

# CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DEL HONGO *TRICHODERMA SPP* HACIA *ALTERNARIA SPP* EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea*)



Karen Tatiana Chávez Arteaga  
Hayron Fabricio Canchignia Martínez

**CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DEL HONGO *Trichoderma Spp.* HACIA *Alternaria Spp.* EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (*Brassica oleracea*)**

**Publicado por:** Universidad Técnica Estatal de Quevedo.  
Dir. Av. Quito km 1½ vía a Santo Domingo de los Tsáchilas,  
Quevedo, Ecuador. [www.uteq.edu.ec](http://www.uteq.edu.ec).

**Derechos reservados:** © Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador 2022.  
Dirección de Investigación Ciencia y Tecnología (DICYT).  
Se autoriza la reproducción de esta publicación con fines educativos y otros que no sean comerciales sin permiso escrito previo detentar el derecho de autor, mencionando la cita.

**Cita del libro:** Chávez K. y Canchignia H. 2022. Capacidad biocontroladora del hongo *Trichoderma Spp.* hacia *Alternaria Spp.* en el cultivo de brócoli (*Brassicaceae oleracea*). Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. 81 pp.

**Revisión de Pares Externos:** Víctor Hugo Reynel Chila  
Magister en Gestión Ambiental  
Univerisdad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas

Benito Diomedes Guerrero Arboleda  
Magister en Agronomía  
Universidad Técnica Luis Vargas Torres de Esmeraldas

**Diseño y Diagramación:** Ing. J. Bladimir Mora Macías  
Diseñador Gráfico y Multimedia.

**Primera Edición:** Quevedo, Septiembre del 2022.

**ISBN:** 978-9978-371-44-2



## ► PRESENTACIÓN:

---

El Comité Editorial de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) es la unidad encargada de promover, gestionar y administrar el conocimiento resultante de las actividades de investigación científica, la docencia y la vinculación de docentes y estudiantes. Dentro del procedimiento para el reconocimiento al profesorado y estudiantado de la UTEQ se contempla la publicación como libros de Tesis de grado y posgrado que se distingan por su innovación, metodología, rigor técnico o impacto social.

La tesis presentada en opción al grado de Magister en Agronomía de la Ing. Karen Tatiana Chávez Arteaga, obtenido en la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, atiende a la normativa existente para ser publicado como libro y por ello el Comité Editorial de la UTEQ aprueba la visibilidad y acceso a la comunidad académica, científica y sociedad en general.





**CAPACIDAD BIOCONTROLADORA DEL HONGO**  
***Trichoderma Spp.* HACIA *Alternaria Spp.* EN EL CULTIVO**  
**DE BRÓCOLI (*Brassicae oleracea*)**

---

**AUTORES:**

Karen Tatiana Chávez Arteaga  
Hayron Fabricio Canchignia Martínez



## RESUMEN

El empleo excesivo de fungicidas al control de *Alternaria spp.*, ha ocasionado que este patógeno adquiera resistencia. Los controladores biológicos en la agricultura ofrecen una alternativa en la reducción del uso de agroquímicos y ayudar en los aspectos fisiológicos de las plantas. Planteado como objetivo evaluar la capacidad antagónica de cepas nativas de *Trichoderma* hacia el hongo patogénico *Alternaria spp.* Se analizaron un conjunto de ocho cepas de *Trichoderma* aisladas de la zona de Cotopaxi e identificadas a nivel molecular con los ITS 1 y ITS4 y fueron analizadas para la detección del gen ech42. Los metabolitos se obtuvieron mediante el proceso de centrifugación. El aislamiento e identificación de *Alternaria* se obtuvieron cultivos puros son analizados por la técnica de PCR. Se realizaron tres ensayos: 1) Ensayos antagonistas evaluando el efecto de los metabolitos sobre el crecimiento micelial al 10%. 2) Aplicación como bioestimulante en plantas de brócoli para evaluar peso de raíz y altura. Se empleó el diseño completamente al azar (D.C.A) para evaluar el efecto de las *Trichodermas*, se utilizó la prueba de Tukey al 95%. 3) Aplicación en campo al control de patógenos y rendimiento en plantas de brócoli, utilizando tres dosis distintas. Se empleó el Diseño de bloques completamente al azar (B.C.A) utilizando la prueba de Tukey al 95%. Se identificaron cinco cepas distintas de *Trichoderma*: *harzianum*, *koningii*, *atroviride*, *asperellum* y *reesei*; todas mostraron la presencia del gen ech42 produciendo la enzima endoquitinasa. Las cepas *T. harzianum* y *atroviride* con una DO de 0.096 y 0.15 respectivamente, mostrando mayor actividad antagónica hacia *A. brassicae* in vitro. La aplicación en campo  $5 \times 10^{10}$  Dosis 3Lt/Ha mostro mayor efecto biostimulante con 27.78 ton/Ha y actividad antagónica en todos los ensayos evaluados en plantas de brócoli con una incidencia de 1.27% de pudrición. *Trichoderma* ejerció actividad antagónica hacia el patógeno *Alternaria* y demostró un efecto estimulante en las plantas de brócoli.



## ABSTRACT

The excessive use of fungicides to control *Alternaria spp.*, caused this pathogen to acquire resistance. Biological controllers in agriculture offer an alternative in reducing the use of agrochemicals and helping in the physiological aspects of plants. The objective was to evaluate the antagonistic capacity of native *Trichoderma* strains towards the pathogenic fungus *Alternaria spp.* A set of eight *Trichoderma* strains isolated from the Cotopaxi area and identified at the molecular level with ITS 1 and ITS4 were analyzed and they were analyzed for the detection of the ech42 gene. The metabolites were obtained by means of the centrifugation process. The isolation and identification of *Alternaria* were obtained pure cultures are analyzed by the PCR technique. Three tests were carried out: 1) Antagonist tests evaluating the effect of metabolites on mycelial growth at 10%. 2) Application as a biostimulant in broccoli plants to evaluate root weight and height. The completely randomized design (D.C.A) was used to evaluate the effect of *Trichodermas*, the 95% Tukey test was used. 3) Field application to control pathogens and yield in broccoli plants, using three different doses. The completely randomized block design (B.C.A) was used using the Tukey test at 95%. Five different strains of *Trichoderma* were identified: *harzianum*, *konigii*, *atroviride*, *asperellum*, and *reesei*; all showed the presence of the ech42 gene producing the endochitinase enzyme. The strains *T. harzianum* and *atroviride* with an OD of 0.096 and 0.15 respectively, showing greater antagonistic activity towards *A. brassicae* in vitro. The field application  $5 \times 10^{10}$  <sup>DOSIS</sup> 3Lt / Ha showed greater biostimulant effect with 27.78 ton / Ha and antagonistic activity in all the tests evaluated in broccoli plants with an incidence of 1.27% of rot. *Trichoderma* exerted antagonistic activity towards the *Alternaria* pathogen and demonstrated a stimulating effect on broccoli plants.

# ÍNDICE GENERAL

PORTADA.....	i
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Problema científico.....	2
1.2. Hipótesis.....	3
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Problema General.....	3
1.3.2. Problema Específico.....	3
<b>II. MARCOTEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
2.1. Generalidades del Brócoli.....	4
2.2. Variedades.....	5
2.3. Cultivo de brócoli en el Ecuador.....	5
2.4. Principales enfermedades del brócoli.....	6
2.4.1. <i>Alternaria spp.</i> .....	6
2.5. Control biológico de enfermedades.....	8
2.5.1. <i>Trichoderma spp.</i> .....	8
2.5.2. Mecanismos de acción.....	9
2.6. Espaciador transcrito interno ribosómico nuclear (ITS) marcador de código de barras de ADN universal para hongos.....	15
2.7. Gen ech42 de las endoquitinasas.....	16
<b>III. MATERIALES Y MÉTODO.....</b>	<b>17</b>
3.1. Localización.....	17
3.2. Tipo de investigación.....	18
3.3. Material genético.....	18
3.4. Tratamientos.....	18
3.4.1. Tratamientos para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial de <i>Alternaria spp.</i> .....	18



3.4.2. Tratamiento para la evaluación de la capacidad protectora hacia <i>Alternaria</i> en el cultivo de brócoli.....	19
3.5. Diseño de la Investigación.....	19
3.5.1. Diseño para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial de <i>Alternaria</i> spp.....	19
3.5.2. Diseño experimental para la evaluación de la capacidad protectora hacia <i>Alternaria</i> en el brócoli.....	19
3.6. Características del Ensayo.....	20
3.7. Manejo del experimento.....	20
3.7.1. Aislamiento e identificación molecular de <i>Trichoderma</i> spp de cultivares de brócoli.....	20
3.7.2. Aislamiento e identificación molecular de <i>Alternaria</i> spp de cultivares de brócoli.....	21
3.7.3. Detección de la enzima Citoquinina en <i>Trichoderma</i> spp con actividad antifúngica.....	23
3.7.4. Obtención de Metabolitos secundarios de <i>Trichoderma</i> spp.....	23
3.7.5. Evaluación de actividad antagonista por absorbancia al desarrollo micelial de <i>Alternaria</i> spp.....	23
3.7.6. Evaluación de la capacidad protectora de <i>Trichoderma</i> spp a problemas de <i>Alternaria</i> spp en el cultivo de brócoli.....	24

**IV. RESULTADOS.....26**

4.1. Identificación morfológica y molecular de especies de <i>Trichoderma</i> spp.....	26
4.2. Aislamiento e identificación del patógeno <i>Alternaria</i> spp.....	30
4.3. Identificación del gen ech42 de actividad antifúngica presente en <i>Trichoderma</i> spp.....	31
4.4. Evaluación antagonista de los extractos celulares de <i>Trichoderma</i> en inhibición al desarrollo micelial de <i>Alternaria</i> spp.....	31
4.5. Evaluación de la capacidad protectora de <i>Trichoderma</i> a problemas de pudriciones ocasionado por <i>Alternaria</i> en el cultivo de brócoli.....	34
4.5.1. Evaluación de altura (cm) y peso radicular (gr) en plántulas bajo invernadero.....	34
4.5.2. Evaluación de incidencia de pudrición (%) y rendimiento (ton/Ha).....	35

<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
5.1. Aislamiento e identificación morfológica y molecular de especies de <i>Trichoderma</i> .....	37
5.2. Determinación de la presencia del gen <i>ech42</i> en <i>Trichoderma</i> spp..	39
5.3. Aislamiento e identificación molecular del patógeno <i>Alternaria</i> spp.	39
5.4. Inhibición de crecimiento micelial de <i>A. brassicae</i> .....	40
5.5. Evaluación de la capacidad protectora de <i>Trichoderma</i> a problemas de pudriciones ocasionado por <i>Alternaria</i> en el cultivo de brócoli...	40
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>44</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>46</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>58</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Localización de la empresa NINTANGA S.A.....	17
Figura 2	Características macroscópicas de los aislados de Trichoderma spp.....	26
Figura 3	Árbol filogenético basado en secuencias transcritas internas (ITS) de los aislados de Trichoderma seleccionados.....	29
Figura 4	Aislamiento de cultivos puros de Alternaria spp.....	30
Figura 5	Identificación de Alternaria spp mediante PCR.....	30
Figura 6	Amplificación del gen ech42 por PCR en Trichoderma spp...	31
Figura 7	Evaluación de la inhibición al crecimiento micelial de A. brassicae por los extractos celulares de Trichoderma.....	32
Figura 8	Crecimiento micelial de A. brassicae en cubetas de espectrofotómetro para medir el DO.....	33
Figura 9	Evaluación del peso radicular y altura en plántulas de brócoli.....	34
Figura 10	Plántulas de brócoli con 5 semanas de edad.....	35
Figura 11	Evaluación de Incidencia de pudriciones y Rendimientos en el cultivo de brócoli.....	36

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	1	Clasificación taxonómica del brócoli ( <i>Brassica oleracea</i> Var <i>Itálica</i> ).....	5
Tabla	2	Características climáticas de NINTANGA S.A.....	17
Tabla	3	Descripción de los tratamientos in vitro.....	18
Tabla	4	Descripción de los tratamientos in vivo.....	19
Tabla	5	Características del ensayo in vivo.....	20
Tabla	6	Caracterización genética de <i>Trichoderma</i> por amplificación de la región IT.....	27

## I. INTRODUCCIÓN

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura mencionó que la producción mundial del brócoli en 2018 fue de 37.241.388 toneladas. Los tres países con mayor producción son China, China continental e India con el 81%. Ecuador ocupa el veintitresavo puesto con 0.29% (FAO, 2020). El Ecuador se ha convertido en el primer exportador de brócoli de Sudamérica, con 98% de su producción para el mercado internacional y solo 2% para el mercado nacional. La causa principal de pérdidas y disminución en la producción se da por el efecto del hongo patogénico *Alternaria spp* causante de la enfermedad Tizón o Mancha negra (Urooj et al., 2019). Esta enfermedad se propaga por sus conidios que se adhieren a la superficie y penetran al hospedero a través de los estomas (Cho et al., 2016). La infección da como resultado la aparición de síntomas graves de la enfermedad, incluyendo numerosos puntos negros que cubren las pellas causando pérdidas alrededor del 35% (Meena et al., 2016).

Se han adoptado diferentes medidas de estrategias para controlar la enfermedad, como prácticas de rotación de cultivos, utilizar variedades resistentes y aplicación de fungicidas tales como el difenoconazol, cyproconazol, flutapyroxad y pyraclostrobin, lo que ha causado que el patógeno genere resistencia por el empleo frecuente y extensivo de estas moléculas (Cho et al., 2016). Nuevas alternativas de control para contrarrestar el uso excesivo de químicos, el sector agropecuario ha empezado investigaciones sobre la aplicación de *Trichodermas* por su amplia capacidad de controlar hongos patogénicos y su capacidad de colonizar las raíces de plantas siendo un simbionte oportunista y avirulento (Saxena et al., 2015).

*Trichoderma spp* recibe nutrientes de exudados de raíces a cambio de la protección de las plantas contra el estrés biótico y abiótico (Saxena et al., 2016). La interfaz entre *Trichoderma* y la planta se establece mediante eventos tempranos que incluyen liberación de inductores de las paredes celulares de ambos organismos y secreción de compuestos de bajo peso molecular, péptidos y proteínas del hongo, lo que lleva al reconocimiento por

parte de la planta (Brotman et al., 2015). Se han descrito varios modos de acción para explicar el antagonismo de *Trichoderma* hacia los hongos patógenos e incluyen micoparasitismo, producción de antibióticos y competencia por nutrientes (Colla et al., 2015). Además, *Trichoderma* también ejerce un control indirecto contra los patógenos a través de la acción de respuesta sistémica inducida (ISR) en las células vegetales que resulta en una defensa mejorada (Macario & Mondragoan, 2017). La ISR se activa principalmente contra patógenos necrotróficos, esta mediada por las vías del jasmonato (JA) y el etileno (ET), y va sin acumulación de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PRP) (Carrillo et al., 2020). Por otro lado, el SAR se activa por infección local e involucra la vía de señalización del ácido salicílico (SA), requiere PRP y es principalmente eficaz contra patógenos biotróficos y hemibiotróficos (Dotson et al., 2018). De acuerdo con Meena et al. (2016), el desarrollo de *A. alternata* en condiciones *in vitro* son inhibidas por *T. koningii*, *T. lingorum* y *T. virens* estas suprimen el desarrollo de sus micelios en más del 55% (Gveroska & Ziberoski, 2012).

La búsqueda de nuevos agentes biocontroladores para el control de pudriciones es el objetivo principal de esta investigación evaluando la capacidad biocontroladora de *Trichoderma* hacia el agente causal *Alternaria* en el cultivo de brócoli.

## 1.1 Problema científico

Se prevé que para el año 2050, la población total del mundo alcanzará los 9.100 millones de personas aproximadamente. Por lo tanto, para alimentar a esta creciente población mundial, es necesario aumentar la producción de alimentos alrededor del 70% en la agricultura. El aumento sustancial en la producción de alimentos ayudó a satisfacer las necesidades de seguridad alimentaria mundial, pero problemas como el calentamiento global, la contaminación ambiental y la explosión demográfica ha empujado a las plantas hacia diversos tipos de tensiones bióticas como hongos, bacterias, virus, nematodos, malezas e insectos, que provocan una pérdida de rendimiento de hasta el 31-42%.



En consecuencia, los fungicidas químicos todavía se emplean de manera imprudente, como medio principal de control de enfermedades. Estos productos químicos no solo son costosos, sino que su aplicación da como resultado la acumulación de niveles nocivos de toxinas en los seres humanos y en nuestro ecosistema. Además, el uso indiscriminado de fungicidas obliga a los patógenos a someterse a mutaciones que eventualmente se atribuyen a la selección de biotipos resistentes a fungicidas.

## 1.2 Hipótesis

La aplicación de *Trichoderma* en el cultivo de brócoli (*Brassica oleracea*) posee un efecto antagónico hacia *Alternaria spp* y estimula al desarrollo vegetativo de las plantas.

## 1.3 Objetivos

### 1.3.1 General

Evaluar la capacidad biocontroladora de *Trichoderma spp* hacia *Alternaria spp* en el cultivo de brócoli.

### 1.3.2 Específicos

- Identificar a nivel molecular las especies de *Trichoderma* y al patógeno *Alternaria*.
- Determinar la presencia de genes relacionados a la producción de enzimas.
- Analizar la actividad antagónica de *Trichoderma spp* frente *Alternaria spp* mediante la producción de metabolitos secundarios a nivel in vitro.
- Verificar la capacidad protectora de *Trichoderma* a problemas de pudriciones ocasionado por *Alternaria* en el cultivo de brócoli.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Generalidades del Brócoli

El brócoli (*Brassicae oleracea L. var. Italica*) es una hortaliza originaria de Asia, la parte comestible del vegetal es la inflorescencia inmadura. Contiene un valor nutricional alto, entre ellas vitaminas A y C, potasio y fibra. Es utilizado para reducir los riesgos de diabetes y anemia por su alto contenido de Hierro, también para algunos tipos de cáncer, ya que produce compuestos químicos anticancerígenos como el glucosinolato (Medical Review Faculty, 2014).

El cultivo de brócoli se adapta mejor a temperaturas promedio de 12 a 16 °C, también soporta bajas temperaturas hasta -2 °C esto cuando todavía no haya formado su inflorescencia. Se adapta a suelos arenosos hasta arcillosos limosos y a un pH ligeramente ácidos hasta alcalinos (Jaramillo & Díaz, 2016). El cultivo se establece en campo a través del trasplante, la producción se lleva a cabo bajo invernaderos durante 30 a 40 días y luego están listas para el trasplante. Esta planta es anual, con 0.6 a 1 m de altura, la inflorescencia es una pella compacta de 15 a 30 cm de diámetro, son de color verde en varias tonalidades, depende de las variedades utilizadas, la inflorescencia o pella se forma en la parte central de la planta (Hillock, 2016).

La raíz es pivotante con raíces secundarias y superficiales, tiene una profundidad hasta de 60 cm. El tallo es cilíndrico, corto y carnoso de color verde claro, en el cual se disponen las hojas en forma helicoidal, con entrenudos cortos. Las hojas son pecioladas y lobuladas con un color verde-grisáceo, con bordes ondulados, nervaduras marcadas y blancas (Hedestrom, 2018).



**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del brócoli (*Brassica oleraceae* var. *Itálica*)

<i>Reino:</i>	Plantae
<i>Subphylum:</i>	Streptophyta
<i>División:</i>	Magnoliophyta Fanerógama
<i>Orden:</i>	Brassicales
<i>Familia:</i>	Brassicaceae
<i>Género:</i>	Brassica
<i>Especie:</i>	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Italica</i>

Fuente: (Ñacato & Valencia, 2016)

## 2.2 Variedades

Existen distintas variedades, entre las que más se adaptan a nuestra zona son: Avenger, Domador, SK-6 y Legacy. La variedad Avenger es la más cultivada en la región sierra esta posee tallos gruesos y cortos, hojas anchas y largas, esta variedad tiene mayor peso de pella, por ende, mayor rendimiento, es líder en el mercado por su excelente adaptación y uniformidad de pellas favoreciendo su empaque para la exportación (Sánchez et al., 2020).

## 2.3 Cultivo de brócoli en el Ecuador

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura mencionó que la producción mundial del brócoli en 2018 fue de 37.241.388 toneladas. Los tres países con mayor producción son China, China continental e India con el 81%. Ecuador ocupa el veintitresavo puesto con 0.29% (FAO, 2020). En Ecuador los cultivos de brócoli son transitorios, entre los años 2017 y 2019, se sembraron alrededor de 9000 hectáreas de esta hortaliza, con una cosecha equivalente al 99.8% de la siembra. En el 2019 la producción de brócoli decayó 10%, cuando en años anteriores había crecido más del 55%. Las ventas han obtenido un crecimiento del 8% dentro del periodo analizado. El año 2019 es el que menor cantidad de toneladas métricas vendió, 5.676 menos que en 2018 y sólo el 96.7% de la producción total, cuando el promedio fue de

98.6%. Cotopaxi es la provincia con mayor superficie sembrada, produce casi el 90% de brócoli en todo el país con un promedio de 100190,79 toneladas (INEC, 2019).

El brócoli es una de las hortalizas más cotizadas a nivel mundial, y actualmente el principal exportador en Sudamérica es Ecuador. Hasta el 2018 los principales países para las exportaciones fueron Japón, Estados Unidos, la Unión Europea, Canadá y Guatemala. En el 2020 desde enero hasta mayo se registraron 39 toneladas y 69.782 miles de dólares en exportaciones. El brócoli está dentro de los 25 principales no petroleros de exportación a Estados Unidos, se estima que más del 90% de la producción nacional se destina para la exportación, contribuyendo de manera importante a las exportaciones de productos primarios no tradicionales (MAGAP, 2020).

## **2.4 Principales enfermedades del brócoli**

La calidad, producción y valor nutricional pueden verse afectados por los microorganismos fitopatógenos como son: hongos, bacterias, virus y nematodos, ya que provocan grandes pérdidas en la cadena productiva y comercialización del producto. Las enfermedades que más impacto económico tiene en el cultivo son causadas por hongos patogénicos: Tizón o Manch

### **2.4.1 *Alternaria spp***

La pudrición o mancha negra es una enfermedad causada por el hongo *Alternaria*, es un patógeno cosmopolita y saprofito, puede vivir en los restos vegetales del cultivo o como parásito de la planta. Produce una gran cantidad de esporas que son diseminadas por el viento, agua, etc. Para que se genere su infección en los tejidos requiere humedad, lluvia abundante y una temperatura de 17 a 24 C., realiza su penetración a través de los estomas de la planta (Lawrence et al., 2016). Las conidias tienen un periodo de viabilidad de hasta dos años en rastrojos vegetales, ya que es un hongo saprofito (Ghose et al., 2016).



*Alternaria spp* presenta un micelio oscuro grisáceo a negro con hifas septadas, ramificadas, hialinas y lisas. Posee conidióforos simples, flexuosos o erectos, doblados, hinchados en la base dando a lugar una conidia pequeña alargada segmentada de forma septada con una coloración verde oliva o amarilla cuyo cuerpo gradualmente se estrecha hasta formar un pico cónico (Kumar et al., 2014).

## Síntomas en las plantas

Los síntomas de la enfermedad por *Alternaria* se presentan en las hojas, el peciolo, la inflorescencia, el tallo y semillas (Uroj et al., 2019). Los síntomas iniciales de la enfermedad aparecen en las hojas viejas de las plantas, como puntos puntuales discretos, que luego se agrandan y se rodean por un halo distintivo con anillos concéntricos (Kumar et al., 2014). Estos puntos en última instancia coleasen, formando grandes parches de lesiones de tizón foliar clorótico y necrótico, dando como resultado en defoliación. El patógeno reside en el centro de las lesiones, que está rodeado por halos amarillos, la zona creada por la difusión de metabolitos fúngicos (Uroj et al., 2019). Las manchas formadas por *A. brassicae* son de color grisáceo (Kumar et al., 2014). Sobre los tallos, las manchas son alargadas. La infección en las hojas reduce el potencial fotosintético, lo que no resulta en desarrollo y peso reducidos de la semilla, pero también en contenido y calidad de aceite reducidos y baja eficiencia de germinación (Meena et al., 2016).

En condiciones de campo, el desarrollo y la propagación generalmente le favorecen temperaturas que oscilan entre 12 C y 27 C y una humedad relativa del 70% (Urooj et al., 2019). Las lluvias frecuentes son favorables para el inicio de la enfermedad y la propagación en las hojas de *Brásica*, particularmente durante la etapa de floración. Además, la susceptibilidad de las plantas aumenta con la edad 30 días después de la siembra, las plantas de menos de 30 días no muestran ningún síntoma, pero son muy susceptibles desde los 60 a 90 días después de la siembra (Kumar et al., 2014).

## 2.5 Control biológico de enfermedades

El desarrollo de estrategias ecológicas y rentables para el manejo de enfermedades en las plantas ha sido de gran interés en los últimos tiempos. Los mecanismos de control biológicos se contemplan como medidas significativas para el manejo de enfermedades porque los fungicidas químicos afectan negativamente a otros toda la microbiota del suelo (Kohl et al., 2019). Hay varias investigaciones que detallan como algunos microorganismos causan inhibición del crecimiento de patógenos al alterar su metabolismo o al establecer una relación parasitaria (Panth et al., 2020). Además, la aplicación de agentes de control biológico (BCA) con concentraciones altas estimula supresión de enfermedades de forma similar a las dosis altas de tratamientos con fungicidas químicos (Hyder et al., 2020).

### 2.5.1 *Trichoderma spp*

*Trichoderma* se aisló por primera vez en 1794 del suelo y de la descomposición orgánica (Persoon, 1794). En todo el mundo, actualmente se obtienen bio-fungicidas eficaces en más del 60%. son de *Trichoderma* (Abbey et al., 2019). Las diferentes cepas de *Trichoderma* (telomorfo *Hypocrea*) pertenecen a hongos imperfectos ya que no poseen cualquier etapa sexual conocida en su ciclo de vida (Van et al., 2018). Estos hongos son colonizadores rápidos, invasores, filamentosos, oportunistas, avirulentos y exhiben una relación simbiótica con las plantas. En suelos contaminados con microorganismos patógenos, tienen la capacidad de inhibir su crecimiento a través de varios mecanismos antagonistas (Lorito et al., 2010). *Trichoderma* exhibe un comportamiento antagónico contra varios organismos fitopatógenos, incluidas bacterias, nematodos y especialmente hongos, al inhibir su crecimiento ya sea por interacciones directas (por ejemplo, hiperparasitismo, competencia de nutrientes y espacio y antibiosis) (Zhang et al., 2017) o indirectamente mejorando el crecimiento y el vigor de las plantas y mejorando la tolerancia al estrés, la absorción activa de nutrientes y biorremediación de la rizosfera contaminada, además de proporcionar a las plantas varios metabolitos secundarios, enzimas y proteínas PR (Kumar, 2013).



## 2.5.2 Mecanismos de acción

### 1) Interacción *Trichoderma* -plantas

*Trichoderma* es atraído por señales químicas liberadas por la raíz de la planta. Los pasos iniciales del establecimiento de la simbiosis implican el apego, penetración y colonización de *Trichoderma* dentro de las raíces de las plantas. El anclaje de la raíz de la planta se ve facilitado por proteínas ricas en cisteína conocidas como hidrofobina, por ejemplo, las hidrofobinas TasHyd1 y Qid74 de *T. asperellum* y *T. harzianum*, respectivamente (Samolski et al., 2012). La penetración exitosa de *Trichoderma* es seguida por una rápida colonización de los tejidos de las raíces, esto produce un incremento de defensas en las plantas, como la producción de fitoalexina, como se observó previamente en las raíces de *Lotus japonicus* durante la aplicación *T. koningii* (Masunaka et al., 2019). Además, en suelos contaminados con patógenos, *Trichoderma* spp. coopera con otras poblaciones microbianas beneficiosas, mejorando el crecimiento y la supervivencia de las plantas (Omomowo & Babalola, 2019).

#### a) Inducción de resistencia a enfermedades

Se ha informado que la adición de diferentes especies de *Trichoderma* en la rizosfera mejora la defensa de las plantas contra varios organismos patógenos como virus, bacterias y hongos, mediante la estimulación de diferentes mecanismos de resistencia que abarcan principalmente los sistemas de resistencia sistémicos inducidos (ISR), respuesta hipersensible (HR) y resistencia sistémica adquirida (SAR) (Harman et al., 2014). En algunos estudios han demostrado que los metabolitos son inductores de resistencia en las plantas cuando interactúan con las *Trichodermas* (Ahluwalia et al., 2015). Estos metabolitos incorporan proteínas que muestran actividad enzimática como xilanasas y quitinasas, productos génicos similares a proteínas expresados por genes no virulentos y de bajo peso molecular. Estos compuestos son producidos debido a la degradación enzimática hidrolítica de células funcionales o vegetales (Ahluwalia et al., 2015).

La inducción de resistencia se debe al aumento de las cantidades de metabolitos defensivos, así como las enzimas. Estos incluyen principalmente la biosíntesis de fitoalexina (HR), que implica la participación de las enzimas fenilpropanoide, es decir, amonialasa-fenilalanina (PAL) y sintasa chalcona sintasa (CHS) (Stacey & Keen, 1999). Otras enzimas que mejoran la resistencia en las plantas son las quitinasas y glucanasas (McIntyre et al., 2014). También abarcan proteínas relacionadas con la patogenia (PR) (respuesta SAR), y las enzimas que juegan un papel en la respuesta de defensa antioxidante (McIntyre et al., 2014). La quitinasa derivada de *T. harzianum* (Chit42), expresada en plantas de tabaco y papa, condujo al desarrollo de líneas transgénicas extremadamente tolerantes o totalmente resistentes hacia patógenos como *Rhizoctonia solani* así como patógenos foliares como *Alternaria alternata*, *A. solani* y *Botrytis cinerea* (Howell, 2013). Yedidia et al., (2019) confirmó que las raíces de pepino inoculadas con *T. harzianum* se caracterizaron por una mayor expresión de las actividades de peroxidasa y quitinasa, lo que mejoró la resistencia en la planta de los ataques de patógenos.

## **b) Interacciones *Trichoderma* -Patógeno**

El control de enfermedades, facilitado por mediadores de biocontrol, es un resultado de las interacciones entre los simbioses y comunidades patógenas de la planta. Debido a su capacidad para defender plantas y controlar poblaciones de patógenos, en diversas circunstancias del suelo, *Trichoderma spp.* han sido extensamente analizados y explotados comercialmente como agentes de biocontrol, enmiendas del suelo y biofertilizantes, colocando *Trichoderma spp.* entre los BCA fúngicos más explorados (Harman, 2010). Varias especies de este género son competentes en la rizosfera y también pueden descomponer polisacáridos, hidrocarburos, clorofenólicos y plaguicidas xenobióticos empleados en el cultivo (Li et al., 2019). Las estrategias clave de biocontrol que *Trichoderma* se desarrolla en conflicto directo con hongos patógenos son micoparasitismo, competencia y antibiosis (Juliatti et al., 2019).



## 2) Micoparasitismo

El micoparasitismo implica el ataque directo de una especie de hongo a otra y se encuentra entre los mecanismos antagonistas más importantes expresados por *Trichoderma* spp. Han sido reportados al menos 75 especies de *Trichoderma* con potencial micoparasítico. En investigaciones realizadas indican que las cepas de *Trichoderma* atacan y desintegran hongos patógenos de las plantas como *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Pythium* spp. y *Ustilago maydis* (Harwoko et al., 2019). Este proceso de complejo incluye eventos secuenciales. En primer lugar, la identificación entre *Trichoderma* y el hongo objetivo es mediada por la unión de los carbohidratos presentes en la pared celular de *Trichoderma* a las lectinas del otro. Esto es seguido por el desarrollo de apresorios y giro de hifas, que abarca un mayor número de compuestos osmóticos como el glicerol. Después de una penetración exitosa, *Trichoderma* inicia el ataque a la maquinaria celular del huésped mediante la generación de numerosos fungitóxicos que degradan la pared celular (CWDE), como enzimas, glucanasas, quitinasas y proteasas (Harman et al., 2014).

La acción acumulativa de estos compuestos causa la disolución de las paredes celulares del patógeno, lo que finalmente da como resultado el parasitismo del hongo objetivo. Se ha observado que se pueden generar huecos en el lugar de la formación de apresorios que facilitan el acceso directo de las hifas de *Trichoderma* a la luz del hongo objetivo, que luego procede a matar el hongo patógeno (Kumar, 2013). Además, los agentes de biocontrol no solo degradan la pared celular del hongo, también inactivan sus enzimas (por ejemplo, pectinasas, etc.), que son esenciales para que el hongo patógeno pueda colonizar y penetrar los tejidos vegetales (Harman et al., 2014). Las paredes celulares de los hongos están compuestas por quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanosa (Fesel & Zuccaro, 2016).

Las Quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanosa son enzimas líticas sintetizadas por *Trichoderma* spp. estas son las responsables de las acciones

micoparasíticas ya que tienen el potencial de degradar la pared celular del hongo patógeno (Sivan & Chet, 1989).

Zellinger et al., (1999) informó anteriormente que *Trichoderma* puede detectar la existencia de micelio de patógenos en la rizosfera y proliferan hacia la dirección del área del patógeno. Estudios revelaron que durante la interacción de *Trichoderma* -hongos patógenos, el gen de la endoquitinasa se estimula antes de entrar en contacto con el patógeno, de lo contrario, la activación de la exoquitinasa tuvo lugar sólo después de que se estableció el contacto (Brunner et al., 2013). *Trichoderma* emite antibióticos como el peptaibol fungitóxicos (Dotson et al., 2018). La acción colectiva de estos ingredientes es esencial para la disolución de las paredes celulares y el parasitismo del hongo objetivo. Aproximadamente 20-30 genes, proteínas o metabolitos conocidos están claramente involucrados en esta actividad (Harman, 2010).

### **3) Competición**

La disponibilidad limitada y la competencia por nutrientes conducen al manejo de comunidades fungales y el desarrollo de fitopatógenos (Mahmood & Kataoka, 2018). La competición de macro y micronutrientes en especial Carbono, Nitrógeno y Hierro juegan un papel importante durante las interacciones de hongos beneficiosos y desventajosos acoplándose con los sistemas de biocontrol (Vinale et al., 2018). Están establecidos que las especies de *Trichoderma* compiten por nutrientes, nichos biológicos o puntos de infección con patógenos en la rizosfera de las plantas (Ahluwalia et al., 2015). *Trichoderma* exhibe mejor capacidad para movilizar y absorber nutrientes desde el suelo en comparación con otros microorganismos de la rizosfera, por lo tanto, maneja el control de algunos patógenos (ej. *B. cinérea*) el uso de *Trichoderma* implica la coordinación de numerosas estrategias, como la competencia por nutrientes, que se considera uno de los mecanismos más importantes (Bargaz et al., 2018).

La utilización eficaz de nutrientes depende de la habilidad de



*Trichoderma* para conseguir energía derivada del metabolismo de los carbohidratos como la celulosa, quitina, glucano y glucosa, que están presentes en el micelio de los hongos (Mahmood & Kataoka, 2018). La función del sistema que transporta la glucosa aun no es descubierta, pero es concebible que la competencia del *Trichoderma* desempeñe un papel fundamental (Delgado et al., 2003). Los exudados de las raíces y la rizosfera son particularmente ricos en nutrientes como los carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, Fe, etc. pero la competencia por Carbono entre *Trichoderma* y los hongos patógenos como *Rhizoctonia solani*, *F. oxysporium*, etc. se consideraron los más mencionados (Sarrocó et al., 2009)

En comparación con otros microorganismos en el suelo, *Trichoderma* es superior en la movilización competente de nutrientes inmóviles y en su uso. Para este proceso *Trichoderma* induce la reducción de pH del suelo a través de la biosíntesis y liberación de ácidos orgánicos como glucónico, cítrico y fumárico. Estos ácidos orgánicos facilitan aún más la solubilización de micronutrientes y cationes minerales como fosfatos, Fe, Mn y Mg (Vinale et al., 2018). Se ha informado que *T. harzianum* codifica un transportador de glucosa (Gtt1) que expresa una alta afinidad para la glucosa en un nivel excepcional (Benitez et al., 2014). Además, Vargas et al., (2019) reconoció una enzima intracelular de *T. virens* (TvInv) que parece ser la responsable de la degradación de la sacarosa de origen vegetal. Los iones de Fe sirven como cofactores para múltiples clases de enzimas y juegan un papel clave como nutriente para el crecimiento y desarrollo de las plantas (Miethke, 2013).

## 4) Antibiosis

La antibiosis es un proceso donde interactúan componentes de bajo peso molecular y educen el crecimiento de otros microorganismos. Principalmente, la antibiosis se centra en la producción de metabolitos secundarios, que muestran una consecuencia inhibitoria o mortal sobre un hongo parasito. Se han detectado más de 180 metabolitos secundarios que indican distintas clases de productos químicos aislados de hongos pertenecientes al género *Trichoderma* (Masi et al., 2018). Dependiendo de su origen biosintético, estos compuestos se pueden agrupar en peptaibol, policétido y terpeno (Hu et al., 2017). Varias especies de *Trichoderma* son conocidos por producir aminoácidos no proteinogénicos (especialmente amino-isobutirico) compuestos de peptaibol, que son antibióticos polipeptídicos con pesos moleculares que oscilan entre 500 hasta 2200 Da. La característica peculiar de estos compuestos es que su N-terminal esta acetilado, mientras que el C-terminal tiene aminoalcoholes (Turaga, 2020). Por lo tanto, su naturaleza química es anfipática y se organizan ellos mismos en la membrana para formar canales ionicos activados por voltaje. Estos péptidos sintetizadas no ribosomales (NRPS). Además, *Trichoderma* tiene la capacidad de sintetizar una clase diferente de metabolitos defensivos denominados policétidos, esto a través de eventos secuenciales catalizados por un complejo de enzimas llamas policétidos sintetasas (PKS).

Distintas cepas de *Trichoderma* sintetizan una gran variedad de antibióticos (Reino et al., 2008), por ejemplo *T. viride* produce tricotoxinas A y B, tricodéceninas, tricolorvinas y tricocelinas. De manera similar, se logró aislar de la cepa *T. harzianum* las tricolorzianinas A y B, las tricolorzinas HA y MA. *T. longibrachiatum* produce tricolonginas BI y BII, mientras que *T. koningii* produce tricoconinas, *T. artroviride* produce atroviridinas A-C y las neoatroviridinas A-D (Mukherjee et al., 2012). El ácido harziánico derivado de *T. harzianum* mostro actividad antibiótica contra *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *R. solani* en cultivo in vitro (Manganiello et al., 2018). En general la actividad



antibiótica se combina cooperativamente con enzimas líticas. Su acción dual ofrece un nivel más avanzado de antagonismo que la actividad de los antibióticos o de las enzimas que actúan solas (Monte, 2011). Howell et al., (2013) observó desintegración de las paredes celulares en los hongos fitopatógenos *B. cinérea* y *F. oxysporum* por la acción de las enzimas líticas ya que mejoró la penetración de antibióticos en las hifas de los patógenos.

## **2.6 Espaciador transcrito interno ribosómico nuclear (ITS) marcador de código de barras de ADN universal para hongos**

Los códigos de barras de ADN utilizan secuencias estandarizadas de 500 a 800 pb para identificar especies de todos los reinos eucariotas usando cebadores que son aplicable para el grupo taxonómico más amplio posible. Los códigos de barras deben derivarse de los comprobantes depositados identificados por expertos. En colecciones biológicas con metadatos en línea y validados por cromatogramas de secuencia disponibles en línea. La variación interespecífica debe exceder la variación intraespecífica (la brecha del código de barras), y los códigos de barras son óptimos cuando una secuencia es constante y única

a una especie (Herbert et al., 2013). Idealmente, el lugar del código de barras sería el mismo para todos los reinos. El cistrón de rRNA eucariota consta de 18S, 5.8S, y genes de ARNr 28S transcritos como una unidad por la ARN polimerasa I.

Los procesos postranscripcionales dividen el cistrón, eliminando dos espaciadores transcritos internos, estos dos espaciadores, incluido el 5.8S gen, generalmente se conocen como la región ITS. El ITS también se utiliza en algunos hongos para proporcionar una indicación de delimitación. por una medida de las distancias genéticas (Prado, 2010). Sin embargo, también se están utilizando en enfoques para identificar unidades taxonómicas en muestreo ambiental de hongos (Geml et al., 2018) y a menudo son más efectivos (Porter & Golding, 2011).

## 2.7 Gen ech42 de las endoquitinasas

Gen de la endoquitinasa (ech42) que codifica las endoquitinasas es producido por el hongo *Trichoderma spp*, es responsable del micoparasitismo (Barbara et al. 2011). Algunos tipos importantes de genes de control biológico que pueden ser fácilmente aisladas, clonadas y caracterizadas son proteasa, quitinasa, glucanasa, tubulinas, proteinasa, xilanasa, monooxigenasa, galacturonasa, proteínas de adhesión celular y genes tolerantes al estrés (Muthu y Sharma, 2011). Los genes tienen sus funciones únicas en el mecanismo de biocontrol como degradación de la pared celular, crecimiento de hifas, estrés a la tolerancia y actividad parasitaria. Los genes juegan un papel importante en el proceso de biocontrol regulando algunas señales y conduciendo a la secreción de algunas enzimas que ayudan en la degradación de los patógenos y, por lo tanto, se conocen como genes de biocontrol. El aumento de la expresión de los genes ayuda en una actividad mejorada de biocontrol que ayuda a promover el crecimiento de la planta y evita que la planta sea atacada por un patógeno (Hartl et al., 2012).

El gen ech42, (García et al. 1994), codifica genes para endoquitinasa con actividad inhibitoria significativamente mayor contra una amplia gama de hongos fitopatógenos que otras enzimas quitinolíticas. La enzima individual más interesante del complejo es la endoquitinasa de 42 kDa (ech42), que puede hidrolizar las paredes celulares de *Botrytis cinerea* in vitro e inhibe germinación de esporas y alargamiento del tubo germinativo de varios hongos (Schirumbočk et al., 2011). El gen correspondiente (ech42) se induce fuertemente durante las interacciones hongo-hongo y cuando el hongo crece en presencia de micelio autoclavado de varios hongos o con quitina coloidal como única fuente de carbono. La expresión de ech42 asociada con la germinación de esporas inducida por la luz es inhibida por catabolitos de carbono (Carsolio et al., 1994).

### III. MATERIALES Y MÉTODO

#### 3.1 Localización

La presente investigación se realizó en los laboratorios de Bionintanga de la empresa NINTANGA S.A., localizada en la Panamericana Norte km 10 sector Guaytacama. Sus coordenadas geográficas 08 45" de latitud Sur y 78 64" de longitud Occidental, ubicada a una altura de 2750 msnm.



**Figura 1** Localización de la empresa NINTANGA S.A.

**Fuente:** (Mapcarta, 2021)

#### Características climáticas

**Tabla 2.** Características climáticas de NINTANGA S.A.

Textura del suelo:	Franco arenoso
Altitud:	2750 m.s.n.m.
Clima:	Templado
Helofanía:	450 horas/año
Humedad Relativa:	70 %
pH:	8
Precipitación media anual:	515 mm
Temperatura media anual:	10 °C
Topografía:	Regular sin pendiente

Fuente: INAMHI, serie 2019

## 3.2 Tipo de investigación

Se utilizó el método experimental comparando información existente en la literatura y ensayos anteriores sobre agentes antagonistas, con los resultados que se esperan alcanzar en la identificación concreta del *Trichoderma spp* eficaces hacia el hongo *Alternaria spp*.

## 3.3 Material genético

El material genético que se utilizó es el híbrido Avenger distribuido por SAKATA, la característica agronómica que presenta son las siguientes:

**Tipo de cabeza:** Domo denso con grano fino

**Color:** Verde azulado

**Hábito de la planta:** Alta

**Madurez relativa:** 85-90 días después del trasplante

**Rendimiento:** 25 Ton/ha

## 3.4 Tratamientos

### 3.4.1 Tratamientos para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial de *Alternaria spp*

Se trabajó con ocho tratamientos de tres repeticiones cada uno con dos unidades experimentales, un control positivo para el cual se usó un fungicida biológico comercial y un control negativo (solo el patógeno).

**Tabla 3.** Descripción de los tratamientos in vitro

Tratamiento	Nomenclatura	Descripción
T1	T1A1	<i>Trichoderma spp</i> vs <i>Alternaria spp</i>
T2	T2A1	<i>Trichoderma spp</i> vs <i>Alternaria spp</i>
T3	T3A1	<i>Trichoderma spp</i> vs <i>Alternaria spp</i>
T4	T4A1	<i>Trichoderma spp</i> vs <i>Alternaria spp</i>
T5	T5A1	<i>Trichoderma spp</i> vs <i>Alternaria spp</i>
T6	T6A1	<i>Trichoderma spp</i> vs <i>Alternaria spp</i>
T7	Test1	Fungicida biológico comercial
T8	Test0	Sin aplicación



## 3.4.2 Tratamiento para la evaluación de la capacidad protectora hacia *Alternaria* en el cultivo de brócoli

Tabla 4. Descripción de los tratamientos *in vivo*

Tratamiento	Nomenclatura	Descripción (DOSIS)
T1	T1D1	<i>Trichoderma</i> 4 x 10 <sup>10</sup> 1 Lt/Ha
T2	T2D2	<i>Trichoderma</i> 4 x 10 <sup>10</sup> 2 Lt/Ha
T3	T3D3	<i>Trichoderma</i> 4 x 10 <sup>10</sup> 3 Lt/Ha
T4	T4M1	<i>Trichoderma</i> 5 x10 <sup>10</sup> 3 Lt/Ha
T5	Test1	Fungicida biológico comercial
T6	Test0	Sin aplicación

## 3.5 Diseño de la Investigación

### 3.5.1 Diseño para evaluación por absorbancia al desarrollo micelial de *Alternaria spp*

Se aplicó un diseño completamente al azar DCA, para evaluar el efecto antagonista de los metabolitos hacia el hongo *Alternaria spp*, generando ocho tratamientos de tres repeticiones cada uno con dos unidades experimentales.

La variable en estudio a evaluarse se sometió al análisis de varianza y se empleó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se utilizó Stat Graphics para el correspondiente procesamiento estadístico.

### 3.5.2 Diseño experimental para la evaluación de la capacidad protectora hacia *Alternaria* en el brócoli

Se aplicará un BCA (Bloque completos al azar), para evaluar la incidencia de la enfermedad en el cultivo de brócoli, generando seis tratamientos de tres repeticiones.

La variable en estudio a evaluarse fue sometida al análisis de varianza y se empleó la prueba de Tukey al 95% de probabilidad para establecer la diferencia entre las medias de los tratamientos. Se utilizó Stat Graphics para el correspondiente procesamiento estadístico.

### 3.6 Características del Ensayo

**Tabla 5.** Características del ensayo in vivo

Forma:	Rectangular
Ancho de parcelas	0.7 m
Largo de parcelas	90 m
Numero de parcelas	3
Distancia entre parcelas	1.10 m
Distancia entre plantas	0.30 m
Distancia entre hileras	0.30 m
Área del ensayo	387 m <sup>2</sup>

### 3.7 Manejo del experimento

#### 3.7.1 Aislamiento e identificación molecular de *Trichoderma spp* de cultivares de brócoli

Para obtener las cepas de *Trichoderma* de NINTANGA se colocaron por lote de 1,5 hectáreas 20 trampas utilizando la metodología en X, descrita por Vallejo, (2014). Todas las trampas se elaboraron utilizando envases de vidrio preparados con 40 gr de arroz esterilizado y 5mL de melaza, cubiertos con un pedazo de nylon bien asegurado. Con las trampas terminadas, se procedió a colocarlas a 20cm de profundidad con el sustrato en dirección hacia la raíz de la planta de brócoli. Finalmente, cada trampa se identificó con una bandera. Transcurridos 15 días las trampas fueron llevadas al laboratorio. (Nugra, 2018)

Se utilizó medio de cultivo PDA (papa dextrosa agar), añadiendo 39 g/L de PDA (Papa Dextrosa Agar), el mismo que se colocó en un plato agitador caliente durante 45 minutos hasta disolver el agar. Posteriormente, se esterilizaron en autoclave a 121 °C



durante 15 minutos a 1.2 kg/cm<sup>2</sup> de presión. Se le adicionó 160 mg/L de gentamicina (Martínez et al., 2015). Al medio para evitar crecimiento bacteriano. Se realizaron diluciones seriadas para sembrar en las cajas Petri las muestras, luego se dejaron crecer las placas por 7 días a 29 °C y se identificaron las colonias en base a sus características morfológicas. Se purificaron estas cepas de *Trichoderma* spp y se sembrarán nuevamente en el medio de cultivo PDA, se incubaron por 8 días a 29 °C para la extracción de ADN (Arbito, 2017).

Se realizó la identificación de las cepas de *Trichoderma* por PCR mediante el ADNg, que fue extraído a partir del micelio del hongo empleando el kit QIAGEN-Start Protocol (USA). Se amplificará la región ITS1 (5'-AAGTAGAAGTCGTAACAAGG-3') y ITS2 (5'-GGTTGGTTTCTTTTCCT-3') que codifica para una región conservada situada en la subunidad 5.8S del DNA ribosomal con una amplificación de 605 pb (Guijon, y otros, 2010).

La reacción de PCR se llevó a cabo en tubos de 1,5 mL de capacidad con un volumen final de 25 µL que contendrá: 12.5 µL Platinum SuperFi Green (2X), 1.25 µL/Cada primer de 10 µM, 5 µL de SuperFi (5X), 2 µL de ADN, 3µL de H<sub>2</sub>O. La reacción se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 94 °C por 2 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de: 94 °C por 30 seg a 50°C por 45 seg y 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 15 minutos y. Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y se tiñeron con Bromuro de etidio (0,5 ug/mL) (Johanson, 1994). El producto amplificado se purificó y se enviaron a secuenciar al laboratorio BIOSIN, las secuencias fueron editadas con el software MEGA 7 y analizadas por Blast.

### **3.7.2 Aislamiento e identificación molecular de *Alternaria* spp de cultivos de brócoli**

Se identificaron los cultivos de brócoli (*Brasica oleraceae* var *Italica*) que presenten signos característicos del patógeno *Alternaria* spp.

Se tomaron hojas en estadios 5 ó 6, buscando las que estén libres de otros patógenos y tierra, guardándolos en fundas “ziploc” para transportarlos hacia el laboratorio. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio se colocaron en recipientes con algodón humedecido (cámara húmeda) por 48h para favorecer el desarrollo del micelio a 28 °C, se procedió a recortar cuadrados de aproximadamente 5mm por lado, de la zona en la cual se desarrolló el micelio del hongo (Castro, 2010).

La desinfección se efectuó colocando la muestra vegetal 1 min en agua destilada, posteriormente se pasó 1 min en alcohol al 70% v/v, a continuación 1 min en agua destilada y posteriormente se colocaron en solución de hipoclorito de sodio al 0.5% por 1 min y se lavará con agua destilada. (Herrera, 2016). Las muestras ya desinfectadas fueron colocadas en el medio PDA más antibiótico, se deja incubar a 29 °C durante 8 días. (Herrera, 2016). De las colonias identificadas como *Alternaria* spp., tomando en consideración la descripción de Herrera (2016), se tomó una muestra y se sembraron en medio PDA más antibiótico durante 8 días a 29 C.

Se realizó la identificación de las cepas de *Alternaria* spp por PCR mediante el ADNg, que fue extraído a partir del micelio del hongo empleando el kit QIAGEN-Start Protocol (USA). Se amplificó la región ITS1, ITS4 y 5.8 ARNr utilizando los primers universales ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3') de 10 µM (White, Bruns, Lee, & Taylor, 2015). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador utilizando el siguiente programa: 94 °C por 2 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de: 94 °C por 30 seg a 50°C por 45 seg y 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 72 °C por 15 minutos. Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y se tiñeron con Bromuro de etidio (0,5 ug/mL) (Johanson, 1994). El producto amplificado se purificó y se envió a secuenciar al laboratorio BIOSIN, las secuencias fueron editadas con el software MEGA 7 y analizadas por Blast.



### **3.73 Detección de la enzima Citoquinina en *Trichoderma spp* con actividad antifúngica**

Se realizó la detección de Citoquinina producidas por *Trichoderma spp* tomando como molde el ADN<sub>g</sub> que se extrajo previamente. Se llevó a cabo utilizando los primers específicos ech42-FWD (5´CTTG-TAGTCCCAAATACCGTTCTCCCA-3´) y ech42-REV(5´-GCAAA-CGCCGTCTACTTCACCAACTGG-3´) de 200 nM (Druzhinina, 2012). La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador y se utilizó el siguiente programa: 94 °C por 2 minutos, para la desnaturalización inicial, seguido de 30 ciclos de: 95 °C por 1 minuto a 50°C por 2 minutos y una extensión final de 72 °C por 7 minutos. Los amplificados fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % y se tiñó con Bromuro de etidio (0,5 ug/mL) (Carsolio, Gutierrez, Jimenez, Van, & Herrera, 2004).

### **3.74 Obtención de Metabolitos secundarios de *Trichoderma spp***

Se preparó caldo papa dextrosa (CPD), 250g papa, 5g dextrosa, 1000 mL agua, en matraces de 250 mL, los cuales contenían 50 mL del medio. Se inocularon 1x10<sup>5</sup> a 150 rpm por 15 días a 28 C, se observó el pigmento en los matraces a los 15 días. Se tomaron muestras de 6 mL, de todas las cepas biocontroladores para posteriormente transferirlas a tubos de ensayo de 10 mL. Para obtener el micelio y sobrenadante, se centrifugaron los tubos de ensayo por 30 minutos a 3500 r.p.m., el sobrenadante fue filtrado en milipore de 0,2 µM en viales estériles y con la ayuda de una jeringa, las muestras fueron guardadas a -4°C debidamente rotuladas (Rodriguez & Piñeros, 2017).

### **3.75 Evaluación de actividad antagonista por absorbancia al desarrollo micelial de *Alternaria spp***

Se recuperaron 0.5 cm del micelio cultivados en placas de PDA y re-suspendidas en 500 µL de agua ultra pura, se macerará el micelio usando una punta de 1ml en forma de mortero, será

agitado por vortex. La concentración de fragmentos miceliales será ajustada con agua a  $8 \times 10^{10}$ /mL. (Howell, 2013), verificado por cámara Neubauer (fondo del campo central de 0.1 mm y superficie de conteo 0.0025 mm<sup>2</sup>), en microscopio Olympus BX41 (Vinale, Lorito, & Woo, 2018). Se evaluó el efecto de los metabolitos sobre el crecimiento micelial al 10 %, y se añadirá 720 µL del medio Sabourand; 90 µL de la suspensión micelial y 90 µL de la concentración de los metabolitos de *Trichoderma* spp con actividad proteolítica (Harman, 2006).

La solución fue ubicada en cubetas (12x12x45 mm), utilizando 90 µL micelio y 810 µL del medio Sabourand como punto de inicio para la evaluación. El crecimiento micelial fue medido por el aumento de absorbancia determinado en un espectrofotómetro (UNICO) a 600 nm y se evaluaron por 3, 6, 9 y 12 días (Vinale, Lorito, & Woo, 2018).

### **3.7.6 Evaluación de la capacidad protectora de *Trichoderma* spp a problemas de *Alternaria* spp en el cultivo de brócoli**

#### **1) Fase laboratorio**

##### **Multiplicación de las cepas de *Trichoderma* spp**

Se colocaron 200gr del sustrato (maíz) limpio e hidratado en fundas plásticas y se esterilizaron a 15 libras de presión o 125 °C y se inoculó un segmento de las cepas de *Trichoderma* y se llevaron al cuarto de propagación el cual debe estar a una temperatura máxima de 28 grados durante 6 días.

Luego se colocó una funda del microorganismo /Lt de agua y se agregará 5 cc de Tween para el desprendimiento de esporas, luego se tamizó y se procedió a colocar en el campo a una dosis de 1, 2, y 3 Lt/Ha (Rodríguez & Piñeros, 2017).

#### **2) Fase campo**

##### **a) Preparación de suelo**

Se realizaron dos pases de rastra en ambos sentidos para que el



terreno quede suelto y se encuentre apto para la siembra y se aplicara compost.

### **b) Siembra**

Se sembraron las plantas de brócoli a una distancia de 0.33 m entre plantas y entre hileras.

### **c) Fertilización**

Se efectuó la fertilización de acuerdo con los análisis de suelo y exigencias nutricionales del cultivo de brócoli.

### **d) Control de malezas**

Este control se realizó de manera manual.

### **e) Control fitosanitario**

Se aplicaron las dosis descritas en la Tabla 4 con los productos elaborados a base de *Trichoderma* spp con una frecuencia de 15 días.

## **3) Dato por evaluar**

### **a) Incidencia de la enfermedad**

Se evaluó la incidencia de la enfermedad mediante una escala de 1 al 2; en la cual: 1 fue plantas que estuvieron afectadas por la pudrición y 2 fueron las plantas que no presenten síntomas y signos de la enfermedad.

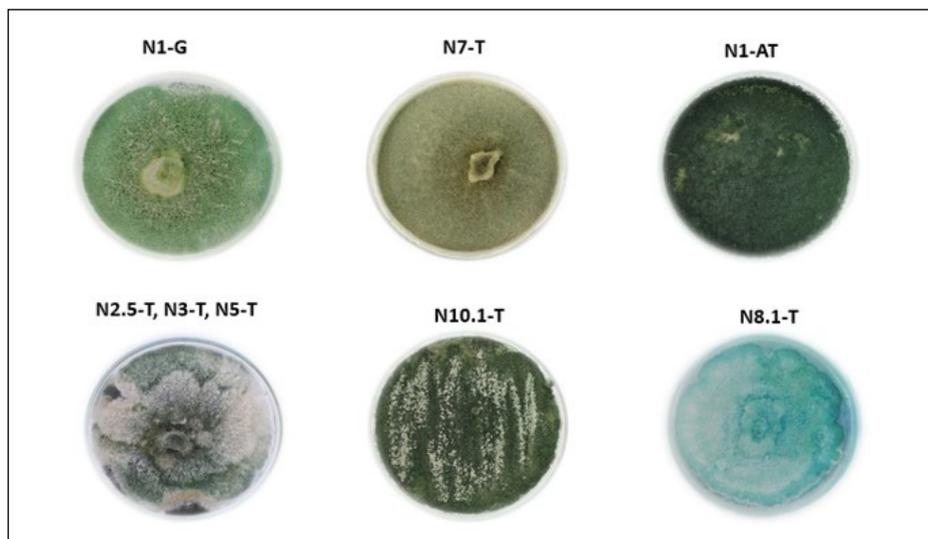
### **b) Rendimiento**

Se tomó el peso de 50 pellas de brócoli por cada unidad experimental de cada repetición y se obtuvo el rendimiento en ton/hectárea.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Identificación morfológica y molecular de especies de *Trichoderma* spp

De la rizósfera de cultivares de brócoli se aislaron ocho cepas de *Trichoderma* con diferentes características morfológicas, estas fueron codificadas por el número de trampa seleccionada y aislada. Se dedujo variaciones morfológicas macroscópicas entre los ecotipos de *Trichoderma*. La cepa N7-T mostró un color verde-amarilloso claro, tipo algodonosa y en la parte inferior de la placa presentó una tonalidad amarilla. Las cepas (N1-AT y N10.1) mostraron características similares entre sí, presentando una colonia de coloración verde oscura con pequeñas pústulas algodonosas blancas. Las cepas (N2.5-T, N3-T y N5-T) presentaron colonias con un crecimiento circular, formando halos alrededor de las colonias, de color verde claro y textura en forma de césped. La cepa (N8.1-T) presentó una colonia de tonalidad verde oscuro, esporulenta y de superficie llana. La cepa (N1-G) mostró una colonia algodonosa de coloración verde y de crecimiento circular (Figura 2). Las hifas son ramificadas, conidióforos cortos, ramas fialidas cortas e infladas y lisas, y conidios pequeños.





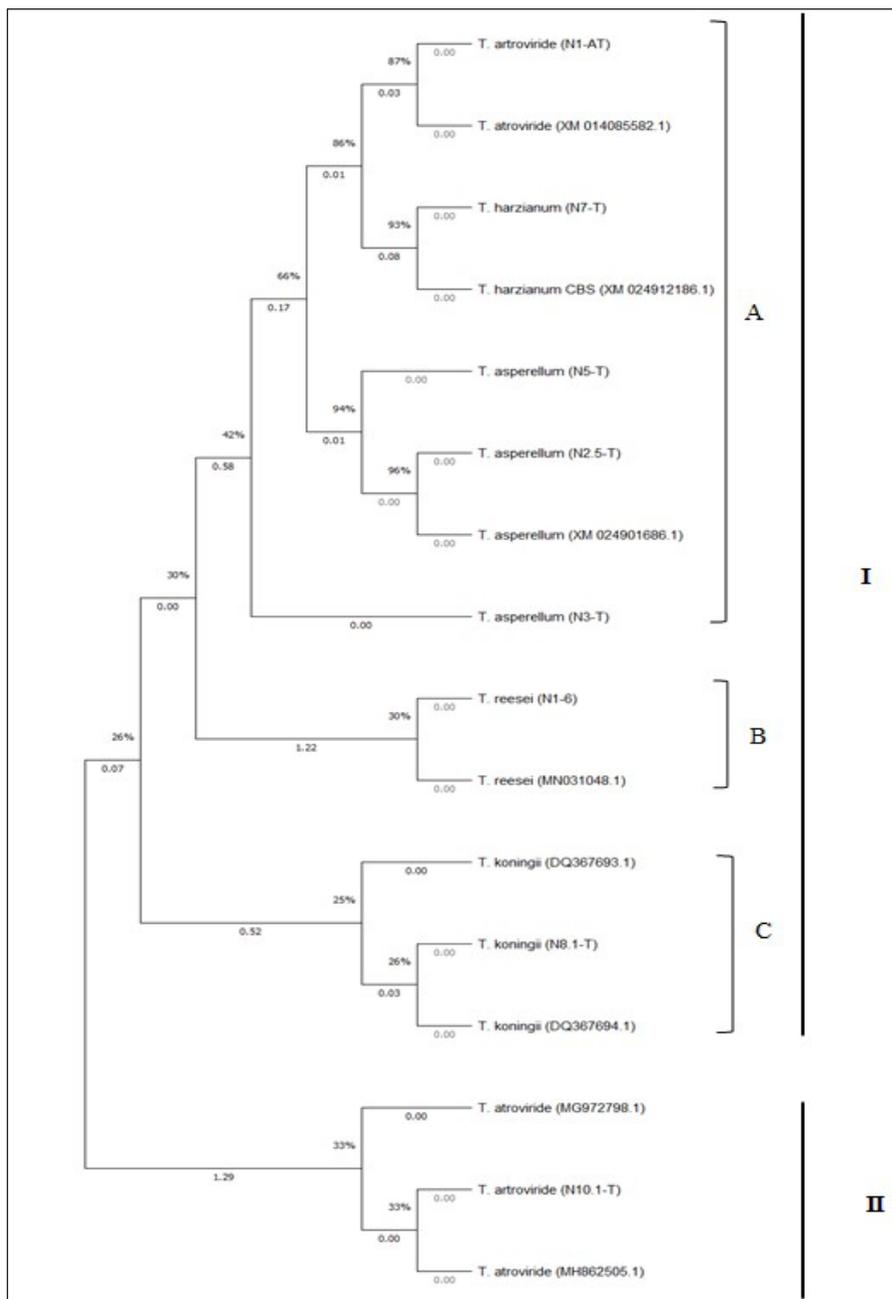
**Figura 2.** Características macroscópicas de los aislados de *Trichoderma* spp. Se visualizaron aislados fúngicos en placa Petri con PDA incubadas por 8 días a 29 C.

Se extrajo el ADN de las cepas aisladas e identificadas aplicando la técnica PCR, a través del análisis de la región ITS, utilizando los primers universales ITS 1 y 4, el código de barras de ADN empleó secuencias estandares de 500 a 800 pb en la identificación de los microorganismos, comparados con las secuencias del NCBI (Tabla 8).

**Tabla 6.** Caracterización genética de *Trichoderma* por amplificación de la región ITS

Fuente	Coloración de las cepas	Origen del aislado	Identidad a la Base de datos de GenBank de Greengenes			
			Organismo	Cepa	Identidad	Numero de accesion
N1-G	Verde	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma reesei</i>	QM6a	30%	MN031048.1
N7-T	Verde-amarillo claro	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma harzianum</i>	CBS 226.95	93%	XM_024912186.1
N1A-T	Verde oscuro	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	IMI 206040	87%	XM_014085582.1
N2.5-T	Verde claro	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	CBS 433.97	96%	XM_024901686.1
N3-T	Verde claro	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	ACCC 32725	42%	MF049065.1
N5-T	Verde claro	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma asperellum</i>	CBS 433.97	94%	XM_024901686.1
N10.1-T	Verde oscuro+pústulas blancas	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma atroviride</i>	CBS 142.95	33%	MH862505.1
N8.1-T	Verde	Raíces <i>Brassicaceae</i> <i>olaracea</i>	<i>Trichoderma koningii</i>	GJS 89-122	26%	DQ367694.1

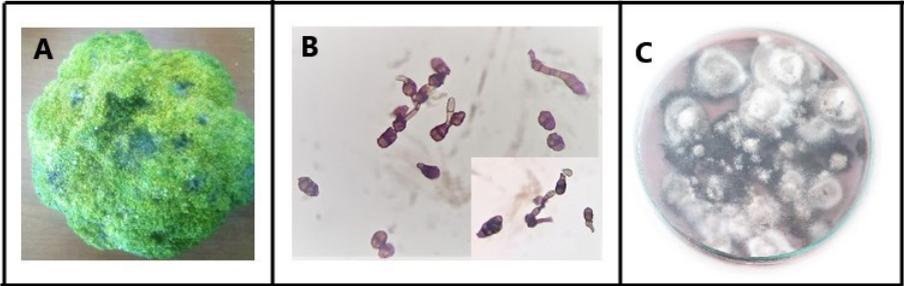
El análisis filogenético por secuenciación a la región ITS1, ITS2 y el gen 5.8S del ADNr de los ocho ecotipo de *Trichoderma* se agrupan en dos clados principales con un soporte de bootstrap del 96 %. El Grupo I reúne al Subgrupo A, con tres cepas *T. atroviride* (N1A-T), *T. harzianum* (N7-T) y *T. asperellum* (N2.5-T, N5-T, N3-T). El Subgrupo B, reúne a la cepa de *T. reesei* (N1-G). La formación del Subgrupo C, conforma el ecotipo *T. koningii* (N8.1-T), obtenidas de NCBI con su numero de accesoión. El Grupo II reúne a la cepa *T. atroviride* (N10.1 T) la formación de este clado indica distinción genética dentro del género *Trichoderma* (Figura 3).



**Figura 3.** Árbol filogenético basado en secuencias transcritas internas (ITS) de los aislados de *Trichoderma* seleccionados. El árbol se generó a partir de las secuencias ITS mediante el método de unión de secuencias nucleotídicas utilizando MEGA 5.

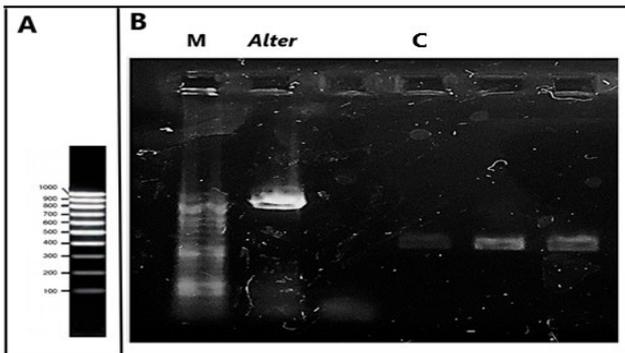
## 4.2 Aislamiento e identificación del patógeno *Alternaria spp*

Las conidias son de color amarillo pardo en forma tabicada, septada y con cadenas ramificadas. Las colonias presentaron una coloración al comienzo gris y luego se fue tornando negra, con apariencia sedosa y consistencia algodónosa (**Figura 4**).



**Figura 4.** Aislamiento de cultivos puros de *Alternaria spp*. A, muestras de pellas de brócoli infectadas con pudriciones en estadio 4-5. B, características microscópicas de *Alternaria spp*. C, cultivos puros de *Alternaria spp* a los 8 días de incubación a 29 C.

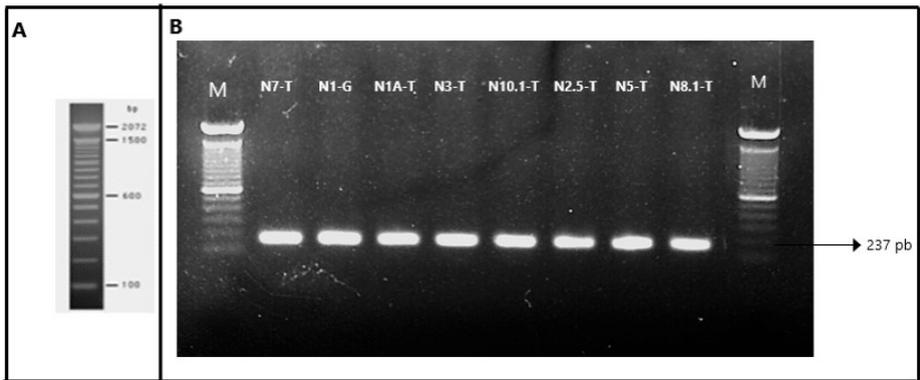
El ADNg fue extraído de los aislamientos purificados e identificados mediante la técnica PCR, codificando la región ITS 1 y 4, con un producto de amplificación de 800 pb. La secuencia fue 100 % homologa a la cepa *A. brassicae* AB3Boda obtenida de NCBI con el número de acceso MZ722981.1 (Figura 5).



**Figura 5.** Identificación de *Alternaria spp* mediante PCR. A, Marcador molecular Lader 1000bp B, identificación mediante PCR de *Alternaria*: Carriles: M, marcador de peso molecular; *Alternaria spp*; C, *F. oxysporum*.

### 4.3 Identificación del gen ech42 de actividad antifúngica presente en *Trichoderma spp*

La presencia del gen ech42 que codifica a la enzima endoquitinasa responsable de la producción de quitinasa, fue analizado a partir del DNA genómico de los aislados identificados molecularmente. Con el empleo de los partidores ech42, se genera un amplicon de 237 pb del gen ech42, para las cepas N7-T, N1-G, N1A-T, N3-T, N10.1-T, N2.5-T, N5-T, N8.1-T (**Figura 6**).



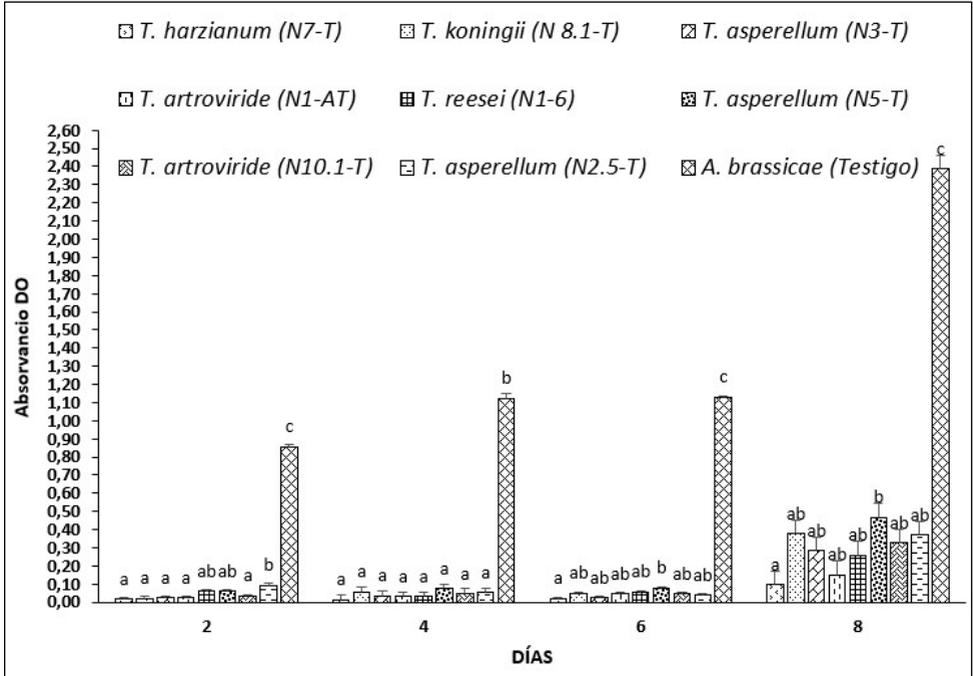
**Figura 6.** Amplificación del gen ech42 por PCR en *Trichoderma spp*. A, Marcador molecular Lader Invitrogen 1000bp. B, Carril: M, marcador de peso molecular; carriles N7-T, N1-G, N1A-T, N3-T, N10.1-T, N2.5-T, N5-T, N8.1-T: corresponde a ADN genómico de los aislados de *Trichoderma*.

### 4.4 Evaluación antagonista de los extractos celulares de *Trichoderma* en inhibición al desarrollo micelial de *Alternaria spp*

En condiciones in vitro se evaluó el efecto de los metabolitos celulares de las cepas de *Trichoderma* identificadas: (*T. harzianum*, *T. koningii*, *T. asperellum*, *T. resei* y *T. atroviride*) sobre el crecimiento micelial de *A. brassicae* para analizar su actividad antagonista. Los ensayos se realizaron al 10% y evaluados por 2, 4, 6 y 8 días (**Figura 7**).

El mayor efecto antagónico para los 2 días post-incubación con la cepa *T. harzianum* presentó una DO de 0,016 que representa el menor crecimiento micelial *A. brassicae*. Las cepas de *T. koningii* (N8.1-T) y *T. asperellum* (N3-T) mostraron un efecto inhibitorio

al desarrollo del tejido micelial hacia *Alternaria* con 0.020 y 0.024. Las cepas de *T. atroviride* (N1-AT y N10.1-T) presentaron un crecimiento micelial de 0.025 y 0.034 de DO. Las cepas de *T. reesei* (N1-G) y *T. asperellum* (N5-T y N2.5T) obtuvieron un crecimiento micelial 0.06. Sin aplicación del metabolito, mostro una DO de 0.85 observando el desarrollo del tejido micelial, para su evaluación a los 2 días.



**Figura 7.** Evaluación de la inhibición al crecimiento micelial de *A. brassicae* por los extractos celulares de *Trichoderma*. Evaluación del efecto de los metabolitos de las cepas *T. harzianum*, *T. asperellum*, *T. koningii*, *T. atroviride*, *T. reesei* y sin control durante 8 días. Las barras de error indican  $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

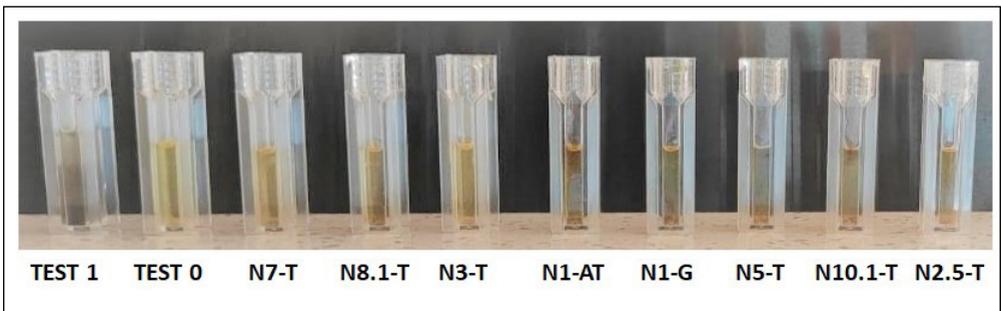
La evaluación a los **4 días** post-incubación presentó el mayor efecto antagónico la cepa *T. harzianum* (N7-T) con una DO de 0.017 que representa el menor crecimiento micelial *A. brassicae*. La cepa *T. atroviride* (N1A-T) mostró una DO de 0.032 retardando la formación del tejido micelial del hongo patógeno. Se observa que los efectos de los extractos celulares de las cepas *T. koningii* (N8.1-T)



y *T. asperellum* (N5-T) tuvieron el menor efecto antagonista sobre *Alternaria* con un valor de 0.057 y 0.075 de DO respectivamente. El tratamiento testigo (sin aplicación) presentó un crecimiento micelial de 1.12 de DO.

A los **6 días** se observa el mayor efecto inhibitorio al crecimiento micelial del hongo por *T. harzianum* (N7-T) con 0.02 de DO indicando que el micelio no tuvo mayor crecimiento durante los seis días. Las cepas *T. asperellum* (N3-T y N2.5-T) retrasaron la formación del tejido micelial con una OD de 0.026 y 0.037. Las cepas *T. atroviride* (N10.1-T, N1A-T), *T. koningii* (N8.1-T) y *T. reesei* (N1-6) mostraron un crecimiento micelial 0,047, mientras que en las cepas de *T. asperellum* (N5-T) muestra menor efecto antagonista con un valor de 0.056 de DO. Sin la aplicación del extracto celular presentó una DO de 1.13.

El mayor efecto antagónico de los extractos celulares a los **8 días** post-inoculación con la cepa *T. harzianum* presentó una DO de 0.096 mostrando el menor crecimiento micelial hacia *A. brassicae*. *T. atroviride* (N1-AT) y *T. asperellum* (N3-T) con 0.15 y 0.28 respectivamente, presentando un efecto inhibitorio del tejido micelial. Los aislados de *T. atroviride* (N10.1-T), *T. asperellum* (N2.5-T), *T. koningii* (N8.1-T) y *T. reesei* (N1-6) La cepa *T. asperellum* (N5-T) mostró un crecimiento acelerado con una DO de 0.47 teniendo menor control sobre el hongo *Alternaria*. Sin aplicación de los extractos celulares mostró una DO de 2.39 (**Figura 8**).



**Figura 8.** Crecimiento micelial de *A. brassicae* en cubetas de espectrofotómetro para medir el DO

## 4.5 Evaluación de la capacidad protectora de *Trichoderma* a problemas de pudriciones ocasionado por *Alternaria* en el cultivo de brócoli

### 4.5.1 Evaluación de altura (cm) y peso radicular (gr) en plántulas bajo invernadero

De los aislados de *Trichoderma* se prepararon bioproductos, donde se evaluó el efecto bioestimulante en las plántulas de brócoli en condiciones bajo invernadero a las 5 semanas de edad (Figura 9).

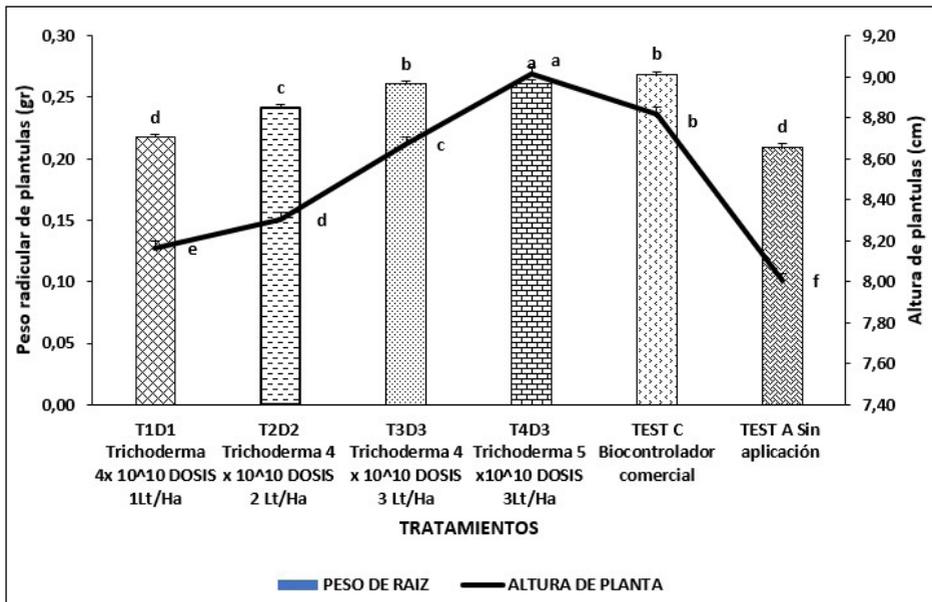


Figura 9. Evaluación del peso radicular y altura en plántulas de brócoli. Evaluación de plántulas de brócoli bajo invernadero a las 5 semanas de edad. Las barras de error indican  $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0,05$  (prueba de Tukey).

El T4D3 (*Trichoderma* 5 x 10<sup>10</sup>DOSIS 3Lt/Ha) mostró el mayor efecto estimulante en las plántulas con un peso de masa radicular de 0.31 gr y una altura de 9.01 cm. El T3D3 (*Trichoderma* 4 x 10<sup>10</sup> DOSIS 3 Lt/Ha) presentó una masa radicular de 0.26 gr y 8.67 cm de altura, promoviendo el crecimiento de las raíces en las plántulas. El T2D2

(*Trichoderma*  $4 \times 10^{10}$ DOSIS 2 Lt/Ha) y T1D1 (*Trichoderma*  $4 \times 10^{10}$ DOSIS 1Lt/Ha) mostraron un peso radicular de 0.24 y 0.22 gr; una altura de 8.30 y 8.16 cm respectivamente. El testigo absoluto mostró el menor peso radicular con 0.21 gr y una altura de 8 cm en plántulas. El testigo comercial obtuvo 0.27 gr de masa radicular y 8.82 cm de altura, presentando un efecto estimulante en las plantas similar al T4D3 (**Figura 10**).



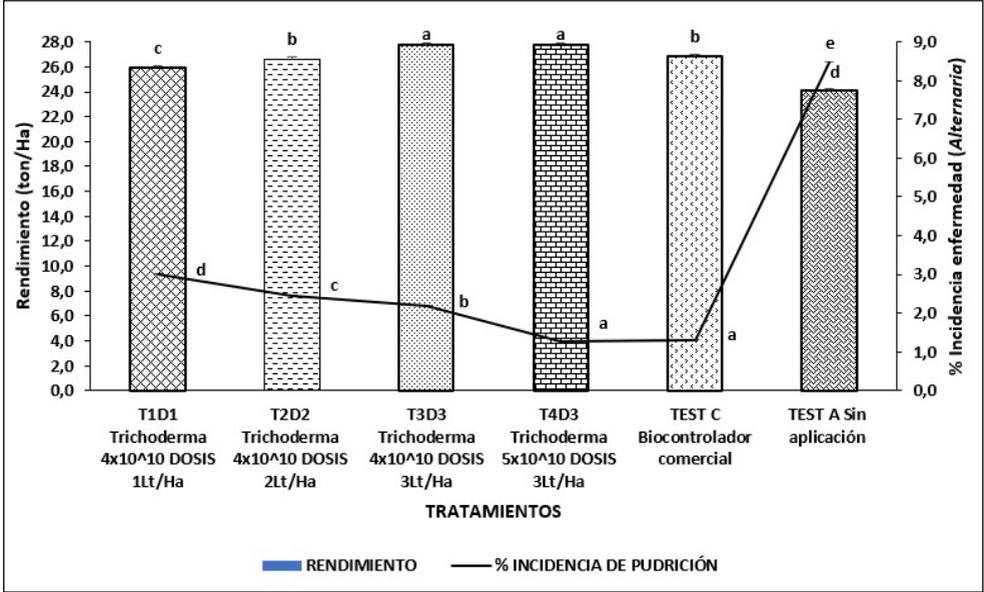
**Figura 10.** Plántulas de brócoli con 5 semanas de edad. Efecto de los bioproductos elaborados a base de *Trichoderma spp* en diferentes dosis y concentraciones.

#### 4.5.2 Evaluación de incidencia de pudrición (%) y rendimiento (ton/Ha)

Se evaluó el efecto antagonístico y bioestimulante del *Trichoderma* en el cultivo de brócoli a las 14 semanas (edad del cultivo). El mayor efecto antagonístico se observó con T4D3 con 1.27% de incidencia en pudrición demostrando que *Trichoderma* proporciona una resistencia sistémica inducida a la planta a problemas patogénicos en campo. El T3D3 mostró un efecto inhibitorio al crecimiento del hongo con una incidencia del 2.18%. El T2D2 y el T1D1 presentaron mayor incidencia de pudriciones en las pellas con 2.45 y 2.99%, donde las dosis de *Trichoderma* disminuyen su efecto antagonístico sobre *Alternaria* en campo. El testigo absoluto mostró un 8.46% de incidencia, mientras que el testigo comercial presentó 1.29% de incidencia de pudrición en las plantas (**Figura 11**).

Los tratamientos que presentaron mayor rendimiento fue el T4D3 con 27.78 ton/Ha y el T3D3 con 27.75 ton/Ha, observando un

efecto estimulante en las pellas de las plantas. El tratamiento T2D2 obtuvo un rendimiento de 26.64 ton/Ha. El tratamiento T1D1 obtuvo menor rendimiento con 25.96 ton/Ha. El testigo absoluto (sin aplicación) mostró un rendimiento de 24.15 ton/Ha, mientras que el testigo comercial mostró un rendimiento de 26.85 ton/Ha.



**Figura 11.** Evaluación de Incidencia de pudriciones y Rendimientos en el cultivo de brócoli. Evaluación de plantas de brócoli en campo a las 14 semanas de edad desde el trasplante. Las barras de error indican  $\pm$ ES; diferentes letras indican diferencias significativas entre los promedios a  $p < 0.05$  (prueba de Tukey).

## V. DISCUSIÓN

### 51 Aislamiento e identificación morfológica y molecular de especies de *Trichoderma*

Las funciones de los microorganismos son de importancia para el proceso de descomposición y el intercambio de nutrientes con las plantas, siendo de vital importancia para determinar la productividad de la planta. La presente investigación inicio con la búsqueda de cepas del género *Trichoderma* en la zona de Latacunga para obtener cepas nativas y que presenten actividad antagonista hacia el hongo *Alternaria*.

Se estableció una colección de *Trichoderma spp* que comprenden ocho cepas de la rizosfera de *Brásicas* (Figura 2). Estas especies de hongos saprofitos son encontrados comúnmente en la rizósfera del suelo y son usados como agentes biocontroladores de varios microorganismos fitopatógenos (Joshi & Misra, 2013). El 90% de hongos biocontroladores que existen en la rizosfera pertenecen al género *Trichoderma* (Hermosa et al., 2017). El rápido crecimiento de *Trichoderma* le da una ventaja adicional en la competencia por el espacio y los nutrientes con los hongos patógenos de las plantas, incluso antes de que despliegue su producción de micotoxinas (Singh et al., 2018).

La identificación morfológica de ecotipos de *Trichoderma* crecidos en medio PDA se caracterizaron por poseer colonias circulares, halos concéntricos y coloración verde, micelio algodonoso, hifas ramificadas y conidios pequeños. Coincidiendo con Rifai, (1969) el género *Trichoderma* posee caracteres morfológicos similares: colonias verdes, hifas ramificadas y conidios ovoides pequeños. Kucuk & Kivanc, (2012) aislaron 31 cepas de *Trichoderma* la cual todas presentaron colonias con tonalidades verdes y abundante formación de esporas. Estas características permiten la identificación fácil de *Trichoderma* como género, pero los conceptos de especies son difíciles de interpretar (Rodríguez et al., 2020).

La identificación molecular de los aislados fúngicos se determinó amplificando la región ITS dando un amplicón de 800 pb (Figura 3). El código de barras de ADN emplea secuencias estándares de 500 a 800 pb para identificar especies de todos los reinos eucariotas utilizando una amplia gama de imprimaciones (Porter & Golding, 2018). Entre los diferentes métodos de secuenciación nucleotídica, aquellos que se dirigen a la región ITS tienen la mayor probabilidad de identificación exitosa de la más amplia gama de hongos (Kruger et al., 2019).

Se identificaron ocho ecotipos de *Trichoderma* se agrupan en dos clados principales. El Grupo I reúne al Subgrupo A, con tres cepas *T. artroviride* (N1A-T), *T. harzianum* (N7-T) y *T. asperellum* (N2.5-T, N5-T, N3-T). Estas cepas se agrupan en base a su semejanza genética y producen las hidrofobinas TasHyd1 y Qid74, proteínas ricas en cisteína que facilitan el desarrollo radicular de plantas (Viterbo & Chet, 2016). Activan la resistencia sistémica inducida (ISR) que se activa por las vías de jasmonato (JA) y el etileno (ET) y producen gran cantidad de metabolitos tales como trichoharzinin, 3-acido-indolacético, 2,4-dimetilbenzeno (Shoresh et al., 2019). Además, producen la enzima superóxido dismutasa (SOD) que cataliza la dismutación del anión superóxido en peróxido de hidrógeno disminuyendo el estrés oxidativo en plantas (Ighodarab & Akinloye, 2018). El Subgrupo B, reúne a la cepa de *T. reesei* (N1-G). Produce altos niveles de celulasa por medio del inductor soforosa, sintetizado a partir de glucosa en la reacción de transglicosilación por BGLI/Cel3A durante la hidrólisis de celulosa (Castro et al., 2014). La formación del Subgrupo C, conforma el ecotipo *T. koningii* (N8.1-T). Szymanska et al., (2018) indican alta tolerancia al cobre y herbicidas de cloroacetanilida al activarse el citocromo P450 y lacasa del ecotipo, siendo capaz de biorremediar áreas agrícolas contaminadas.

El Grupo II reúne al biotipo *T. artroviride*, produce dos tipos de sideróforos: hidroxamato y catecol (Colla et al., 2015). Expresa el gen LOX2 y PR-1a que están relacionados a la patogenia y son regulado por el ácido salicílico (Contreras et al., 2016). La 6PP (6-



pentyl-2H-pyran-2-one) y 1-octen-3-ol derivados de *T. atroviride* estimulan el crecimiento y la defensa sistémica en tomate.

## 5.2 Determinación de la presencia del gen ech42 en *Trichoderma spp*

Todas las cepas aisladas de *Trichoderma spp* se analizaron mediante la identificación de PCR mostrando la producción de la enzima endoquitonasa expresando el gen ech42 que generó un amplicón de 237 pb. Concordando con Gómez et al., (2018) que obtuvo un amplicón de 237 pb de longitud para la cepa de *Trichoderma atroviride* utilizando el método de PCR. Las quitinasas son metabolitos que incorporan proteínas que muestran actividad enzimática expresados por genes no virulentos y de bajo peso molecular, producidos en la degradación enzimática hidrolítica de células fúngicas o vegetales (Ahluwalia et al., 2015). Las enzimas quitinasas y glucanasas mejoran la resistencia en plantas contra los patógenos, expresando el gen relacionado con la patogenicidad (PR) jugando un papel importante en la respuesta de defensa (Karuppiyah et al., 2019). Así mismo, la quitinasa derivada de *T. harzianum* (Chit42), expresada en plantas de tabaco y papa condujo al desarrollo de líneas transgénicas extremadamente tolerantes hacia patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata*, *A. solani* y *Botrytis cinerea* (Howell, 2013).

## 5.3 Aislamiento e identificación molecular del patógeno *Alternaria spp*

Se obtuvieron cultivos puros del aislamiento de *Alternaria* a partir de pellas infectadas de brócoli en estadio 4 y 5. Los conidios presentaron una tonalidad amarillo pardo, septadas y tabicadas. Las colonias presentaron una tonalidad gris y algodonosa (Figura 4). Concordando con Mandal et al., (2018) los conidios de *A. brassicae* son de tonalidad parda, septadas y con una forma tabicada. Rajarammohan et al., (2017) indica que las colonias aisladas de *A. brassicae* son de coloración grisácea y luego se tornan a coloración negra con un micelio algodonoso. Así mismo Urooj et al., (2019) señala que las características principales de *A. brassicae*

en caja Petri fue su tonalidad oscura desde los primeros días de incubación mostrando a los 8 días de crecimiento una colonia de coloración negra con leve pigmentación grisácea en la parte superior. La identificación molecular de *Alternaria* mediante la técnica de PCR se realizó utilizando la región ITS 1 y 4 obteniendo un amplicon de 800 pb, siendo homólogo a *A. brassicae* (Figura 5) concordando con Woudenberg et al., (2013) cuando realizaron la identificación molecular de *Alternaria* spp con los ITS 1 y 4, obteniendo un amplicon de 800 pb.

#### **5.4 Inhibición de crecimiento micelial de *A. brassicae***

En este ensayo se verificaron efectos inhibitorios al crecimiento micelial de *A. brassicae* con los metabolitos estudiados en condiciones in vitro. Los metabolitos de *T. harzianum* (N7-T), *T. atroviride* (N1-AT) y *T. asperellum* (N3-T) tuvieron el mayor efecto antagónico, inhibiendo el crecimiento micelial del patógeno. En el mecanismo de acción por antibiosis es donde se producen la mayor cantidad de metabolitos secundarios (Masi et al., 2018). *Trichoderma* tiene la capacidad de sintetizar diferentes metabolitos defensivos denominados policétidos, a través de eventos secuenciales catalizados por un complejo enzimático llamadas sintasas (PKS) (Turaga, 2020). Las especies de *Trichoderma* tiene un gran efecto antagónico por la gran producción de metabolitos secundarios que son aislados del filtrado de un medio de cultivo (Hu et al., 2017). *T. harzianum* produce tricholonginas BI y BII que son utilizadas para el control de *R. solani* en el cultivo de papa (Howell, 2013). Así mismo Manganiello et al., (2018) señala que el ácido harziánico aislado de *T. harzianum* presenta una actividad antibiótica hacia *Pythium irregulare*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *R. solani* en placas in vitro.

#### **5.5 Evaluación de la capacidad protectora de *Trichoderma* a problemas de pudriciones ocasionado por *Alternaria* en el cultivo de brócoli**

El T4D4 (*Trichoderma*  $5 \times 10^{10}$  DOSIS 3Lt/Ha) mostró el mayor efecto estimulante en las plántulas con peso radicular de 0.31 gr y altura de



9.01 cm (Figura 9). Samuels & Hebbbar, (2015) indican formulaciones fúngicas a base de *Trichoderma* se han comercializado en los últimos años para el crecimiento de las plantas y control de enfermedades aplicándolas en semillas tratadas y trasplantes u otros. Harman et al., (2019) mostró que en la asociación de plántulas de maíz y *Trichoderma* mejoro el crecimiento tanto de los brotes como de las raíces de las plantas, lo que a su vez condujo a aumentos de rendimientos. La colonización por *Trichoderma* en planta mono y dicotiledóneas causan variaciones notables en el metabolismo de las plantas. Estas alteraciones incluyen principalmente en la biosíntesis de los reguladores de crecimiento, fotosíntesis transpiración y potencial hídrico (Brotman et al., 2015). Las raíces de las plantas tratadas con *Trichoderma* han mostrado una mayor capacidad para explorar el suelo y una absorción mejorada de minerales. Según Harman et al., (2019) diferentes cepas de *Trichoderma* ácidos cumarico, glucorónico y cítrico, que ayudan en la descarga de iones de fosforo, que parecen ser inaccesibles para las plantas en la mayoría de los suelos (Zhao et al., 2014).

La presencia de la cepa *T. harzianum* 1295-22 en el suelo aumenta la disponibilidad de P, así como Fe y Zn en medio liquido (Altomare et al., 2015). La aplicación de la cepa T-203 también conocida como *T. asperelloides* mejoró la cantidad disponible de Fe y P en la rizosfera en una cantidad de 30 y 90%, respectivamente. Además, el crecimiento de raíces y brotes en respuesta a la inoculación de *Trichoderma* conduce a un aumento de la absorción de Cu, Na y Zn, así como a otros micronutrientes (Li et al., 2015). Harman et al., (2014) informaron que la aplicación de *T. asperellum* (T-6) en el cultivo de pepino aumentaron el contenido de Fe<sup>2+</sup> y sideróforos en el suelo, así como la actividad del quelato de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup>, destacando que la aplicación de *Trichoderma* ayuda a la reducción de estos quelatos, lo que permite el aumento de su solubilización y absorción (Colla et al., 2015).

El control de las enfermedades facilitado por los mediadores de biocontrol es un resultado de las interacciones entre los simbioses y comunidades patógenas de las plantas. En la evaluación de la

incidencia de pudriciones en las plantas de brócoli, el bioproducto de *Trichoderma* presentó mayor control sobre la enfermedad con 1.27% con una concentración 5 x10<sup>10</sup> DOSIS y 3Lt/Ha (Figura 11). *Trichoderma* es una de las especies más estudiadas por ser competentes en la rizósfera porque su estrategia clave de biocontrol se desarrolla en conflicto directo con los patógenos (Juliatti et al., 2019). Este complejo proceso incluye eventos secuenciales, que inicialmente implican el reconocimiento entre *Trichoderma* y el hongo patógeno y el enrollamiento alrededor de las hifas (Harman et al., 2014). Después de esta acción colectiva las enzimas líticas provocan la disolución de atacar las paredes celulares de los hongos. *Trichoderma atroviride* produce 6-pentil-2H-piranona (6-PP), un metabolito volátil que desempeña un papel fundamental en las interacciones entre *Trichoderma* y el patógeno (El-Hasan et al., 2018). Así mismo Tijerino et al., (2016) menciona que aisló de las cepas de *T. pseudokoningii* SMF2 tricoconinas VI que muestra acciones antibióticas, estimulando la PCD apoptótica de amplio espectro en una variedad de especies de hongos patógenos.

Estudios moleculares en *A. thaliana* revelaron que las raíces colonizadas por *T. asperelloides* T203 activaron rápidamente los factores de transcripción (WRK), los cuales suprimen la señalización del ácido salicílico (SA) y desencadena respuestas de la vía del ácido jasmonato (JA). Estos genes son inducidos por patógenos y su expresión codifica al gen WRK que son proteínas enlazadas estructuralmente enlazadas que desempeñan un papel clave en la defensa arbitraria por JA (Brotman et al., 2013). Concordando con Martínez et al., (2019) quienes amplificaron los niveles de SA y JA desde *T. harzianum* en el cultivo de melón y obtuvo resistencia contra el hongo *F. oxysporum*.

El rendimiento del cultivo de brócoli tratado con *Trichoderma* fue de 27,78 ton/Ha, mientras que el testigo absoluto solo presentó un rendimiento de 24 ton/Ha (Figura 11). Concordando con Ortuño et al., (2016) donde indican que con la aplicación de *Trichoderma* en el cultivo de cáñamo obtuvieron mayores rendimientos debidos a que el *Trichoderma* es un gran colonizador de la rizosfera y



además secreta ácido indol-3-acético (IAA). Así mismo Carillo et al., (2020) quienes confirmaron que la cepa T22 provocó aumento de licopeno en *Solanum lycopersicum*, un compuesto antioxidante y aumento el rendimiento. La producción de fitohormonas (incluidas las auxinas y giberelinas) después del proceso de colonización podrían explicar el incremento significativo de importantes rasgos agronómicos en las plantas con la altura, densidad de raíces y su rendimiento (Elkelish et al., 2020).

## VI. CONCLUSIONES

- Se logró el aislamiento e identificación molecular de cinco cepas del género *Trichoderma*: *harzianum*, *asperellum*, *koningii*, *ressei* y *atroviride*; y del patógeno *Alternaria brassicae*.
- Las cepas de *Trichoderma*: *harzianum*, *asperellum*, *koningii*, *ressei* y *atroviride* mostraron la presencia del gen *ech42* que codifica a la enzima endoquitinasa con un producto de amplificación de 237 pb.
- Los metabolitos de las cepas *T. harzianum* (N7-T) y *T. atroviride* (N1A-T) presentaron mayor control en el crecimiento del tejido micelial con una OD de 0.09 y 0.15.
- El tratamiento 4 (*Trichoderma* 5 x10<sup>10</sup> DOSIS 3Lt/Ha) mostró el mayor efecto estimulante y antagónico en las plantas de brócoli con un peso de masa radicular de 0.31 g; una altura de 9.01 cm; un rendimiento de 27.78 ton/Ha y una incidencia de pudriciones del 1.27%



## VII. RECOMENDACIONES

- Se recomienda analizar el efecto antagónico de las cepas de *Trichoderma* aisladas contra el hongo patogénico *Botrytis cinérea*
- Se recomienda evaluar de forma cuantitativa la producción de la enzima endoquitinasa desde las cepas de *Trichoderma* y ver su efecto antagónico sobre hongos fitopatógenos
- Identificar al menos cuatro metabolitos secundarios producidos por las cepas de *Trichoderma*
- Evaluar el costo/ beneficio del producto de *Trichoderma* formulado y un producto comercial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbey, J., Percival, D., Abbey, L., Asiedu, S., Prithiviraj, B., & Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol. Sci. Technol*, 29, 207 - 228.
- Ahluwalia, V., Kumar, J., Rana, V., Sati, O., & Walia, S. (2015). Comparative evaluation of two *Trichoderma harzianum* strains for major secondary metabolite production and antifungal activity. *Production Research*, 29, 914 - 920.
- Altomare, C., Norvell, W., Björkman, T., & Harman, G. (2015). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiology*, 10, 130 - 142.
- Ao, E., & Saud, K. (2016). Production potential of rapeseed (*Brassica rapa* var. *dichotoma*) based intercropping systems under rain fed conditions. *Journal of Oilseed Brassica*, 1, 91 - 97.
- Arbito, M. P. (2017). Evaluación in vitro de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana.
- Bargaz, A., Lyamlouli, K., Chtouki, M., Zeroual, Y., & Dhiba, D. (2018). *Front. Microbiology*, 9, 1606.
- Benítez, T., Rincón, A., Limón, M., & Codon, A. (2014). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiology*, 7, 249–260.
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A., Chet, I., . . . Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: Escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathog*, 9.



- Brotman, Y., Lisec, J., Méret, M., Chet, I., Willmitzer, L., & Viterbo, A. (2015). Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*, 158, 139 - 146.
- Brunner, K., Peterbauer, C., Mach, R., Lorito, M., Zeilinger, S., & Kubicek, C. (2013). The Nag1 N-acetylglucosaminidase of *Trichoderma atroviride* is essential for chitinase induction by chitin and of major relevance to biocontrol. *Curr. Genetic*, 43, 289 - 295.
- Carillo, P., Woo, S., Comite, E., Lanzuise, S., & Vinale, F. (2020). Application of *Trichoderma harzianum*, 6-Pentyl-pyrone and Plant Biopolymer Formulations Modulate Plant Metabolism and Fruit Quality of Plum Tomatoes. *Plants*, 9, 771.
- Carsolio, C., Gutierrez, A., Jimenez, B., Van, M., & Herrera, A. (2004). Characterization of ech-24, a *Trichoderma harzianum* endochitinase gene expressed during mycoparasitism. *Microbiology*, 91, 10903-10907.
- Castro, M. (2010). Identificación de hongos fitopatógenos asociados al roble (*Quercus humboldtii* bompl.) en los municipios de encino (Santander), arcabuco, y tipacoque (boyacá). Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas.
- Cho, Y., Davis, W., Kim, K., Wang, J., Sun, Q., Cramer, C., & Lawrence, C. (2016). A high throughput targeted gene disruption method for *Alternaria brassicicola* functional genomics using linear minimal element (LME) constructs. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 19, 7 - 15.
- Colla, G., Nardi, S., Cardarelli, M., Ertani, A., Lucini, L., Canaguier, R., & Roupahel, Y. (2015). Protein hydrolysates as biostimulants in horticulture. *Science Horticulture*, 196, 28 - 38.
- Delgado-Jarana, J., Moreno-Mateos, M., & Benítez, T. (2003). Glucose uptake in *Trichoderma harzianum*: Role of gtt1. *Eukaryot. Cell*, 2, 708 - 717.

- Dotson, B., Soltan, D., Schmidt, J., Areskoug, M., Rabe, K., Swart, C., . . . Rasmusson, A. (2018). The antibiotic peptaibol alamethicin from *Trichoderma permeabilis* Arabidopsis root apical meristem and epidermis but is antagonized by cellulase-induced resistance to alamethicin. *BMC Plant Biology*, 18, 165.
- Druzhinina, I. (2012). Molecular phylogeny and species delimitation in the section *Longibrachiatum* of *Trichoderma*. *Fungal Genet Biology*, 49(5), 358 - 368.
- Druzhinina, I. (2016). The *Trichoderma harzianum* demon: complex speciation history resulting in coexistence of hypothetical biological species, recent agamospecies and numerous relict lineages. *Evolution Biology*, 179 - 189.
- El-Hasan, A., Walker, F., & Buchenauer, H. (2018). *Trichoderma harzianum* and its metabolite 6-pentyl-alpha-pyrone suppress fusaric acid produced by *Fusarium moniliforme*. *Journal Phytopathology*, 156, 79 - 87.
- Elkelish, A., Alhaithoul, H., Qari, S., Soliman, M., & Hasanuzzaman, M. (2020). Pretreatment with *Trichoderma harzianum* alleviates waterlogging-induced growth alterations in tomato seedlings by modulating physiological, biochemical, and molecular mechanisms. *Environ Exp Botanic*, 171, 103946.
- Faculty, M. R. (2014). *Prostate Cancer (Prostate problems, Cancer of Prostate)*. New York: MediaResources Inc. & Postmedia Network Inc.
- FAO. (2020). *Produccion de brocoli a nivel mundial*. 1 - 5.
- Fesel, P., & Zuccaro, A. (2016). B-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genet. Biology*, 90, 53 - 60.
- Ghose, K., Dey, S., Barton, H., Loake, G., & Basu, D. (2016). Differential profiling of selected defence-related genes induced on challenge



with *Alternaria brassicicola* in resistant white mustard and their comparative expression pattern in susceptible India mustard. *Molecular Plant Pathology*, 9, 763 - 775.

Guijon, C., Guerrero, P., Vargas, F., Carvajal, E., Avila, G., Bravo, L., . . . Lorito, M. (2010). Molecular identification of *Trichoderma* spp strains, in vitro growth rate and antagonism against plant pathogen fungi. . *Phytopathology*, 87.

Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96(2), 190 - 194.

Harman, G. (2010). Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, 377- 393.

Harman, G., Doni, F., Khadka, R., & Uphoff, N. (2019). Endophytic strains of *Trichoderma* increase plant photosynthetic capability. *Journal Applied Microbiology*, 8, 1 - 18.

Harman, G., Howell, C., Viterbo, A., Chet, I., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts. *Microbiology*, 2, 43 - 56.

Harwoko, H., Daletos, G., Stuhldreier, F., Lee, J., Wesselborg, S., Feldbrügge, M., . . . Proksch, P. (2019). Dithiodiketopiperazine derivatives from endophytic fungi *Trichoderma harzianum* and *Epicoccum nigrum*. *Nat. Prod. Research*, 1 - 9.

Hedestrom, N. (2018). *Vegetables and Fruits for Health: Broccoli and Cauliflower*. Arizona: Cooperative Extension Publications. University of Main.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2017). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158, 17 - 25.

Herrera, F. A. (2016). Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis

de Patogenicidad de *Alternaria* spp. sobre botones de Rosa (*Rosa* sp) y plantas de brócoli (*Brassica oleracea* var. *Italica*). Quito: Universidad San Francisco de Quito.

Hillock, D. (2016). Growing Broccoli, Cauliflower and Cabbage. Oklahoma: Oklahoma State University, Oklahoma Cooperative Extension Service.

Howell, C. (2013). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases. *Plant Disease*, 87(1), 4 - 10.

Hu, M., Li, Q.-L., Yang, Y.-B., Liu, K., Miao, C.-P., Zhao, L.-X., & Ding, Z. (2017). T. Koninginins RS from the endophytic fungus *Trichoderma koningiopsis*. *Nat. Production Research*, 31, 835 - 839.

Hyder, S., Inam-ul-Haq, M., Bibi, S., Humayun, A., Ghuffar, S., & Iqbal, S. (2017). Novel potential of *Trichoderma* spp. as biocontrol agent. *Journal Entomology Zoology Study*, 5, 214 - 222.

Ighodarab, O., & Akinloye, O. (2018). First line defence antioxidantes-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Journal Medical*, 54, 287 - 293.

INEC. (2019). Cosecha de brocoli en Ecuador. ESPAC, 1 - 4.

Jaramillo, J., & Díaz, C. (2016). El Cultivo de las Crucíferas. Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-CORPOICA.

Johanson, A. (1994). The use of species-specific DNA probes for the identification of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. musicola*, the causal agents of Sigatoka disease of banana. *Plant Pathology*, 43, 701-707.

Joshi, D., & Misra, S. (2013). Characterization of *Trichoderma* isolates from sugarcane agro-ecosystem and their efficacy against *C. falcatum*



causing red rot of sugarcane. *Sugar Tech*, 15, 192 - 196.

- Juliatti, F., Rezende, A., Juliatti, B., & Morais, T. (2019). *Trichoderma* as a Biocontrol Agent against *Sclerotinia* Stem Rot or White Mold on Soybeans in Brazil: Usage and Technology. In *Trichoderma-The Most Widely Used Fungicide*. London, UK: IntechOpen.
- Karuppiyah, V., Li, T., Vallikkannu, M., & Chen, J. (2019). Co-cultivation of *Trichoderma asperellum* GDFS1009 and *Bacillus amyloliquefaciens* 1841 causes differential gene expression and improvement in the wheat growth and biocontrol activity. *Front Microbiology*, 10, 1068.
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Plant Science*, 10, 845.
- Krüger, M., Krüger, C., Walker, C., Stockinger, H., & Schüßler, A. (2019). Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytopatology*, 193, 970 - 984.
- Kumar, D., Maurya, N., Bharati, Y., Kumar, A., Kumar, K., Srivastava, K., & Chand, G. (2014). *Alternaria* blight of oilseed Brassicas: A comprehensive review. *African Journal of Microbiology Research*, 8, 2816 - 2829.
- Kumar, S. (2013). *Trichoderma*: A biological weapon for managing plant diseases and promoting sustainability. *Journal Agricultural Science*, 106-121.
- Lawrence, D., Gannibal, P., Peever, T., & Pryor, B. (2016). The sections of *Alternaria*: Formalizing species-groups concepts. *Mycologia*, 105, 530 - 546.
- Li, G., Zheng, L., Liu, F., Dang, L., Li, L., Huang, R., & Zhang, K. (2019). New cyclopentenones from strain *Trichoderma* sp. YLF-3. *Nat. Prod. Res*, 23, 1431 - 1435.

- Li, R.-X., Cai, F., Pang, G., Shen, Q.-R., Li, R., & Chen, W. (2015). Solubilisation of phosphate and micronutrients by *Trichoderma harzianum* and its relationship with the promotion of tomato plant growth. *PLoS ONE*, 65, 2926 - 2933.
- Lorito, M., Woo, S., Harman, G., & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: From 'omics to the field. *Phytopathology*, 48, 395 - 417.
- Ma, X. (2018). Secondary Metabolites from Three Marine Sediment-Derived Fungi and Their Bioactivities. *Microbiology*, 48, 705 - 711.
- Macario, O., & Mondragoan, R. (2017). Histone Deacetylase HDA-2 Regulates *Trichoderma atroviride* Growth, Conidiation, Blue Light Perception, and Oxidative Stress Responses. *Appl Environ Microbiology*, 83, 1 - 9.
- MAGAP. (2020). Exportaciones del brocoli. 1 - 5.
- Mahmood, A., & Kataoka, R. (2018). Potential of biopriming in enhancing crop productivity and stress tolerance. In *Advances in Seed Priming*. Springer, 127-145.
- Mandal, S., Rajarammohan, S., & Kaur, J. (2018). *Alternaria brassicae* interactions with the model Brassicaceae member *Arabidopsis thaliana* closely resembles those with Mustard (*Brassica juncea*). *Physiology Mol Biology Plants*, 24, 51 - 59.
- Manganiello, G., Sacco, A., Ercolano, M., Vinale, F., Lanzuise, S., Pascale, A., . . . Woo, S. (2018). Modulation of tomato response to *Rhizoctonia solani* by *Trichoderma harzianum* and its secondary metabolite harzianic acid. *Front. Microbiology*, 9, 1966.
- Martinez, B., Reyes, Y., & Infante, D. (2016). Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp candidatos a biofungicidas para el control de *Trichoderma* sp. en arroz. *Protección Vegetal*, 23(2), 118 - 125.



- Martínez-Medina, A., Pascual, J., Pérez-Alfocea, F., Albacete, A., & Roldán, A. (2019). *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. *Phytopathology*, 100, 682 - 688.
- Masi, M., Nocera, P., Reveglia, P., Cimmino, A., & Evidente, A. (2018). Fungal metabolites antagonists towards plant pests and human pathogens: Structure-activity relationship studies. *Molecules*, 23, 834.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M., & Takenaka, S. (2019). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/ in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbes Environ.*, 110 - 118.
- Masunaka, A., Hyakumachi, M., & Takenaka, S. (2019). Plant growth-promoting fungus, *Trichoderma koningi* suppresses isoflavonoid phytoalexin vestitol production for colonization on/ in the roots of *Lotus japonicus*. *Microbiology*, 11(2), 230 - 277.
- McIntyre, M., Nielsen, J., Arnau, J., van der Brink, H., Hansen, K., & Madrid, S. (2014). Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. (págs. 7 - 20). Denmark: Copenhagen.
- Meena, P., Awshi, R., Chattopadhyay, C., Kolte, S., & Kumar, A. (2016). *Alternaria* blight: A chronic disease in rapeseed-mustrad. *Journal of Oliseed Brassica*, 1, 1 - 11.
- Miethke, M. (2013). *Metallomics*, 5, 15 - 28.
- Monte, E. (2011). Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. *Int. Microbiology*, 4, 1 - 4.
- Morán-Diez, E., Hermosa, R., Ambrosino, P., Cardoza, R., Gutiérrez, S., Lorito, M., & Monte, E. (2009). The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the *Trichoderma harzianum*-plant beneficial interaction. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 22, 1021-1031.

- Mukherjee, P., Horwitz, B., & Kenerley, C. (2012). Secondary metabolism in *Trichoderma*—a genomic perspective. *Microbiology*, 158, 35 - 45.
- Nugra, A. (2018). Evaluación de sustrato orgánicos para la propagación del *Trichoderma* spp. Cuenca: Universidad Politécnica Salesiana sede Cuenca.
- Ñacato, C. A., & Valencia, M. F. (2016). Aislamiento, identificación y pruebas in vitro de cepas autóctonas de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de *Alternaria* spp en *Brassica oleracea* var, *Italica*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Omomowo, O., & Babalola, O. (2019). Bacterial and Fungal Endophytes: Tiny Giants with Immense Beneficial Potential for Plant Growth and Sustainable Agricultural Productivity. *Microorganisms*, 7, 481.
- Ortuño, N., Castillo, J., Mianda, C., Claros, M., & Soto, X. (2016). The use of secondary metabolites extracted form *Trichoderma* for plant growth promotion in the Andean highlands. *Renew Agric Food System*, 32, 366 - 375.
- Panth, M., Hassler, S., & Baysal-Gurel, F. (2020). Methods for Management of Soilborne Diseases in Crop Production. *Agriculture*, 10, 16.
- Persoon, C. (1794). *Disposita methodical fungorum*. Romers. Neues. Mag. Bot, 81 - 128.
- Porter, T., & Golding, G. (2011). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons. *New Phytol*, 192, 775 - 782.
- Porter, T., & Golding, G. (2018). Are similarity- or phylogeny-based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomic amplicons. *New Phytology*, 192, 775 - 782.
- Prado, R. (2010). Genetic distances within and among species in monophyletic lineages of *Parmeliaceae* (Ascomycota) as a tool for



taxon delimitation. *Mol Phylogenet Evolution*, 56, 125 - 133.

Rajarammohan, S., Kumar, A., Gupta, V., Pental, D., Pradhan, A., & Kaur, J. (2017). Genetic Architecture of Resistance to *Alternaria brassicae* in *Arabidopsis thaliana*: QLT Mapping Reveals Two Major Resistance-Confering Loci. *Plant Science*, 8, 1 - 9.

Reino, J., Guerrero, R., Hernández-Galán, R., & Collado, I. (2008). Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochem. Rev.*, 7, 89 - 123.

Rodriguez, I., & Piñeros, Y. (2017). Produccion de complejos enzimaticos celuloliticos mediante el cultivo de fase solida de *Trichoderma* sp sobre los racimos vacios de palma de aceite como sustrato. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 14(2), 35 - 42.

Samolski, I., Rincón, A., Pinzón, L., Viterbo, A., & Monte, E. (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology*, 158, 129 - 138.

Samolski, I., Rincón, A., Pinzón, L., Viterbo, A., & Monte, E. (2012). The *qid74* gene from *Trichoderma harzianum* has a role in root architecture and plant biofertilization. *Microbiology*, 158, 129–138.

Samuels, G., & Hebbar, P. (2015). *Trichoderma*: Identification and Agricultural Properties. *The American Phytopathological Society*, 94, 353 - 365.

Sanchez, A., Vayas, T., Mayorga, F., & Freire, C. (2020). Produccion del brocoli en el Ecuador. *Observatorio economico y social de Tungurahua*, 1- 4.

Sarocco, S., Guidi, L., Fambrini, S., Degl'Innocenti, E., & Vannacci, G. (2009). Competition for cellulose exploitation between *Rhizoctonia solani* and two *Trichoderma* isolates in the decomposition of wheat straw. *J. Plant Pathology*, 91, 331 - 338.

- Saxena, A., Raghuwanshi, R., & Singh, H. (2015). Trichoderma species mediated differential tolerance against biotic stress of phytopathogens in *Cicer arietinum* L. *J Basic Microbiol*, 55, 195 - 206.
- Saxena, A., Raghuwanshi, R., & Singh, H. (2016). Elevation of defense network in chili against *Colletotrichum capsici* by phyllospheric *Trichoderma* strain. *J Plant Growth Regul*, 35, 377 - 389.
- Seiboth, B., Karimi, R., & Phalate, P. (2012). The putative protein methyltransferase LAE1 control cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Molecular Microbiology*, 84(6), 1150 - 1164.
- Shoresh, M., Harman, G., & Mastouri, F. (2019). Induced systemic resistance and plant responses to fungal biocontrol agents. *Annu Rev Phytopathology*, 48, 21 - 43.
- Singh, S., Dureja, P., Tanwar, R., & Singh, A. (2018). Production and antifungal activity of secondary metabolites of *Trichoderma virens*. *Pestic. Res. Journal*, 17, 26 - 29.
- Sivan, A., & Chet, I. (1989). Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology*, 135, 675 - 682.
- Stacey, G., & Keen, N. (1999). *Plant-Microbe Interactions* (Vol. 4). St. Paul Minnesota, MN, USA: American Phytopathological Society Press.
- Tijerino, A., Cardoza, R., Moraga, J., Malmierca, M., Vicente, F., Aleu, J., . . . Gutiérrez, S. (2016). Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum*. *Fungal Genet. Biol*, 48, 285 - 296.
- Turaga, V. (2020). Peptaibols: Antimicrobial Peptides from Fungi. In *Bioactive Natural Products in Drug Discovery*. Springer, 713 - 730.
- Urooj, F., Priyadarshini, B., Sudarshana, B., & Muthappa, S. (2019).



Perspectives on the utilization of resistance mechanisms from host and nonhost plants for durable protection of Brassica crops against *Alternaria* blight. *Peer Journal*, 4, 2 - 27.

Van, S., Ent, S., & Pieterse, C. (2018). Plant immune responses triggered by beneficial microbes. *Plant Biology*, 11, 443 - 448.

Vinale, F., Lorito, M., & Woo, L. (2018). Trichoderma - plant - pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, 40, 1 - 10.

Viterbo, A., & Chet, I. (2016). TasHyd1, a new hydrophobin gene from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* is involved in plant root colonization. *Mol. Plant Pathology*, 7, 249 - 258.

White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (2015). Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *Phytopathology*, 95(2), 315 - 322.

Woudenberg, J., Groenewald, J., Binder, M., & Crous, P. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Micology*, 75, 171 - 212.

Yedidia, I., Benhamou, N., & Chet, I. (2019). Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol*, 65, 1061 - 1070.

Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S., Mach, R., Fekete, C., . . . Kubicek, C. (1999). Chitinase Gene Expression during Mycoparasitic Interaction of *Trichoderma harzianum* with Its Host. *Fungal Genet. Biology*, 26, 131 - 140.

Zhang, J., Chen, G.-Y., Li, X.-Z., Hu, M., & Wang, B. (2017). Phytotoxic, antibacterial, and antioxidant activities of mycotoxins and other metabolites from *Trichoderma* sp. *Prod. Research*, 31, 2745–2752.

Zhao, K., Penttinen, P., Zhang, X., Ao, X., Liu, M., Yu, X., & Chen, Q. (2014). Maize rhizosphere in Sichuan, China, hosts plant growth promoting *Burkholderia cepacia* with phosphate solubilizing and antifungal abilities. *Microbiology*, 169, 76 - 82.

## ANEXOS

### ANEXO 1. Extracción de metabolitos secundarios de *Trichoderma spp*



### ANEXO 2. Preparación del terreno para la siembra del cultivo de brócoli





### ANEXO 3. Aplicación del bioproducto de *Trichoderma* en el cultivo de brócoli



### ANEXO 4. Cosecha del brócoli



## ANEXO 5. Peso de pellas



## ANEXO 6. Análisis de varianza del efecto antagónico evaluado por el método de absorbancia

Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	16,0394	8	2,00493	89,59	0
Intra grupos	0,604216	27	0,0223784		
Total (Corr.)	16,6436	35			

## ANEXO 7. Análisis de varianza del peso radicular en plantas de brócoli

Tabla ANOVA para PESO RAIZ por TRATAMIENTOS					
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	0,283754	5	0,0567507	119,52	0
Intra grupos	0,259246	546	0,00047481		
Total (Corr.)	0,542999	551			

## ANEXO 8. Análisis de varianza del rendimiento en el cultivo de brócoli

Tabla ANOVA para RENDIMIENTO por TRATAMIENTO					
Fuente	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	922,711	5	184,542	92,76	0
Intra grupos	1086,25	546	1,98947		
Total (Corr.)	2008,96	551			

## ANEXO 9. Análisis de varianza del % de incidencia de *Alternaria* en el cultivo de brócoli

Tabla ANOVA para % INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD por TRATAMIENTO

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1002,7	5	200,54	2946,06	0
Intra grupos	37,1666	546	0,0680708		
Total (Corr.)	1039,87	551			

## ANEXO 10. Secuencia de la cepa N1-AT

1 cttcttctgc tcttctctc gcataccgg tcaagcatc cgatctgca atttacgttc  
 61 tagtcaagaa cttttcatca actccacac aaaacttcaa caaccgcaa aatgggtaag  
 121 gaggagaaga ctcacatcaa cgtctctctc atcagccacg tcgactccgg caagtctacc  
 181 accactggtc acttgatcta ccagtccggg ggtattgaca agcgtaccat cgagaagttc  
 241 gagaaggaag ccgccgagct cggcaagggt tctttcaagt atgctggggg tcttgacaag  
 301 ctaaggccg agcgtgagcg tggatcacc atcgacattg cctcttgaa gttcgagact  
 361 cccaagtact atgtaccgt cattgacgt cccggtcacc gtgatttcat caagaacatg  
 421 atactggta ctcccaggc tgactgcgct atctgatta tcgctgccgg tactggtag  
 481 ttcgaggctg gtatctcaa ggatggccag acccgtgagc acgctctgct cgctacacc  
 541 ctgggtgta agcagctcat cgttgccatc aacaagatgg acactgcaa ctgggccgag  
 601 gctcgttacc ttgagatcat caaggagacc tccaacttca tcaagaaggt cggcttcaac  
 661 cccaagaccg ttgccttctg cccatctcc ggcttcaacg gcgacaacat gttgctgcc  
 721 tcaccaact gccctggta caaggctgg gagaaggaga ccaaggctgg caagtccacc  
 781 ggcaagacc ttctgaggc cattgacgcc attgagcccc ccaagcgtcc cacagacaag  
 841 cccctcgtc ttcccctca ggatgtttac aagatcggtg gtattggaac agtccctgtc  
 901 ggccgtatcg agactggtat ctcaagccc ggtatggctg ttaccttgc tccctcaac  
 961 gtcaccactg aagtaagtc cgttgagatg caccacgagc agctcgtcga ggggtgtccc  
 1021 ggtgacaacg ttggattcaa cgtcaagaac gtctccgta aggatatccg ccgtggtaac  
 1081 gttgccggtg actccaagaa cgaccccc atgggtgccg cttcttcaa cgcccaggtc  
 1141 atcgtcatga accacctgg ccaggtcggg gccggatagc ctcccgtctc cgattgccac  
 1201 actgccaca ttgctgcaa gttctctgag ctctcgaga agatcgaccg ccgtaccggt  
 1261 aaggctactg aggctcccc caagttcatc aagtctggtg actccgcat cgtaagatg  
 1321 gttcctcca agccatgtg cgttgaggcc ttaccgact accctcccct gggtcgttcc  
 1381 gccgtcgtg acatgcgcca gaccgtgcc gtcgggtgta tcaagggccg caagaataa  
 1441 gcgatacca ccatcatcaa aacctgatgt tctggggctc ctcgtgaggt ttcccagc  
 1501 ggggcaccac gcgtcactt ctacgacgaa acgatcaatg ttgctatgca tatgattct

1561 cgactatgaa tcgaggcacg ttaattgaga ggctgggaat atgggttcca tcaaaactc  
1621 tccgggaatg caaaacaag ggaaaaaaaaa ttgatagata agttcaattg actgacttcg  
1681 accacc

## ANEXO 11. Secuencia de la cepa N2.5-T

1 cccggttcaa gcatccgac tgcgaattg tacgtgctgc ctctgctcta cctctgctg  
61 atgggtatc ggtcttgc cgtcgggaag cttcatcacc atcgtcttca tcgtcttcat  
121 catccgtgca acagcaccg ctgactctt ctctgctc tagacgttct agtcaagaac  
181 ttacaacta ctccacaca aaacttaca aaccgcaaaa atgggtaagg aggagaagac  
241 tcacatcaac gtcgtcgtca tcggccacgt cgactccggc aagtctacca ccaactggtca  
301 cttgatctac cagtgcggtg gtattgacaa gcgtaccatc gagaagttcg agaaggaagc  
361 gcgccgaact ggcaagggtt cttcaagta tgcgtgggtt cttgacaagc tcaaggccga  
421 gcgtgagcgt ggtatcacca tcgacattgc cctctggaag ttgagactc ccaagtacta  
481 tgtcaccgtc attgacgctc ccggtaccg tgatttcatc aagaacatga tcaactggtac  
541 ctccaggct gactgcgcta tctgattat cgctccggg actggtgagt tcgaggctgg  
601 tatctcaag gatggccaga cccgtgagca cgctctgctc gcctacacc tgggtgtcaa  
661 gcagctcatc gttgccatca acaagatgga cactgccaac tgggtgagg ctggttacct  
721 tgagatcacc aaggagacct ccaacttcat caagaaggc ggcttcaacc ccaagacctg  
781 tgcctctgc cccatctccg gtttcaacgg tgacaacatg ctgtccccct ccaactg  
841 ccctggtac aagggtggg agaaggagac caaggctggc aagtcaccg gtaagacct  
901 cctcaggcc atcgacgcca ttgagcccc caagctccc acagacaagc ccctcctct  
961 gccctccag gactctaca agatcgggtg taccggaaca gtcctctgct gccgtatcga  
1021 gactggtgct ctaagcccg gtatggtcgt cacttctgct cctccaacg tcaccactga  
1081 agtcaagtc gtcgagatgc accacgagca gctcgtctgag ggtgtccccg gtgacaactg  
1141 tggattcaac gtcaagaacg tctctgtcaa ggatatccgc cgtggtaacg ttgccggtga  
1201 ctccaagaac gaccctcca tgggtgccgc ttcttcaac gccagggtca ttgtcatgaa  
1261 ccacctggc caggctcgtg ccggttacgc tccgctctc gattgccaca ctgccacat  
1321 tgcctgcaag ttctctgagc tctctgagaa gatcgaccgc cgtaccggtg aggctactga  
1381 ggctcccc aagttcatc agtctggtga ctccgccatc gtaagatgg ttccctcaa  
1441 gccatgtgc gttgagctt tcaccgacta cctccccg ggtcgttccg ccgtccgtga  
1501 catgctcag accgtcccg tcggtgtcat caagtcctc gagaagtcca ctggtgctgc  
1561 cggcaaggc accaagtcg ccgcaaggc cgcaagaaa taagcgatac ccatcatc  
1621 caacactga tgttctggg tccctctgta gtttctccc agtggggcac cacgcgctca  
1681 cttctacgac gaaacgatc atgttctat gcatatgagt tctcactat gaatcgaggc  
1741 acgttaattg agaggctggg aataagggtt ccatcaaac ttctccggga atgcaaaaca  
1801 aagggaaaaa gggaaaaaaa aattagatag aagttaaatt gactgactc gacaacaaa



## ANEXO 12. Secuencia de la cepa N3-T

1 atttttggca caattatatg cccgacaatt ctgttctcag ttttgtcttt cttttttcag  
61 catcaccccg ctttgccage ctactacce ctcctttggc acagcaaaaa attttctcg  
121 tgccttgttt ggcttttagt ggggtgtcaa ttttgttga cggcaacccc actatcgca  
181 ctgtacctct ttcatcacc caccacatgc ttttgttcaa tcgcatcgtc ttttttcaat  
241 atctcttgtt cattatgctg atcatgcttc aatcaatagg aagccgccga actcggcaag  
301 ggttcttca agtatgcgtg ggttcttgac aagctcaagg ccgagcgtga gcgtggatc  
361 accatcgaca ttgccctctg gaagttcgag actcecaagt actatgtcac cgtcattggt  
421 atgttttggc cacttcagtc gacattgcaa gatcgtcatt ctaacatact ctccccacg  
481 acgctcccg tcaccgtgat ttcatcaaga acatgatcac tggtaacctc caggctgact  
541 gcgctactct gattatcgtc gccggtactg gtgagttcga ggctggatc tccaaggatg  
601 gccagaccg tgagcacgct ctgctcgct acacctggg tgtaagcag ctatcgtcg  
661 ccatcaaca gatggacact gccaaactggg ctgaggctcg ttacctgag atcatcaagg  
721 agacctcaa ctcatcaag aaggtcggct tcaacccaa gaccttgc ttctccca  
781 ttccggttt caacggtgac aacatgctgt cccccacc caactgcccc tggtaacag  
841 gttgggagaa ggagaccaag gctggcaagt ccaccggtaa gacctctc gaggccatcg  
901 acgccatga gcccccaag cgtccacag acaagccct ccgtctgcc ctccaggatg  
961 tctacaagat cgggtggtac ggaacagtc ctgtcggcg tatcgagact ggtgtctca  
1021 agccccgat ggtcgttacc ttgcctctt ccaacgtcac cactgaagtc aagtcctcg  
1081 agatgcacca cgagcagtc gctgagggtg tccccggtga caactgtgt ttcaactca  
1141 agaactctc tgtcaaggat atcccctgtg gtaactgtgc cgtgactcc aagaacgacc  
1201 ctccatggg tgccgttct ttcaacgcc aggtcatcgt catgaaccac ctggccagg  
1261 tcggtgcc

## ANEXO 13. Secuencia de la cepa N5-T

1 cccggttcaa gcatccgatc tgcgaattg tacgtgctgc ctctgctca ccctctgctg  
61 atggtgattc ggctttgcat cgctgggaag ctcatcacc atcgtcttca tctcttcat  
121 catcctgca acagacccg ctgactctt ctctgctc tagacttct agtcaagaac  
181 ttacaacta ctcccacaca aaacttaca aaccgcaaa atgggtaagg aggagaagac  
241 teacatcaac gtctgctca tggccactg cactccggc aagtctacca cactgttca  
301 ctgatctac cagtgcgggt gattgacaa gcgtaccatc gagaagttcg agaaggaagc  
361 cgccgaactc gcaagggtt cttcaagta tgcgtgggtt cttgacaagc tcaaggcca  
421 gcgtgagcgt ggtatcaca tcgacattgc cctctggaag ttgagactc ccaagtacta  
481 tgcaccgctc attgacgctc ccggtaccg tgatttcatc aagaacatga tcaactgtac  
541 ctccaggct gactgcgcta tctgattat cgctccgggt actggtgagt tcgaggctgg

601 tatctcaag gatggccaga cccgtgagca cgctctgctc gcctacacc tgggtgtcaa  
661 gcagctcadc gttgcatca acaagatgga cactgccaac tgggctgagg ctgcttacct  
721 tgagatcadc aaggagacct ccaacttcat caagaaggtc ggcttcaacc ccaagacct  
781 tgctctgctc cccatctccg gtttcaacgg tgacaacatg ctgtccccct ccaccaactg  
841 cccctggtaac aagggtctggg agaaggagac caaggctggc aagtcaccg gtaagacct  
901 cctcgaggcc atcgacgcca ttgagcccc caagcgtccc acagacaagc cctcctgct  
961 gccctccag gacgtctaca agatcgggtg tateggaaca gtcctgtcg gccgtatga  
1021 gactggtgct ctcaagcccg gtatggtcgt caccttctgct cctccaacg tcaccactga  
1081 agtcaagtcc gtcgagatgc accacgagca gtcgctgag ggtgtcccc gtgacaactg  
1141 tggattcaac gtcaagaacg tctctgtcaa ggatatccgc cgtggtaacg ttgccggtga  
1201 ctccaagaac gacctcca tgggtgccgc ttcttcaac gccagggtca ttgcatgaa  
1261 ccacctggc caggctggg cgggttacgc tccgtctc gattgccaca ctgccacat  
1321 tgctgcaag ttctctgagc tctctgagaa gatcgaccgc cgtaccgga aggctactga  
1381 ggctcccc aagttcatca agtctggtga ctccccatc gtcaagatgg ttccctcaa  
1441 gccatgtgc gttgaggctt tcaccgacta cctccccg ggtcgttctc cgtccgtga  
1501 catgctcag accgtcccg tgggtgcat caagtcctc gagaagtcca ctggtctgc  
1561 cgcaaggtc accaagtccg ccgccaagc cgccaagaaa taagcgatac ccatcatc  
1621 caacactga tgttctggg tcctctgta ggttctccc agtggggcac cagcgctca  
1681 ctctacgac gaaacgatca atgttctat gcatatgagt tctgactat gaatcgagg  
1741 acgttaattg agaggctggg aataagggtt ccatcaaac ttctccgga atgcaaaaca  
1801 aagggaaaaa gggaaaaaaa aattagatag aagttaaatt gactgactc gacaacaaa

## ANEXO 14. Secuencia de la cepa N7T

1 cgactcgcga atttgtatg gccatctctc ccttcgcct cgccttggtg attcatctt  
61 ccaacactg gaacatcadc acctcatcat catcadc gctgaggaa cacttccggc  
121 tgactctgct tcctccagt acttttagtc aaggactaca cagctcacgc taaattcac  
181 aaaccgcaa aatgggtaag gaggacaaga ctacatcaa cgtggctgct atcgccacg  
241 tgactccgg aaagtcgacc accaccggtc acttgatcta ccagtccggt ggtatcgacc  
301 gctgaccat cgagaagttc gagaaggaag ccgccgaact cggcaagggt tcctcaagt  
361 acgcttgggt tcttgacaag ctcaaggccg agcgtgagcg tggatcacc atcgacttg  
421 ctctgtgaa gttcgagact ccaagtact atgtaccgt cattgacgt cccggccacc  
481 gtgatttcat caagaacatg atactggta ctcccaggc cgattgcgt atctcatca  
541 ttgccccgg tactggtgag ttgaggctg gtatctcaa ggatggccag acccgtgagc  
601 acgctctgct cgctacacc ctgggtgta agcagctcat tgttgcate acaagatgg  
661 acactgcaa ctgggcccag gctcgttacc aggaatcat caaggagact tcaactca  
721 tcaagaaggt cggcttcaac cccaaggctg ttgcttctg cccatctc gcttcaacg



781 gtgacaacat gctccagccc tccaccaact gcccttgta caaggctgg gagaaggaga  
 841 ccaaggctgg caagttacc ggcaagacc tcttgaggc tatgactcc atcgagccc  
 901 ccaagcgtcc cacggacaag ccctcctc tccctcca ggatgtctac aagatcggtg  
 961 gtattggaac agttcccgtc ggccgtatcg agactggat cctaagccc ggtatggctg  
 1021 tcacctcgc tcctccaac gtcaccactg aagtaagtc cgtcgagatg caccacgagc  
 1081 agctcgtcga ggggttccc ggtgacaacg ttggttcaa cgtcaagaac gttccgta  
 1141 aggaaattcg ccgtggaac gttgccggtg actcaagaa cgaccccc atgggtgccg  
 1201 cttctttcac cgctcaggtc atgctatga accacctgg ccaggtcggg gccggtacg  
 1261 cccccgttct tgaactccac actgcccaca ttgcctgcaa gttcccgag ctcaggaga  
 1321 agatcgaccg ccgtaccggg aaggctaccg agactgccc caagttcac aagtcgggtg  
 1381 actctgccat cgtaaatg atccctcca agccatgtg cgttgaggct ttaccgact  
 1441 acctccctt gggctgttc gccgtccgtg acatgcgaca gaccgtcgtc gtcgggtca  
 1501 tcaaggctgt cgacaagtc gccgccaccg ctggcaagg caccaagtc gtcgcaagg  
 1561 ccaccaagaa ataagcgata cccatcatca ccactgatg ttctggggc cctcgtgagg  
 1621 tttctcagt ggggaccgt gcgctcact ctacgacgaa acgatcaatg ttgctatga  
 1681 tgagcactcg actatgatc gaggcacgtt aattgagagg ctgggataa gggttcac  
 1741 agaacttct cgggaatgca aaacaaaagg gaacgaaaa aaaattgat agaagtaat  
 1801 taatgactc gacaacc

**ANEXO 15. Secuencia de la cepa N1-6**

1 cttgcatcca gctcatacct taatgctcac ggttattgat ggtaaggac agtgattgtg  
 61 ggggttcta tcagtgaatt atcctggca ttggttct acttcaggc cattaattgg  
 121 tatattct cactttta ttgacgttg cataagtaa tggtgaaac catacactc  
 181 gttaccagc aagccgagc ttactccat cgggcaagg gttctttt ttgtcttc  
 241 tttactga cattcagag tgcaccagt aatgtatgat aaggtagaac atttcttg  
 301 ttggataaat aatagtgaat gtaaaaaga cttgacaga agtttgc atactgatc  
 361 aaggcataa tgatattc caatggttct ttctactga gtgccccct tgaggttct  
 421 cgacgttaa cccccctacc ccctaaact ccagagttac ttatgtct gcaaccccc  
 481 gaaaacagga agaaccgg acgttacaag tcctatcat aaaagcgtc ttacagat  
 541 tgtatacagt attgtatata atattgcaca ctatt

**ANEXO 17. Secuencia de la cepa N81-T**

1 ttgagtcaa ggaggcctc tccctttt taagttct agatggtct ttgcacaca  
 61 tctgcagaca atatgagtc taatcggg gctacaggac aaggacggc atggtacgtt  
 121 ttggctagt acgcgatac cctcttcc cctcaccg tccccctta ttctgtcga

181 accagtgttg gagcactga acctgcgaca ccgatcgaaa tttaccgac tggcaatfff  
241 cataacgaag aaacggacaa aaaactaaca gatgtggfff cgcaggccag atcaccacca  
301 aggagctggg cactgtcatg cgctctttgg gacagaacct ctccgagtca gagctgcagg  
361 acatgatcaa cgaggtcgat gccgacaaca acggatccat cgatttcct ggtatgtcac  
421 tagctgaaac acttggactg ctacagaata cgagctaate tagagcggtg aagagtctt  
481 taccatgatg gccagaaaga tga

## **ANEXO 17. Secuencia de la cepa N10:1-T**

1 tggaaagtaa agtcgtaaca aggtctcctg tggtaacca gcggagggat cattaccgag  
61 ttacaactc ccaaaccba tgtgaacat accaaactgt tgcctcggmg gggtcacgcc  
121 ccgggtgctg cgcagccccg gaaccaggcg cccgccggag ggaccaacca aactctttc  
181 tgtagtcccc tgcggacgt tatttcttac agctctgagc aaaaattcaa aatgaatcaa  
241 aactttcaac aacggatctc ttggttctgg catcgatgaa gaacgcagcg aatgcgata  
301 agtaatgtga attgcagaat tcagtgaate atcgaatctt tgaacgcaca ttgcgccgc  
361 cagtattctg gcgggatgc ctgtccgagc gtcatttcaa ccctcgaacc cctccggggg  
421 gtcggcgttg gggacctcgg gagcccctaa gacgggatcc cggccccgaa atacagtggc  
481 ggtctcggc gacccctcc tgcgcagtag ttgcacaac tgcaccggg agcgcggcgc  
541 gtccacgtcc gtaaacacc caacttctga aatgttgacc tcgatcagg taggaatcc  
601 cgctgaactt aagcatatca ataagcggag gaa

## **ANEXO 18. Secuencia de *Alternaria spp***

1 tttggcatca ctttctttt acacgcacag ttgcgtccac tcggtgtatc ctctgagcgc  
61 gcagccatat cctggttttt cgcatgagg ggcattttt ggtggtgggg atgtcgcaac  
121 tttacgcgc tagcgtagt ccgctgcgg ccctcgcgaa cccaacacg atgacgcaca  
181 tgcaatttct atattttggc tacagcaaac tgacaagtct aacaggaagc cgccgaactc

# ANEXO 19. Etiqueta del Biocontrolador comercial

**"LEA LA ETIQUETA ANTES DE USAR EL PRODUCTO"**  
**"MANTÉNASE BAJO LLAVE FUERA DEL ALCANCE DE LOS NIÑOS"**

## PRECAUCIONES Y ADVERTENCIA DE USO Y APLICACIÓN

- No comer, fumar o beber durante las operaciones de mezcla y aplicación del producto.
- Conservar el producto en su envase original, etiquetado, cerrado, bajo sombra y buena ventilación, máximo por 7 días. Una vez utilizado a fin de evitar que se deteriore, mantener en refrigeración entre 4 y 8° C, hasta nuevo uso.
- No almacene o transporte entre productos alimenticios, ropa, bebidas ni medicamentos.
- Utilice ropa protectora durante el manipuleo y aplicación.
- Después de usar el producto cámbiese, lave la ropa contaminada y báñese con agua y jabón

**PRIMEROS AUXILIOS:** En caso de presentarse alguna anomalía durante el uso de producto llamar a un médico, o llevar al paciente a un Centro hospitalario, muestre la etiqueta. En caso tenga contacto con los ojos, lavarlos con abundante agua fresca y si el contacto fuera con la piel, lavarse con abundante agua y jabón.

## NOTA AL MEDICO

Tel. de emergencia: Cisprosquim: 0800-50847  
 Emergencias Toxicológicas: CICOTOX: 0800-1-3040  
 ESSALUD 0601-10200  
 D<sub>50</sub> Oral Aguda > 2000 a 5000 mg/kg (rata albina)  
 D<sub>50</sub> Dérmica Aguda > 4000 mg/kg (conejos)

## MANEJO Y DISPOSICION DE DESECHOS Y ENVASES VACIOS:

Después de usar el contenido, destruya el envase y deposítelo en el sitio destinado por las autoridades locales para este fin.

## MEDIDAS PARA LA PROTECCION Y CONSERVACION DEL MEDIO AMBIENTE

- No contamina el ambiente
- No es tóxico en humanos, animales y plantas.
- Al establecerse en el campo constituye un reservorio benéfico de inocuo, ayuda en la biorremediación de suelos.
- Puede usarse en agricultura orgánica y convencional.

# TRICHOMAX

AG ENTE DE CONTROL BIOLÓGICO MICROBIANO

FUNGICIDA AGRÍCOLA

## Composición:

*Trichoderma viride*... x 10<sup>12</sup> conidias /Kg  
 Aditivos.....C.S.P 1Kg

Registro PBUA N°: 393 - SENASA

## TITULAR DEL REGISTRO:

**SOLUCIONES AGROSOSTENIBLES S.A.C**  
 Av. Metropolitana Mz F1 Lote 5, Urb. San Isidro,  
 Trujillo - Perú. solagrosac@gmail.com/ www.solagro.com.pe  
 Telf.: 044-611346 RPC: 943776031/958966012

## PRODUCIDO Y DISTRIBUIDO POR:

**SOLAGRO S.A.C.**  
 SOLUCIONES AGROSOSTENIBLES S.A.C.

N° de Lote:  
 F. de Form.:  
 F. de Venc.:

CONTENIDO NETO: 16 Kg

NO CORROSIVO NO INFLAMABLE NO EXPLOSIVO

## INSTRUCCIONES DE USO Y MANEJO

**GENERALIDADES:** TRICHOMAX es obtenido de un aislamiento natural de *Trichoderma viride* antagonista directo de hongos fitopatógenos. TRICHOMAX presenta un modo de acción frente a hongos patógenos por: Micoparasitismo, Antibiosis; Competencia por nutrientes agua luz y espacio, etc.; Inducción de resistencia de plantas contra enfermedades; y Promotor de crecimiento de la planta.

## SISTEMAS DE PREPARACION Y APLICACION

**LAVADO DE ESPORAS:** Por cada bolsa de 800 g de TRICHOMAX, preparar una solución de 0.5 ml de surfactante agrícola en 1 Litro de agua, empujar a agregar todo el contenido de TRICHOMAX y agitar la mezcla hasta retirar todas las esporas del mal; luego colar la suspensión de esporas a través de una malla fina para evitar el paso del mal al tanque (pasar los lavados por dos veces hasta observar el color característico del mal).

## "CONSULTE CON UN INGENIERO AGRÓNOMO"

### CUADRO DE USO:

Cultivo	ENFERMEDAD		Dosis (g/planta)	PC (Días)	LMR (ppm)
	Nombre Común	Nombre Científico			
Palto	Tristeza del palto o muerte regresiva	<i>Phytophthora citromom</i>	5	N.A.	N.A.

U.S. Patent 6,000,000



## PRECAUCION





*Dr. EDUARDO DÍAZ OCAMPO, Ph.D.*  
**RECTOR**

*Ing. YENNY GUISELLI TORRES NAVARRETE, Ph.D.*  
**VICERRECTORA ACADÉMICA**

*Ing. BOLÍVAR ROBERTO PICO SALTOS, M.Sc.*  
**VICERRECTOR ADMINISTRATIVO**

*Econ. CARLOS EDISON ZAMBRANO, Ph.D.*  
**DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN - DICYT**

---

ISBN: 978-9978-371-44-2



9 789978 371442

