo de la caja Petri un disco de agar de 4 mm de diámetro con micelio del hongo celulolítico y en el extremo opuesto otro disco de 4 mm con micelio del patógeno, a una distancia de 5 mm aproximadamente entre ellos, posteriormente se incubaron bajo las mismas condiciones, y se realizaron evaluaciones diarias durante diez días.

DATOS EVALUADOS

- **CAPACIDAD ANTAGÓNICA**

La capacidad antagónica de las cepas se evaluaron de dos formas: se midió el grado de micoparasitismo y la competencia por nutrientes y espacios, según el porcentaje de inhibición de crecimiento radial.

- **GRADO DE MICOPARASITISMO**

Este dato se evaluó de acuerdo a la escala de capacidad antagónica (Cuadro 3.3) propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004).

Cuadro 3.3. Escala para evaluación de la capacidad antagónica

Escala	Capacidad antagónica
1	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
2	Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
3	Invasión de ½ de la superficie de la colonia hongo patógeno.
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno.
5	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno (esporulación sobre ella).

- **PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL**

Para la toma de este dato se empleó la fórmula propuesta por Ezziyyani *et al.* (2004) que consiste en $PICR = (R1 - R2)/R1 \times 100$, donde R1 es el radio mayor (radio patógeno testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en enfrentamiento con el antagonista).

3.7.4 ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LOS HONGOS CELULOLÍTICOS SELECCIONADOS FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.* A TRAVÉS DE COCULTIVOS EN MEDIO LÍQUIDO

Para esta segunda etapa del experimento se seleccionó la cepa del experimento anterior que demostró la mejor capacidad antagónica y se mezcló por separado con *Fusarium sp.* y *Macrophomina sp.* en Erlenmeyer que contuvieron 90 mL de caldo papa dextrosa. Estos cocultivos fueron inoculados a partir de cultivos frescos de cada cepa en PDA por 72 h a 30 °C en incubadoras hasta que estas estuvieron totalmente esporuladas, las cuales se homogenizaron con 10 mL de solución salina para una concentración de 6 Log UFC.mL⁻¹. Se realizaron estos ensayos a las 48, 72, 96 h contra ambos patógenos y se efectuó el conteo de las

UFC a través del método de las diluciones seriadas (hasta -1, -2, -3) y el conteo en placas con medio PDA, donde se utilizaron contador de colonias las que se incubaron a 30 °C por 72 h.

3.7.5 CONTROL BIOLÓGICO DE LA CEPA SELECCIONADO FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.* EN PLANTAS DE PIMIENTO INFECTADAS

Con la cepa del hongo celulolítico que demostró la mejor capacidad antagónica en las anteriores evaluaciones se procedió a realizar el control biológico en plantas de pimiento infectadas con *Fusarium* y *Macrophomina*.

El vivero donde se cumplió esta actividad fue de una estructura de caña guadua anclada al suelo, en la que reposa una cubierta de caña picada sobre la cual descansa un plástico flexible. Las dimensiones son de 3 m de ancho por 5 m de largo, 3,5 m de alto en su parte media y 2,5 m de alto en sus partes laterales. Tiene soportes bien distribuidos para colocar las bolsas sembradas, con pasadizos para permitir el libre acceso y facilitar el trabajo.

3.7.5.1 TRATAMIENTOS

- Hongo celulolítico + *Fusarium sp.*
- Planta + *Fusarium sp.*
- Hongo celulolítico + Planta
- Planta sin inóculo
- Hongo celulolítico + *Macrophomina sp.*
- Planta + *Macrophomina sp.*
- Hongo celulolítico + Planta
- Planta sin inóculo

3.7.5.2 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL

Diseño Experimental.- Se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cuatro replicas.

Esquema del análisis de varianza

Cuadro 3.4. Análisis de varianza
ADEVA

Fuente de variación	Grados de libertad
Total	31
Tratamientos	7
Error	24

Pruebas funcionales

- Coeficiente de variación: que indicaron la variabilidad existente entre los resultados de las distintas unidades experimentales. Se aplicó a todas las variables y se expresó en porcentaje.
- Prueba de comparación de medias: que permitió categorizar las diferencias significativas entre los tratamientos. se empleó Tukey al 0,05 % de probabilidad.

Manejo del experimento

a. Preparación del sustrato

El sustrato se preparó con tierra, materia orgánica (cascarilla de arroz) en una relación 3:1, el uso de materia orgánica se lo hizo con la finalidad de que los hongos puedan tener las condiciones alimenticias necesarias para desarrollar su crecimiento y formación de estructuras reproductivas. El sustrato se homogenizó y

se llenó en fundas plásticas de polietileno transparentes en una cantidad aproximada de 1,5 kg/ funda.

b. Esterilización

Una vez envasadas las fundas con el sustrato se procedió a llevar a la autoclave donde se esterilizaron a 15 lb de presión por 20 min.

c. Llenado de fundas

Una vez esterilizado el sustrato se llenaron las fundas plásticas (20 cm de largo x 12,5 cm de ancho), de color oscuro.

d. Preparación del inóculo

1. De los cultivos puros de los hongos celulolíticos y fitopatógenos se extrajeron un disco de 4 mm de diámetro con agar y estructuras miceliales y se colocó en la caja Petri para su desarrollo.
2. Esterilización de agua en autoclave por 20 min y 121 °C.
3. Cuando los hongos se desarrollaron hasta formar colonias notables (aproximadamente 7 días después del repique), con el uso de una asa de platino esterilizada se provocó el desprendimiento de estructuras fúngicas empleando 20 mL de agua estéril por cada caja Petri llena de micelio.
4. Esta solución se mezcló con 200 mL de agua estéril y de esta manera se obtuvo cada solución de inóculo por cepa objeto de estudio.

e. Inoculación

Se procedió a inocular el sustrato contenido en las fundas con 20 mL de inóculo del hongo celulolítico y 20 mL del fitopatógeno, posteriormente se cubrieron con fundas de plástico transparente de la medida 6 x 10 cm para provocar el efecto de una cámara húmeda y acelerar la reproducción y multiplicación de los

microorganismos. Luego de 72 horas de la inoculación se procedió a retirar las fundas.

f. Siembra

Luego de la inoculación e incubación de los hongos se procedió a sembrar las semillas de pimiento (recicladas).

g. Riego

Se realizaron cada dos días durante el tiempo que se desarrolló la investigación con agua esterilizada, para evitar agentes contaminantes externos.

3.8 DATOS EVALUADOS EN EL CULTIVO

Altura de planta (cm): este dato se registró cada 7 días, se midió la altura de la planta con una cinta métrica desde la base del tallo hasta el extremo de la última hoja.

Masa del follaje (g): a los 30 días de desarrollo de la planta; el peso de la masa foliar fue tomado en estado fresco. Para la obtención del peso seco este follaje fue introducido en una estufa a 55 grados por 15 minutos con la finalidad de eliminar la humedad. Para registrar este valor, se empleó una balanza de precisión.

Masa radicular (g): después de ser lavadas las raíces se pesaron en una balanza de precisión, este dato fue reportado en estado fresco y seco. Para la obtención del peso seco la raíz fue introducida en la estufa a 55 grados por 15 minutos con el propósito de reducir los niveles de humedad.

Incidencia de la enfermedad: cada 7 días se realizó un conteo del número de plantas marchitas, este valor fue expresado en porcentaje de plantas muertas en

relación con el número total de plantas de cada unidad experimental, como se indica en la siguiente expresión:

% Incidencia= Número de plantas marchitas/ número total de plantas por 100

$\% I = n. p.m./n.t.p.x10.$

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CAPACIDAD ANTAGÓNICA DE LOS HONGOS CELULOLÍTICOS FRENTE A LOS HONGOS FITOPATÓGENOS *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.* A NIVEL *in vitro*

La capacidad antagonica *in vitro* de las cepas en estudio presentaron diferencias estadísticas ($p < 0.001$) en todas las evaluaciones realizadas. En el cuadro 4.1 se observa que las cepas R.C-3; A.O-1 y A.O-6 presentaron igualdad estadística, el mismo que se mantuvo en todas las evaluaciones. La cepa R.C-3 obtuvo 61,48; 60 y 60 %; la A.O-1 con 61,48; 60,37 y 60,37 %; y, A.O-6 con 63,7; 62,59 y 62,22 % en cada evaluación respectivamente. El tratamiento A.O-3 obtuvo los menores valores obteniendo 38,15 % en la primera evaluación y 16,3 y 11,11 % en la segunda y tercera evaluación.

Con estos datos se tiene indicios fuertes del antagonismo de las cepas en estudio frente a *Macrophomina*. Pineda y Gonnella (1988) al confrontar *Aspergillus* y *Trichoderma* contra *M. phaseolina* observaron capacidad para inhibir el desarrollo y la producción de esclerocios del patógeno *in vitro*.

Cuadro 4. 1 Porcentaje de inhibición radial de *Macrophomina*

Tratamientos	Evaluaciones (días)		
	3	6	9
A.O-1	61,48 a	60,37 a	60,37 a
A.O-2	36,67 b	35,93 bc	34,44 b
A.O-3	38,15 b	16,30 c	11,11 c
A.O-5	52,22 ab	51,48 ab	51,48 ab
A.O-6	63,70 a	62,59 a	62,22 a
A.O-8	54,44 ab	55,19 ab	51,48 ab
A.Q-8	51,11 ab	51,11 ab	51,11 ab
R.C-3	61,48 a	60,00 a	60,00 a
Probabilidad	0,001	<0,001	<0,001
Error estándar	4,07	4,32	4,5

a, b, c Letras diferentes en una misma columna indica diferencias estadísticas según Tukey 0,05.

Entre las investigaciones relacionadas se tiene que Reyes *et al.* (2011) encontraron que cepas de *Bacillus* inhibieron a *Macrophomina*, con un promedio 38,1 %. Así mismo Sosa *et al.* (2012) al evaluar *in vitro* 13 cepas del genero *Bacillus* todas presentan inhibición a *Macrophomina phaseolina* con porcentajes desde 48 a 73,7 % (Cuadro 4.1).

Para el caso de *Fusarium* los porcentajes de inhibición fueron superior a los 70 % en la mayoría de casos. Algunas cepas mantuvieron su porcentaje mostrado con *Macrophomina* y otras aumentaron su capacidad antagónica con respecto a *Macrophomina*. Por lo que es posible que la actuación de una cepa tenga relación directa con el patógeno.

En el cuadro 4.2 se observa que la cepa con mayor porcentaje de crecimiento de inhibición radial fue A.O-1 en todas las evaluaciones con 81,11 y 80 %.

Cuadro 4. 2. Porcentaje de inhibición radial de *Fusarium*

Tratamientos	Evaluaciones (días)		
	3	6	9
A.O-1	81,11 a	80,00 a	80,00 a
A.O-2	68,89 ab	68,15 abc	68,15 abc
A.O-3	68,15 ab	67,41 abc	66,37 abc
A.O-5	71,37 ab	66,67 abc	66,67 abc
A.O-6	62,22 b	58,15 c	51,11 c
A.O-8	61,11 b	48,89 bc	56,67 bc
A.Q-8	71,48 ab	70,74 abc	70,74 ab
R.C-3	74,07 ab	72,96 ab	27,04 bc
Probabilidad	0,003	0,0015	0,0014
Error estándar	2,83	2,92	3,69

a, b, c, letras diferentes en una misma columna indicas diferencias estadísticas según Tukey 0,05.

Los menores promedios fueron variables en cada evaluación y no coincidió con lo ocurrido en *Macrophomina*. La cepa R.C-3 presento el menor promedio en la tercera evaluación, después de haber alcanzado un promedio superior al 70 % en las anteriores evaluaciones descendió a 27,04 %. Lo que hace presumir que la competencia por alimento y sobrevivencia de ambos patógeno la gano el

Fusarium. Otra cepa se notó similar comportamiento fueron la A.O-8 y A.O-6 aunque con menor descenso (Cuadro 4.2).

Los porcentajes encontrados fueron superiores a los reportados por Suarez *et al.* (2008) que al evaluar 12 cepas de *Trichoderma* (comercial y nativo) todas presentaron inhibición con porcentajes no mayores al 71 %. Por otro lado (Michel *et al.*, 2001 y Michel *et al.*, 2005), que al evaluar el efecto antagónico de aislados nativos de *Trichoderma spp.*, sobre el crecimiento del micelio y potencial reproductivo de *F. oxysporum* y *F. subglutinans*, los valores máximos de inhibición fueron del 47,6 %. Arzate *et al.* (2006), al evaluar a *Trichoderma spp.*, sobre *Mycosphaerella fijiensis*, seleccionaron 6 de 25 aislados que inhibieron al menos el 45 % el crecimiento del micelio del fitopatógeno.

Sin embargo, en estudios de antagonismos de *Trichoderma* con otros patógenos se han encontrado porcentajes del orden de 80 % (Michel *et al.*, 2008). Por lo antes expuesto no es raro encontrar una alta variabilidad de antagonismo de cepas de diferentes o igual géneros o especies.

Al evaluar las cepas por la metodología de Ezziyyani *et al.* (2004) se encontró cierta variación con respecto al porcentaje de inhibición radial (Cuadro 4.3). Es necesario mencionar que en este caso se evalúa visualmente la invasión del antagonista sobre el patógeno. Para el caso de *Macrophomina* la mayoría de cepas no se identifica ninguna invasión por parte del antagonista. La cepa A.O-5 y R.C-3 en la primera evaluación presentan $\frac{1}{4}$ de invasión, sin embargo, solamente la cepa A.O-5 aumenta su invasión en las siguientes evaluaciones llegando a la invasión total (Anexo 1, foto 1).

En *Fusarium* se tuvo similar comportamiento, acentuando la acción de la cepa A.O-5 sobre el patógeno presentado en *Macrophomina*, la misma que fue creciendo progresivamente hasta finalmente lograr la invasión total y esporulación sobre ella. Las demás cepas no presentaron invasión ninguna (Cuadro 4.3) (Anexo 1, foto 2).

Cuadro 4. 3. Evaluación cualitativa de la capacidad antagonica contra *Macrophomina*

Tratamientos	Evaluaciones		
	3 días	6 días	9 días
A.O-1	1	1	1
A.O-2	1	1	1
A.O-3	1	1	1
A.O-5	1-2	2	5
A.O-6	1	1	1
A.O-8	1	1	1
A.Q-8	1	1	1
R.C-3	1-2	1	1

Suarez *et al.* (2008) encontraron un parasitismo variable que en algunas cepas también llegaron a la esporulación del antagonista sobre el patógeno. Sin embargo, se debe rescatar que la mayoría de las cepas tuvieron la mitad de la superficie cubierta de parasitismo, siendo consistente con la evaluación del porcentaje de inhibición radial. Al contrario de lo encontrado en esta investigación donde la inhibición radial no concordó con el parasitismo ya que la mayoría de cepa solo llego a $\frac{1}{4}$ de la superficie del patógeno cubierta.

Cuadro 4. 4. Evaluación cualitativa de la capacidad antagonica contra *Fusarium*

Tratamientos	Evaluaciones		
	3 días	6 días	9 días
A.O-1	1	1	1
A.O-2	1	1	1
A.O-3	1	1	1
A.O-5	1-2-3	4-5	5
A.O-6	1	1	1
A.O-8	1	1	1
A.Q-8	1	1	1
R.C-3	1	1	1

Hoyos *et al.* (2008) al evaluar *Trichoderma* de diferentes especie frente a *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani* obtuvieron un 100 % de micoparasitismo (totalidad de la superficie cubierta por el antagonista) en la gran mayoría de las cepas (Cuadro 4.4).

4.2 ACTIVIDAD ANTAGÓNICA DE LOS HONGOS CELULOLÍTICOS SELECCIONADOS FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.* A TRAVÉS DE COCULTIVOS EN MEDIO LÍQUIDO

Con los datos y observaciones realizados en la evaluación anterior se toma la decisión de evaluar a la cepa A.O-5 en medio líquido como cocultivo, con los patógenos *Macrophomina* y *Fusarium*. El gráfico 4.1 muestra el crecimiento de la cepa A.O-5 y *Fusarium* tanto en cultivos aislados como en cocultivo. El crecimiento del patógeno es progresivo en el cultivo aislado sin el antagonista, pero al cultivarlo con el antagonista este interrumpe el crecimiento del patógeno a las 96 horas similar a lo reportado por Fernández y Suárez (2009) quienes encontraron una inhibición a los cuatro días.

Es probable que la cepa A.O-5 actúe a partir de las 72 horas debido a la competencia generada por la escasez de alimento y su máximo poder antagonista lo muestre en esta necesidad. Además, no hay que dejar de lado la posible resistencia del patógeno en las primeras horas. La cepa A.O-5 tanto en cultivo aislado como en cocultivo tiene el mismo comportamiento con un pico máximo en 72 horas y un pequeño descenso a las 96 horas. Similar comportamiento encontró Fernández y Suárez (2009) al evaluar cepas de *Trichoderma* como antagonista de *F. oxysporum* (Anexo 2, foto 4).

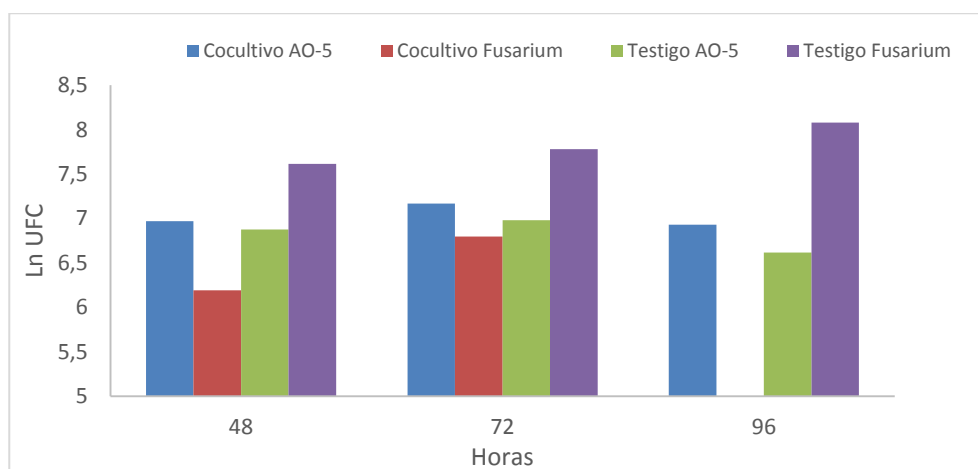


Gráfico 4.1. Actividad antagonista de la cepa A.O-5 frente a *Fusarium* en cocultivo medio líquido.

A diferencia del *Fusarium*, *Macrophomina* desde el inicio presenta una tendencia a disminuir al cultivarla con el antagonista, coincidiendo en ambos patógenos que a las 96 horas sucede la eliminación total. Es posible que este patógeno sea más susceptible a la acción de microorganismos antagonistas. Aunque, al cultivarlo solo, presenta a las 72 h una disminución para luego aumentar su crecimiento, de manera que al tomar en cuenta este comportamiento propio del patógeno, se puede decir que el antagonista actuó mayormente al momento que el patógeno estuvo más susceptible (Anexo 2, foto 3).

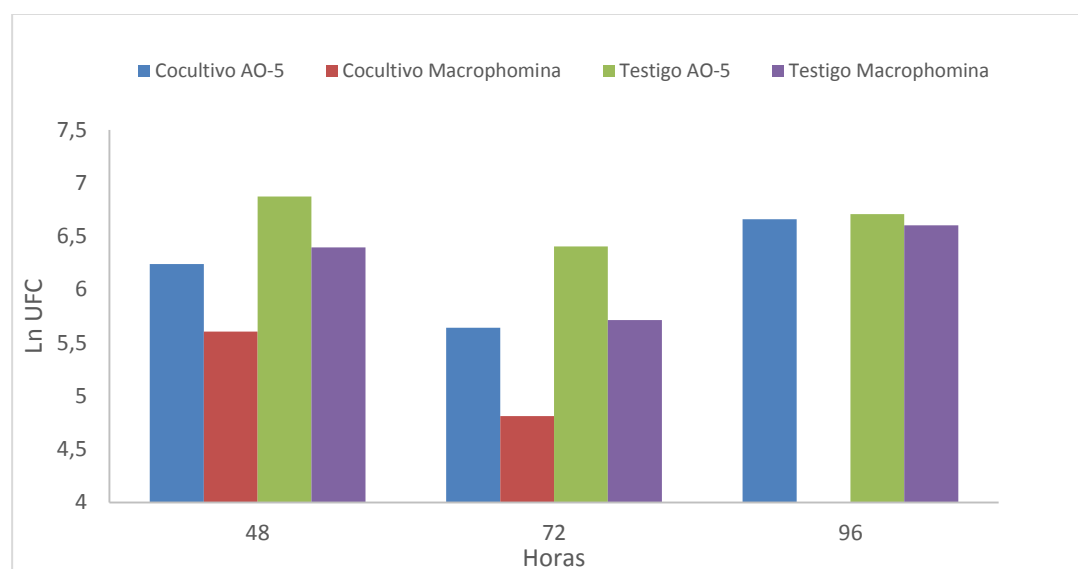


Gráfico 4.2. Actividad antagonista de la cepa A.O-5 frente a *Macrophomina* en cocultivo medio líquido.

4.3 CONTROL BIOLÓGICO DE LA CEPA DE HONGO CELULOLÍTICO, SELECCIONADO, FRENTE A *Fusarium sp.* Y *Macrophomina sp.* EN PLANTAS DE PIMIENTO INFECTADAS CON ESTOS PATÓGENOS

La altura de planta del pimiento se vio influenciada ($p < 0.05$) por los tratamientos en estudio a los 21 y 28 días después de la siembra. Inicialmente no se manifiesta diferencias estadísticas ($p = 0.1$), los promedios estuvieron

entre 4,07 y 5,54 cm, siendo el de mayor promedio el tratamiento *Fusarium* + planta. A los 14 días se mantiene la no diferencia estadística ($p=0.2$) con valores entre los 7,54 y 9,6 cm este último correspondiente al testigo.

A los 21 días se observa la influencia del *Fusarium* en el crecimiento de la planta puesto que presenta la menor altura a diferencia de la evaluación realizada a los 7 días donde obtuvo el mayor crecimiento. Esta tendencia se mantuvo también en los 28 días. Siendo mayor al incluir la cepa antagonista para el control de *Fusarium*, sin embargo, inferior al testigo (sin inoculación de microorganismo). Lo que ratifica la acción de la cepa A.O-5 en el control de *Fusarium* no solo en *in vitro* sino a nivel de vivero. Aunque al inocular la cepa A.O-5 en la planta sin patógeno presenta los menores valores después de *Fusarium* + planta.

Este hecho podría ser visto como la necesidad de aplicar un agente antagonista, siempre que haya un patógeno presente o al menos que se proyecte su presencia en el transcurso del cultivo (Cuadro 4.5).

Cuadro 4. 5. Promedio de la variable altura de planta de pimiento (cm)

Tratamiento	Días			
	7	14	21	28
<i>Fusarium</i> + Planta	5,54	8,79	12,32 b	15,21 b
A.O-5 + Planta	5,14	8,55	13,93 ab	17,48 ab
<i>Macrophomina</i> + A.O-5+Planta	4,18	8,79	15,92 ab	21,40 a
<i>Macrophomina</i> + Planta	4,8	8,79	17,51 a	21,83 a
<i>Fusarium</i> + A.O-5+ Planta	4,07	7,54	13,68 ab	20,63 ab
TESTIGO	5,29	9,6	15,78 ab	21,32 a
Probabilidad	0,1	0,2	0,013	0,012
Error Estándar	0,35	0,53	0,94	1,33

a, b letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas según Tukey 0.05.

Macrophomina no presenta el mismo comportamiento que *Fusarium*, puesto que con o sin el antagonista tuvo similares promedios. Esto podría estar en función de la susceptibilidad o resistencia de la planta a este patógeno. Por otro

lado la agresividad del propio patógeno también sería un factor a tomar en cuenta.

El análisis del peso del follaje y raíz tanto seco como húmedo presenta diferencias estadísticas ($p < 0.001$). El peso del follaje húmedo fue menor cuando la planta estaba en presencia de *Fusarium* o la cepa A.O-5. El efecto provocado por el *Fusarium* en la altura de la planta en los últimos días de evaluación (28 días) se acentuó en el peso del follaje, con una disminución de alrededor del cincuenta por ciento con respecto al testigo.

Así mismo se observa que la relación *Fusarium*+A.O-5 en la planta no afecta el desarrollo de la misma, obviamente la acción del antagonista es evidente. Para el caso de *Macrophomina*, no presenta cambios, la posibilidad de la agresividad de *Macrophomina* puede ser determinante, conociendo que este tipo de patógeno se lo relaciona con especie como la soya, frejol, maíz, sorgo (Hernández *et al.*, 2009).

En el peso seco del follaje se mantiene la diferencia entre los mismos tratamientos. (Pineda, 2001) encontró que al aplicar gránulos de arcilla con solución de sacarosa y *Trichoderma harzianum* en la semilla de ajonjolí reduce significativamente el porcentaje de la enfermedad producida por *M. phaseolina*, sin embargo, Cardona (2006) no evidencio la reducción de la enfermedad (Cuadro 4.6).

Cuadro 4. 6. Promedio de las variables peso seco y húmedo tanto en la raíz y el follaje

Tratamiento	Variables			
	P.H.FO	P.S.FO	P.H.R	P.S.R
<i>Fusarium</i> + Planta	1,71 b	0,27 c	0,98 c	0,28 ab
A.O-5 + Planta	2,32 c	0,73 b	1,47 b	0,38 a
<i>Macrophomina</i> + A.O-5+Planta	4,0 ab	1,21 a	1,46 b	0,2 b
<i>Macrophomina</i> + Planta	4,0 ab	1,07 a	1,98 a	0,2 b
<i>Fusarium</i> + A.O-5+Planta	4,04 a	1,05 a	1,7 ab	0,39 a
Testigo	3,57 b	1,14 a	1,53 b	0,35 a
Probabilidad	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Error estándar	0,1	0,06	0,08	0,02

a, b, c, letras diferentes en una misma columna indican diferencias estadísticas según Tukey 0,05. P.H.FO=Peso húmedo del follaje; P.S.FO= Peso seco del follaje; P.H.R= Peso húmedo de la raíz; P.S.R=Peso seco de la raíz.

En la raíz se aprecia que el *Fusarium* se aleja estadísticamente de los demás tratamientos y la cepa A.O-5 presenta un promedio más cercano a los demás tratamientos, este hecho sugiere que *Fusarium* causa daños al follaje y raíz.

La elección promisorio de la cepa A.O-5 al parecer fue correcta, aunque no hay que dejar de lado que usualmente la actividad antagónica *in vitro* constituye un indicativo inicial de su promisorio actividad biológica contra hongos fitopatógenos (Hoyos *et al.*, 2008). En muchos casos existen inconsistencia de los datos *in vitro* y campo (invernadero o vivero) (Carsolio *et al.*, 1999), que posiblemente se hubieran encontrados si se evaluaban todas las cepas, así mismo, otras cepas probablemente tendrían el mismo comportamiento de la A.O-5.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

En base a los resultados se concluye lo siguiente:

- Todas las cepas de hongos celulolíticos evaluadas ejercieron inhibición radial frente a los patógenos.
- En la evaluación cualitativa del parasitismo solamente la cepa A.O-5 presenta un cubierto total y esporulación sobre el patógeno.
- La cepa A.O-5 en cocultivo en medio líquido inhibe el desarrollo de *Fusarium* y *Macrophomina* a las 96 horas de incubación.
- A nivel de vivero la cepa A.O-5 también muestra su capacidad antagónica frente a los patógenos *Fusarium* y *Macrophomina*.

5.2 RECOMENDACIONES

Se recomienda lo siguiente:

- Seguir evaluando a la cepa A.O-5 en campo con cultivos establecidos.
- Realizar estudio de antagonismo de la cepa A.O-5 con otros patógenos de los cultivos de la zona.
- Identificar molecularmente a la cepa A.O-5.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios GN. 1999. Fitopatología. Ed. Limusa. México. p. 425- 440
- Aparicio, Salmerón; Rodríguez, MD; Gómez, V; Sáez, Belda; Casado, E; Lastres, J. 1991. Plagas y enfermedades del tomate en la provincia de Almería: Control Racional. (En línea). Consultado el 22 de enero de 2015. Formato (PDF).
- Arístegui, B. 2002. El reino de los hongos. Revista Iberoamericana de Micología. p. 1-4.
- Azpíroz,H. 2000. Informe final del Proyecto G027 Evaluación de la resistencia a la roya (*Uromyces appendiculatus*) en poblaciones silvestres y cultivadas de frijol, mediante el empleo de marcadores genéticos moleculares. (En línea).MX. Consultado, 20 de enero de 2015. Formato PDF. Disponible en <http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfG027.pdf>.
- Arzate-Vega, J.; Michel-Aceves, A. C.; Domínguez-Márquez, V. M. y Santos-Eméstica, O. A. 2006. *Antagonismo de Trichoderma spp., sobre Mycosphaerella fijiensis Morelet, agente causal de la sigatoca negra del plátano (Musa sp.) in vitro e invernadero*. MX. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 24. p 98-104.
- Borrego, A. 2014. Las enmiendas orgánicas del suelo en el control de las Fusariosis del espárrago y del tomate. Tesis Doctoral. Córdoba, ES. p 3.
- Borrero, C.; Silva, M. 2005. Efectos de *Trichoderma (in vitro)* en los microorganismos no patógenos descomponedores de la materia orgánica de un suelo oxisol clase IV piedemonte llanero. CO. Revista Orinoquia. Vol. 9. p. 8.
- Cano, E; Carballo, M; Chaput, P; Fernández, O; Gonzales, L; Gruber, A; Guharay, F; Hidalgo, E; Narváez, C; López, J; Rizo, C; Rodríguez, A; Rodríguez, C; Salazar, D. 2004. Control Biológico de Plagas Agrícolas, plaguicidas-aspectos ambientales. 1 ed. Nicaragua p. 232-174
- Cardona R. y Rodriguez H. 2006. Efecto del hongo *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia de la enfermedad carbonosa en ajonjolí. Maracaibo, VE. Revista de la Facultad de Agronomía Vol. 23. p. 42-48.

- Carsolio, C., N. Benhamou, S. Haran, C. Cortez, A. Gutierrez y A. Herrera-Estrella. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Revista Applied and Enviromental Microbiology*. Vol. 65. p. 929-935.
- Castillo, F.; Roldán, M.; Blasco, R.; Huerta, M.; Caballero, F.; Moreno, V.; Luque, M. 2005. Biotecnología ambiental. Madrid, ES. *Revista ARBOR Ciencia, Pensamiento y Cultura*. p 404.
- Dhingra, D. 1977. Una bibliografía anotada de *Macrophomina phaseolina*. 1905-1975. Universidad Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- Díaz, A; Montes, N. 2008. La Fitopatología en la Región Semiárida de Tamaulipas. MX. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 26. N 1. p 65.
- Ezziyyani, M.; Perez, S. C.; Requena, M. E.; Rubio, L. y Candela, M. E. 2004. Biocontrol por *Streptomyces rochei* –Ziyani–, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. ES. *Revista Anales de Biología*. Vol. 26. p. 69-78.
- Fernández R; y 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. Medellín, EC. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* Vol. 62. p. 4743-4748.
- Fernández, O; Larrea, V. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*. 62:96-100.
- Fernández, R; Reyes, M; Medina, M; Hernández, S; Mayek, N. 2004. *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) de Aguascalientes: Relación Patogénica y Genética con Aislamientos de Otras Regiones de México. MX. *Revista Mexicana de Fitopatología*. Vol. 22. N 2.
- Flores, C; San Martin, S; Carrillo, L; Bejarano, N. 2005. Especies de *Fusarium* de la Quebrada de Lozano, Jujuy, AR. *Revista Argentina de Microbiología*. Vol. 37. p. 109
- García, F. 2012. Hongos, generalidades, característica, clasificación. (En línea). Consultado, 22 de ene. 2015. Disponible en <http://www.florgarcia.com/>.
- García, M. 2010. “Especificidad parasitaria y caracterización molecular de *Fusarium proliferatum* (MATSUSHIMA) Nirenberg causante de la podredumbre del bulbo del ajo sobre especies del género *Allium*”. (En

- línea). Consultado el 23 de ene. 2015. Disponible en <http://www.ceigram.upm.es/sfs/otros/ceigram/Beca%20Ceigram%202010Marta.pdf>.
- Guzmán, A.; Zambrano, D.; Rondón, A.; Silva, M.; Pérez, M.; León, R.; Rivera, R. 2014. Aislamiento, selección y caracterización de hongos celulolíticos a partir de muestras de suelo en Manabí-Ecuador. EC. Revista Facultad de Ciencias Agrarias UNCUYO. Vol.46. p. 177-189.
- Hernández, S.; M. H. Reyes; R. Rosales; N. Mayek: 2009. Molecular Markers Associated with Resistenceto *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. in Common Bean. Durando. MX. Revista of Plant Pathology. Vol. 91. p 163-170.
- Hoyos, L; Chaparro, P; Abramsky, M; Chet, I; Orduz, S. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. CO. Revista de Agronomía Colombiana. Vol. 26. p. 451-458.
- Pineda, J; Gonnella E. 1988. Evaluacion del control biológico de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí (*Sesamum indicum* L.). VE. Revista Agronomía tropical. Vol. 38. p. 43-48.
- Martínez, B; Infante, D; Reyes, Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. CU. Revista Protección Vegetal. Vol. 28. p 3.
- Mayek, N; López, C; López, E; Cumpián, J; Acosta, J. 2002. RESISTENCIA A *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. En frijol común en condiciones de campo en México. MX. Revista Agrociencia. Vol. 35. p. 650
- Michel, A. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Euascomycetes: Hypocreales), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes: Hyphales). Doctorado en Ciencias: Área Biotecnología. Universidad de Colima. MX.
- Michel, A. C.; Otero, M. A.; Martínez, R. D.; Rebolledo, O.; Lezama, R. y Ariza, R. 2005. Actividad micoparasítica in vitro de *Trichoderma* Pers.: Fr. spp., sobre *F. subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) P.E. Nelson, T. A. Toussoun y *Marasas* y *F. oxysporum* Schlechtend.: Fr. MX. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 23. p. 253-261.

- Michel, A. C.; Rebolledo, O. y Lezama, R. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mango afectados por “Escoba de bruja” y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. MX. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol.19. p. 154-160.
- Michel, A; Otero, M.; Martínez, R; Ariza, R; Barrios, A; Rebolledo, A. 2008. Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicon esculentum* Mill. MX. Revista de investigación y difusión científica agropecuaria. Vol.12. p. 55-68.
- Navarrete, M. 2000. Nuevos estudios de la biología y causales de la marchitez del pimiento (*Capsicum annum*,L.) en el Valle del Rio Portoviejo. Tesis de Grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ingeniería Agronómica. Portoviejo, Manabí. p 3-8.
- Pineda J. 2001. Evaluación de métodos de aplicación de *Trichoderma harzianum* al suelo para el control de *Macrophomina phaseolina* en ajonjolí. VE. Revista de Fitopatología venezolana. Vol. 14. p. 31-34.
- Reyes A, Ruiz E, Yam C, Dzul M. 2011. Selección de *Bacillus Spp.* con actividad antagónica in vitro contra *Macrophomina Phaseolina* (TASSI) Goid en diferentes medios de cultivo. CU. Revista Fitosanidad. Vol. 15. p. 117-121.
- Roselló, J. 2003. Capacidad antagonista de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatógenos. Estudios ecofisiológicos. Tesis de grado doctoral. Universidad de Valencia. ES. p 4- 26- 38.
- Sandoval, I; López, MO; García, D; Mendoza, I. 1994. *Trichoderma harzianum* (cepa A- 34): un biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y pimiento. Resúmenes IX Forum de Ciencia y Técnica; II Encuentro Nacional de Bioplaguicidas; II Expo-CREE. INISAV. p 73-74.
- Santamarina, MP; Sanz, I; Roselló, J; García, J. 2001. Una cepa de *Trichoderma harzianum* con un fuerte potencial para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos y hongos productores de micotoxinas. Resúmenes del XVIII Congreso de la Sociedad Española de Microbiología. Valencia. ES. p.3.
- SINAVIMO (Sistema Nacional de Vigilancia y Monitoreo de Plagas, AR). 2010. *Fusarium oxysporum* f. sp. cepae. (En línea). Consultado el 23 de enero de

2015. Disponible en <http://www.sinavimo.gov.ar/plaga/fusarium-oxysporum-f-sp-cepae>.
- Sosa, M; Ruiz E, Mejía M, Reyes A, Cristóbal J, Valencia A, Gutiérrez O. 2012. Actividad antagonista in vitro de aislados de la clase *Bacillus* de la península de yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. Universidad y ciencia. Vol. 28. p. 279-284.
- Suárez C L; Fernández, R; Valero O, Gámez, R; Páez, A. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. CO. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. 10. p. 35-43.
- Summerell, BA; Salleh, B; Leslie, JF. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. EE.UU. Revista Plant Disease. Vol. 87 p 117-128.
- Vilches, L. 2002. Determinación de la actividad de exoglucanasas de cepas fúngicas nativas de las provincias de Huaylas y Huaras. Tesis UNMSM. PE. p.4
- Williams, H; Pecina, V; Montes, N; Palacios, O; Arcos, G; Vidal, V. 2009. Reacción de Variedades de Sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para Grano a *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. MX. Revista Mexicana de Fitopatología. (En línea). Vol. 27. N 2.

ANEXOS

Anexo 1: ANTAGONISMO *in vitro*

Foto 1. Esporulaci3n del antagonista A.O-5 sobre la superficie de la colonia de *Macrophomina*



Foto 2. Esporulaci3n del antagonista A.O-5 sobre la superficie de la colonia de *Fusarium*

Anexo 2: ANTAGONISMO EN COCULTIVO

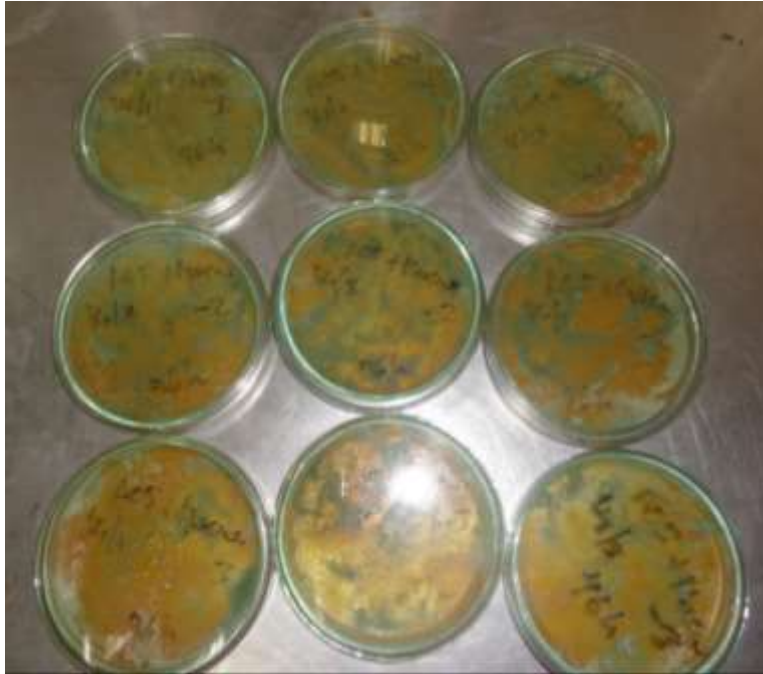


Foto 3. Cepa A.O-5 a las 96 horas en medio líquido ejerciendo total antagonismo frente a *Macrophomina* sp.

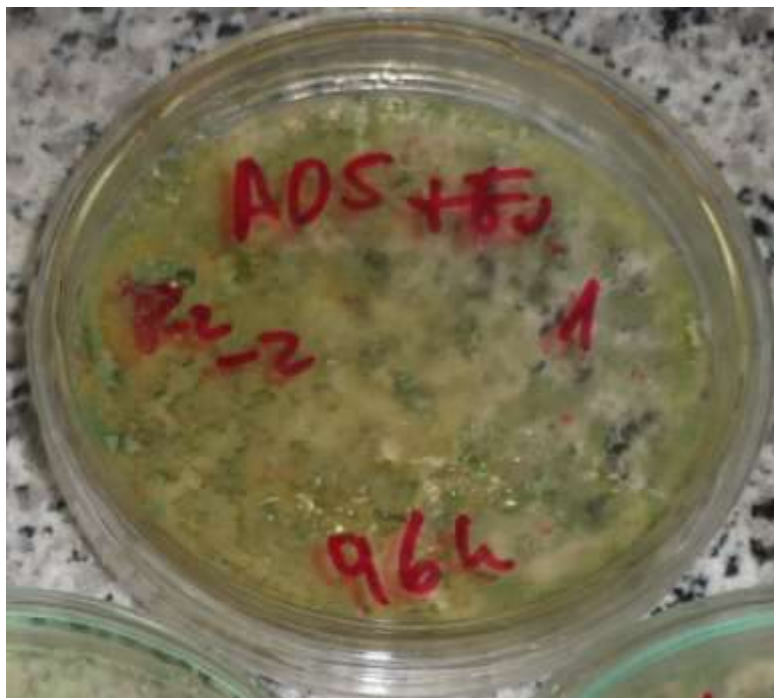


Foto 4. Cepa A.O-5 a las 96 horas en medio líquido ha ejercido total antagonismo frente a *Fusarium* sp.

Anexo 3: ANTAGONISMO EN VIVERO



Foto 5. Acción del antagonista A.O-5 en pantas de pimiento infectadas con *Fusarium*



Foto 6. Plantas de pimiento infectadas con *Fusarium*



Foto 7. Acción del antagonista A.O-5 en plantas de pimiento infectadas con *Macrophomina*



Foto 8. Plantas de pimiento infectadas *Macrophomina*