



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

Proyecto de investigación
previo a la obtención del título
de Ingeniera Forestal

TEMA:

Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos aislados desde árboles de *Schizolobium parahybum* (Vell.) S.F. Blake (pachaco) con síntomas de la enfermedad “decaimiento y muerte descendente” en el Trópico Húmedo Ecuatoriano

AUTOR:

Bélgica Cristina Intriago Pinargote

DIRECTOR:

Ing. For. Carlos Eulogio Belezaca Pinargote, *PhD*

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2021

DECLARACIÓN DE AUDITORIA Y SESIÓN DE DERECHOS

Yo, **Bélgica Cristina Intriago Pinargote**, declaro bajo juramento que la investigación aquí descrita es de mi autoría; no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Técnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondiente este documento, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa vigente.

Bélgica Cristina Intriago Pinargote

CC. 2350129041

CERTIFICADO DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

El suscrito, **Dr. Ing. For. Carlos Eulogio Belezaca Pinargote**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que la estudiante **Bélgica Cristina Intriago Pinargote**, realizo el Proyecto de Investigación de grado titulado “**Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos aislados desde árboles de *Schizolobium parahybum* (Vell.) S.F. Blake (pachaco) con síntomas de la enfermedad “decaimiento y muerte descendente” en el Trópico Húmedo Ecuatoriano**”, previo a la obtención del título de Ingeniera Forestal, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones establecidas para el efecto.

Ing. For. Carlos Eulogio Belezaca Pinargote, *PhD*
Director del Proyecto de Investigación

REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

El suscrito **Dr. Ing. For. Carlos Belezaca Pinargote**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Proyecto Investigación titulado “**Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma sp.* frente a hongos fitopatógenos aislados desde árboles de *Schizolobium parahybum* (Vell.) S.F. Blake (pachaco) con síntomas de la enfermedad “decaimiento y muerte descendente” en el Trópico Húmedo Ecuatoriano**”, perteneciente a la estudiante de la carrera de Ingeniería Forestal, Srta. **Bélgica Cristina Intriago Pinargote**, fue sometido a análisis en la plataforma URKUND, donde presentó un 92% de originalidad y un 8 % de similitud con otros trabajos publicados, verificando las correcciones pertinentes y considerando el reglamento e instructivo de Proyectos de Investigación de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.



Document Information

Analyzed document	Proyecto Belgica Intriago para URKUND.docx (D98842535)
Submitted	3/19/2021 5:09:00 AM
Submitted by	Carlos Belezaca Pinargote
Submitter email	cbelezaca@uteq.edu.ec
Similarity	8%
Analysis address	cbelezaca.uteq@analysis.orkund.com

Ing. For. Carlos Eulogio Belezaca Pinargote, *PhD*
Director del Proyecto de Investigación



UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
CARRERA DE INGENIERIA FORESTAL

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Título:

Evaluación de la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos aislados desde árboles de *Schizolobium parahybum* (Vell.) S.F. Blake (pachaco) con síntomas de la enfermedad “decaimiento y muerte descendente” en el Trópico Húmedo Ecuatoriano

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniera Forestal.

Aprobado por:

Dra. Mercedes Carranza Patiño

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Oscar Prieto Benavides

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

Dr. José Nieto Rodríguez

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR
2021

AGRADECIMIENTO

Primeramente a Dios quien me ha dado la oportunidad de tener una vida plena por cuidarme y haberme permitido llegar hasta mi última etapa universitaria.

Agradezco a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo por abrirme las puertas y siempre darme una grata bienvenida a cada nivel que ido escalando en el transcurso de mis estudios, a mis maestros que me han inculcado sus conocimientos y sabidurías hasta el final de mi ciclo gracias a su formación profesional. De igual manera mis agradecimientos a la empresa PLANTABAL S.A., la cual permitió desarrollar mi trabajo en sus instalaciones y apoyarme en todos los recursos que he requerido a lo largo de mi proyecto de investigación. Muy agradecida con mi tutor Dr. Carlos Eulogio Belezaca Pinargote por haberme brindado la oportunidad de apoyo, dirigirme y recurrir a su capacidad y conocimientos profesional he inculcandome nuevos saberes para el desarrollo de mi proyecto de investigación guiándome en cada proceso con mucha paciencia hasta el final.

A mi hermosa familia, la mejor bendición que mi Dios me pudo dar, a mis padres quienes siempre me han apoyado incondicionalmente en cada paso y desarrollo de toda mi vida, a mis hermanas Scarleth, Nora, July y Stefy que siempre me han sabido apoyar en todo momento. A mi enamorado Carlos quien me ha dedicado tiempo y la paciencia del mundo para apoyarme en cada proceso que e ido avansando, con mucho amor gracias a todos ellos.

Por ultimo a mis compañeros de clases que he compartido en todos los niveles de estudio en la Universidad y sobre todo a mis grandes amigos Damaris, Henry, Cintia y Juan que me han brindado una bonita amistad y que con quienes he pasado mis mejores momentos de mi vida universitaria, estando ahí para animarme y ayudarme en mi carrera estudiantil.

DEDICATORIA

El presente estudio se lo dedico:

A Dios y a todas las personas que me han brindado su apoyo incondicional, a mis padres Cristina Pinargote y Edwin Intriago quienes siempre me han inculcado buenos valores y me han ayudado en mi desarrollo por lo que ahora soy, a mis hermanas que siempre me motivan para seguir adelante apoyandome y creyendo en mi ante todo. Pero sobre todo a mi madre quien ha sido mi ejemplo a seguir de superación y lucha en cualquier obstaculo llevándonos siempre de la mano con mucho amor, quien admiro y respeto sobre todas las cosas.

RESUMEN

El propósito de esta investigación fue evaluar nuevas alternativas como el control biológico, usando el antagonismo de *Trichoderma* sp., para el control de enfermedades de *S. parahybum* a nivel *in vitro*. Se determinó la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos de *S. parahybum*, así como su efecto en tres diferentes temperaturas y su velocidad de crecimiento. Se realizaron cultivos duales en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), incubados a tres temperaturas (4 ± 2 °C, 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C) bajo un diseño completamente al azar, con nueve tratamientos, constituidos por la combinación de los tres fitopatógenos (*Fusarium* sp.1, *Fusarium* sp.2 y *Botryodiplodia* sp.) y dos cepas de *Trichoderma* sp. Por cada tratamiento se emplearon cinco repeticiones (placas de Petri). La capacidad antagónica se determinó mediante la estimación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los fitopatógenos en presencia de *Trichoderma* sp. cada 24 horas, hasta las 168 horas de incubación bajo las tres condiciones de temperatura. Se evaluó la capacidad antagónica mediante una escala de cinco categorías. La variación de temperatura si influyó en el crecimiento de las dos cepas de *Trichoderma* sp., mostrando adaptabilidad en temperaturas de 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C, con rápido desarrollo de entre las 48 y 72 horas desde su incubación. *Trichoderma* sp.2 presentó mayor agresividad en su crecimiento, categorizándose en la escala de clasificación antagónica en grado 1 frente a todos los patógenos. *Trichoderma* sp.1 mostró antagonismo frente a *Fusarium* sp 1 y *Fusarium* sp.2 mientras que frente a *Botryodiplodia* sp. alcanzó escala 2 a las 168 horas. La prueba *in vitro* demostró que *Trichoderma* sp.2 presentó mayor actividad antagónica por invasión de espacios y consumo de nutrientes, parasitismo, y antibiosis contra los fitopatógenos de *S. parahybum*. La inhibición del crecimiento radial de los fitopatógenos superó el 50% a 24 ± 2 °C, y más del 60% a la temperatura de 30 ± 2 °C.

Palabras claves: Control biológico, *Fusarium* sp., *Botryodiplodia* sp., microorganismo, porcentaje de inhibición del crecimiento radial.

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate new alternatives such as biological control, using the antagonism of *Trichoderma* sp., for the control of *S. parahybum* diseases at the *in vitro* level. The *in vitro* antagonistic capacity of two native strains of *Trichoderma* sp. against *S. parahybum* phytopathogens, as well as its effect at three different temperatures and its growth rate. Dual cultures were performed in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium, incubated at three temperatures (4 ± 2 ° C, 24 ± 2 ° C and 30 ± 2 ° C) under a completely randomized design, with 9 treatments, constituted by the combination of the three phytopathogens (*Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2 and *Botryodiplodia* sp.) and two strains of *Trichoderma* sp. For each treatment, five repetitions (Petri dishes) were used. The antagonistic capacity was determined by estimating the percentage of radial growth inhibition (PICR) of the phytopathogens in the presence of *Trichoderma* sp. every 24 hours, until 168 hours of incubation under the three temperature conditions. The antagonistic capacity was evaluated using a scale of 5 categories. The temperature variation did influence the growth of two strains of *Trichoderma* sp. showed adaptability at temperatures of 24 ± 2 ° C and 30 ± 2 °, with rapid development between 48 and 72 hours after incubation. *Trichoderma* sp.2 showed greater aggressiveness in its growth, being categorized in the antagonistic classification scale in grade 1 against all pathogens. *Trichoderma* sp.1 showed antagonism against *Fusarium* sp 1 and *Fusarium* sp.2 while against *Botryodiplodia* sp. it reached scale 2 at 168 hours. The *in vitro* test showed that *Trichoderma* sp. 2 presented greater antagonistic activity due to invasion of spaces and nutrient consumption, parasitism, and antibiosis against the phytopathogens of *S. parahybum*. The inhibition of radial growth of the phytopathogens exceeded 50% at 24 ± 2 ° C, and more than 60% at the temperature of 30 ± 2 ° C.

Keywords: Biological control, *Fusarium* sp., *Botryodiplodia* sp., Microorganism, percent inhibition of radial growth.

TABLA DE CONTENIDO

Portada.....	i
Declaración de auditoria y sesión de derechos.....	ii
Certificado de culminación del Proyecto de Investigación	iii
Reporte de la herramienta de prevención de coincidencia y/o plagio académico.....	iv
Tribunal de tesis	v
Agradecimiento.....	vi
Dedicatoria.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
Tabla de contenido.....	x
Índice de tablas.....	xiii
Índice de figuras.....	xiv
Índice de anexos.....	xvi
Código dublin.....	xvii
Introducción.....	1
CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	2
1.1. Problema de la investigación.....	3
1.1.1. Diagnóstico.....	3
1.1.2. Pronóstico.....	3
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Sistematización.....	3
1.4. Objetivos.....	5
1.4.1. General.....	5
1.4.2. Específicos.....	5
1.5. Justificación.....	6
CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN	7
2.1. Marco conceptual.....	8
2.1.1. Clasificación taxonómica de <i>S. Parahybum</i> (Vell.) S.F. Blake	8
2.1.1.1. Características generales.....	8
2.1.1.2. Descripción botánica.....	8
2.1.1.3. Importancia económica.....	9
2.1.1.4. Plagas y enfermedades encontradas en plantaciones de pachaco.....	9

2.1.2. <i>Fusarium</i> spp.....	10
2.1.2.1. Descripción.....	10
2.1.2.2. Patogenicidad y síntomas.....	11
2.1.2.3. Metabolitos tóxico excretados por <i>Fusarium</i>	11
2.1.3. <i>Botryodiplodia</i> sp. (Muerte descendente).....	11
2.1.4. <i>Trichoderma</i> sp.....	12
2.1.4.1. Características microscópicas.....	13
2.1.4.2. Condiciones climatológicas de <i>Trichoderma</i> sp.....	13
2.1.4.3. Aplicaciones del género <i>Trichoderma</i> sp.....	14
2.1.4.4. Mecanismo de acción de biocontrol.....	14
2.1.4.5. Capacidad antagonista.....	14
2.1.4.6. Antibiosis.....	14
2.1.4.7. Micoparasitismo.....	14
2.1.4.8. Competencia.....	15
2.2. Marco referencial.....	15
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	17
3.1. Localización del sitio experimental.....	18
3.2. Tipo de investigación	19
3.3. Métodos de la investigación	19
3.4. Fuentes.....	19
3.5. Materiales y equipos	19
3.5.1. Materiales de laboratorio	19
3.5.2. Reactivos.....	20
3.5.3. Equipos de oficina	20
3.6. Diseño de la investigación.....	20
3.6.1. Diseño para determinar la velocidad de crecimiento <i>in vitro</i> de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp. En medio de cultivo PDA.	20
3.6.2. Diseño para ensayos antagonistas de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp. A hongos fitopatógenos de <i>S. Parahybum</i> a nivel <i>in vitro</i>	21
3.7. Manejo del experimento.....	22
3.7.1. Velocidad de crecimiento <i>in vitro</i> de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp. En medio de cultivo PDA.....	22
3.7.1.1. Preparación de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp. en medio de cultivo PDA..	22
3.7.1.2. Evaluación de <i>Trichoderma</i> sp.....	23

3.7.2. Capacidad antagónica de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp. A hongos fitopatógenos de <i>S. Parahybum</i> a nivel <i>in vitro</i>	23
3.7.2.1. Preparación de los microorganismo.....	23
3.7.2.2. Evaluación de la capacidad antagónica.....	23
3.7.3. Influencia de la temperatura sobre la capacidad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp. ...	25
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
4.1. Velocidad de crecimiento <i>in vitro</i> de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp.	27
4.2. Capacidad antagónica de cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp. A hongos fitopatógenos <i>S. Parahybum</i> a nivel <i>in vitro</i>	28
4.2.1. Características de microorganismos.	30
4.2.1.1. Microscopía de las interacciones de <i>Trichoderma</i> sp. y los fitopatógenos.....	31
4.3. Discusión.....	33
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	35
5.1. Conclusiones	36
5.2. Recomendaciones	37
CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA.....	38
6.1. Bibliografía	39
CAPÍTULO VII. ANEXOS.....	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Descripción de tratamientos para la evaluación del crecimiento <i>in vitro</i> de las cepas de <i>Trichoderma</i> sp.	21
Tabla 2.	Descripción de tratamientos con sus respectivas repeticiones para la evaluación ensayos antagonistas.....	22
Tabla 3.	Escala para clasificación del antagonista según Bell <i>et al.</i> (1982).....	25
Tabla 4.	Crecimiento y caracterización a nivel <i>in vitro</i> de cada microorganismo en estudio.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ubicación de los laboratorios donde se realizó la investigación.....	18
Figura 2.	Diámetro de crecimiento (cm) alcanzado por <i>Trichoderma</i> sp.1 y <i>Trichoderma</i> sp, 2 durante 72 horas bajo condiciones de incubación a 24 ± 2 °C. Valores corresponden al promedio de crecimiento de colonias, en cinco placas de Petri con medio de cultivo PDA, con su respectiva desviación estándar y error estándar.....	27
Figura 3.	Diámetro de crecimiento (cm) alcanzado por <i>Trichoderma</i> sp. 1 y <i>Trichoderma</i> sp.2 durante 72 horas bajo condiciones de incubación a 30 ± 2 °C. Valores corresponden al promedio de crecimiento de colonias en cinco placas de Petri con medio de cultivo PDA, con su respectiva desviación estándar y error estándar.....	28
Figura 4.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de <i>Schizolobium parahybum</i> (pachaco) frente a dos cepas de <i>Trichoderma</i> sp. a 24 ± 2 °C de incubación.....	29
Figura 5.	Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de <i>Schizolobium parahybum</i> (pachaco) frente a dos cepas de <i>Trichoderma</i> sp. a 30 ± 2 °C de incubación.....	29
Figura 6.	a) Interacción de antagonismo por enrollamiento b) Presencia de esporas c) Vacuolización d) Zona de confrontamiento.....	32
Figura 7.	Crecimiento de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp., a las 48 horas a 24 ± 2 °C	45
Figura 8.	Crecimiento de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp., a las 72 horas a 24 ± 2 °C	45
Figura 9.	Crecimiento de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp., a las 96 horas a 24 ± 2 °C	46
Figura 10.	Crecimiento de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp., a las 72 horas a 30°C ..	46

Figura 11.	Crecimiento de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp., a las 96 horas a 30 ± 2 °C	46
Figura 12.	Evaluación antagónica a las 48 horas de incubación a 24 ± 2 °C	47
Figura 13.	Evaluación antagónica a las 72 horas de incubación a 24 ± 2 °C	48
Figura 14.	Evaluación antagónica a las 96 horas de incubación a 24 ± 2 °C	48
Figura 15.	Evaluación antagónica a las 144 horas de incubación a 24 ± 2 °C	50
Figura 16.	Evaluación antagónica a las 168 horas de incubación a 24 ± 2 °C	51
Figura 17.	Evaluación antagónica a las 144 horas de incubación 30 ± 2 °C	52
Figura 18.	Evaluación antagónica a las 168 horas de incubación 30 ± 2 °C	54

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Cajas Petri con medio de cultivo PDA.....	45
Anexo 2.	Siembra de macroorganismo en estudio.....	45
Anexo 3.	Evaluaciones de crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. a temperatura de 24°C.....	45
Anexo 4.	Evaluaciones de crecimiento de <i>Trichoderma</i> sp. a temperatura de 30°C.....	46
Anexo 5.	Evaluación antagónica a temperatura de 24 ±2 °C según sus tratamientos y control	46
Anexo 6.	Evaluación antagónica a temperatura de 30 ±2 °C según sus tratamientos y control.....	52

CÓDIGO DUBLIN

Título:	Evaluación de la capacidad antagónica <i>in vitro</i> de dos cepas de <i>Trichoderma</i> sp. frente a hongos fitopatógenos aislados desde árboles de <i>Schizolobium parahybum</i> (Vell.) S.F. Blake (pachaco) con síntomas de la enfermedad “decaimiento y muerte descendente” en el Trópico Húmedo Ecuatoriano.			
Autor:	Bélgica Cristina Intriago Pinargote			
Palabras clave:	Control Biológico	<i>Botryodiplodia</i> y <i>Fusarium</i>	Microorganismos	Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial
Fecha de publicación:				
Editorial:	FCAMB; Carrera de Ingeniería Forestal			
Resumen: (hasta 300 palabras)	<p>El propósito de esta investigación fue evaluar nuevas alternativas como el control biológico, usando el antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp., para el control de enfermedades de <i>S. parahybum</i> a nivel <i>in vitro</i>. Se determinó la capacidad antagónica <i>in vitro</i> de dos cepas nativas de <i>Trichoderma</i> sp. frente a fitopatógenos de <i>S. parahybum</i>, así como su efecto en tres diferentes temperaturas y su velocidad de crecimiento. Se realizaron cultivos duales en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA), incubados a tres temperaturas (4 ± 2 °C, 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C) bajo un diseño completamente al azar, con nueve tratamientos, constituidos por la combinación de los tres fitopatógenos (<i>Fusarium</i> sp.1, <i>Fusarium</i> sp.2 y <i>Botryodiplodia</i> sp.) y dos cepas de <i>Trichoderma</i> sp. Por cada tratamiento se empelaron cinco repeticiones (placas de Petri). La capacidad antagónica se determinó mediante la estimación del porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los fitopatógenos en presencia de <i>Trichoderma</i> sp. cada 24 horas, hasta las 168 horas de incubación bajo las tres condiciones de temperatura. Se evaluó la capacidad antagónica mediante una escala de 5 categorías. La variación de temperatura si influyó en el crecimiento de las dos cepas de <i>Trichoderma</i> sp. mostrando adaptabilidad en temperaturas de 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C, con rápido desarrollo de entre las 48 y 72 horas desde su incubación. <i>Trichoderma</i> sp.2 presentó mayor agresividad en su crecimiento, categorizándose en la escala de clasificación antagónica en grado 1 frente a todos los patógenos. <i>Trichoderma</i> sp.1 mostró antagonismo frente a <i>Fusarium</i> sp.1 y <i>Fusarium</i> sp.2 mientras que frente a <i>Botryodiplodia</i> sp. alcanzó escala 2 a las 168 horas. La prueba <i>in vitro</i> demostró que <i>Trichoderma</i> sp.2 presentó mayor actividad antagónica por invasión de espacios y consumo de nutrientes, parasitismo, y antibiosis contra los fitopatógenos de <i>S. parahybum</i>. La inhibición del crecimiento radial de los fitopatógenos superó el 50% a 24 ± 2 °C, y más del 60% a la temperatura de 30 ± 2 °C.</p>			
Descripción:	Hojas dimensiones, 29 x 21 cm + CD-ROM resultado			
URI:				

INTRODUCCIÓN

El creciente interés por el establecimiento de plantaciones forestales con especies de rápido crecimiento entre los sistemas de producción predominantes del Trópico Húmedo Ecuatoriano, ha motivado el manejo intensivo de rodales puros de varias especies nativas e introducidas, entre las que se destaca *Schizolobium parahybum* Vell Blake (pachaco) (Belezaca *et al.*, 2011). *S. parahybum* es un árbol que pertenece a la familia Fabaceae, originario de la cuenca amazónica, sobresale por ser muy vistoso (Rosales *et al.*, 1999), de fuste recto sin ramas y que en su parte superior tiene grandes racimos alargados de hojas.

Los árboles de *S. parahybum* crecen rápido y son altamente deseables para la producción de chapas y para la fabricación de plywood (Masapanta, 2011). Esta especie sufre una serie de trastornos fisiológicos manifestado por decaimiento y muerte descendiente que se considera el obstáculo más grande para el establecimiento exitoso de plantaciones productoras de celulosa (Masapanta, 2011). Los agentes patógenos causantes de enfermedades como pudrición de fuste y marchitamiento foliar, decaimiento y muerte descendiente, provocada en su mayoría por hongos y bacteria destruyen por completo a la planta, lo que conlleva a una pérdida económica muy amplia, ya que debido a la complejidad de tiempo en ser aprovechadas esta especie forestal se pierde años de productividad de la tierra.

A más de las múltiples alternativas de control químico que existen para el manejo de enfermedades vegetales, el control biológico se encuentra como una alternativa para el manejo integrado de diversas plantaciones. Uno de los microorganismos que se destaca es el género *Trichoderma* que posee buenas cualidades para el control de enfermedades en plantas causadas por patógenos fúngicos del suelo (González *et al.*, 2002). Este hongo actúa por medio de una combinación de competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas, micoparasitismo, y generar sustancias promotoras de crecimiento vegetal (Stefanova, 1996), siendo inductor de resistencia en las plantas.

El presente proyecto investigativo tuvo como finalidad el estudio de la capacidad antagónica de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos aislados de árboles enfermos de plantaciones de *S. parahybum* a nivel *in vitro*, considerando la velocidad de crecimiento y si la variación de temperatura influye en el medio de cultivo PDA.

CAPÍTULO I

CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

1.1. Problema de la investigación.

La falta de investigaciones científicas con estudios relacionados al hongo *Trichoderma* sp. como antagonista para el control de fitopatógenos en especies forestales, nos deja muchas interrogantes al momento de actuar y probar técnicas de manejo biológico contra patógenos en plantaciones de *S. parahybum*, lo cual conlleva a la utilización permanente de químicos que provoca la resistencia de patógenos y daños al medio ambiente, dado la dificultad en los controles de estos fitopatógenos.

1.1.1. Diagnóstico.

Los agentes patógenos en plantaciones forestales de *S. parahybum*, poseen un amplio rango de hospederos y malas prácticas de control fitosanitario; provocando enfermedades como decaimiento y muerte descendente de las plantas, disminuyendo su productividad provocando pérdidas económicas. El control químico, siempre está asociado a la destrucción de algunos microorganismos benéficos para el suelo y plantas, conduciendo a un desequilibrio microbiano perjudicial para el medio.

1.1.2. Pronóstico.

Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma* sp. para el control de fitopatógenos aislados desde árboles de *S. parahybum* enfermos.

1.2. Formulación del problema.

¿Cuál cepa de *Trichoderma* sp. tendrá una mayor capacidad antagónica frente a fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*?

1.3. Sistematización.

¿Cuál es la velocidad de crecimiento *in vitro* de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. en medios de cultivo?

¿Qué capacidad antagónica mostrarán las cepas de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*?

¿Cuál es la temperatura óptima para favorecer la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*?

1.4. Objetivos.

1.4.1. General.

Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de dos cepas de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos aislados de árboles enfermos de *Schizolobium parahybum* (Vell.) S.F. Blake (pachaco) con síntomas de la enfermedad “decaimiento y muerte descendiente”.

1.4.2. Específicos.

- Determinar la velocidad de crecimiento *in vitro* de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo PDA.
- Estudiar la capacidad antagónica de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. a hongos fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*.
- Determinar si la variación de temperatura influye en la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*.

1.5. Justificación.

Los agentes patógenos causantes de varias enfermedades como el marchitamiento vascular, decaimiento y muerte descendente de las plantas, han conllevado grandes pérdidas económicas a nivel mundial, reduciendo en si la producción de muchas plantaciones forestales. La presencia de *Fusarium* sp. se ha convertido en un verdadero problema en la salud vegetal, siendo una amenaza para muchos cultivos, debido a su difícil control y su habilidad para sobrevivir en la tierra durante periodos largos.

El rango de hospederos es alto, ya que este fitopatógeno posee una distribución global, principalmente a nivel del suelo. Una forma de su distribución en los sistemas de producción agrícola y forestal es la ineficiencia en manejo de limpieza y manipulación de herramientas contaminadas, la dispersión de este hongo ha ido en aumento, siendo muy difícil de controlar.

Las alternativas de control siempre han sido las mismas, donde sobresalen las aplicaciones de pesticidas químicos (fungicidas) pocos efectivos y muy contaminantes para el ambiente. Este estudio pretende evaluar nuevas alternativas como el control biológico, usando el antagonismo de *Trichoderma* sp. para el control de enfermedades de pachaco a nivel *in vitro*. De esta manera y como línea base, este trabajo de investigación promueva estudios que impulsan la utilización de este microorganismo; generando nuevas técnicas de manejo fitosanitario contra enfermedades que afectan a plantaciones forestales.

CAPÍTULO II

FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Marco conceptual.

2.1.1. Clasificación taxonómica de *S. parahybum* (Vell.) S.F. Blake

De acuerdo a Borja (2010), el pachaco posee la siguiente clasificación taxonómica

Reino	Plantae
División	Fanerógamas
Subdivisión	Angiosperma
Clase	Dicotiledónea
Familia	Leguminoceae
Género	<i>Schizolobium</i>
Especie	<i>Parahybum</i>
Nombre Científico	<i>Schizolobium parahybum</i> (Vell.) S.F. Blake.
Nombre Común	Pachaco

2.1.1.1. Características generales

S. parahybum es el árbol muy vistoso, fuste recto, sin ramas y de bonita forma, con un tronco alto que en la superficie tiene grandes racimos, largos como hojas. A la distancia se lo observa como un árbol gigantesco, parecido a un helecho, alcanzando una altura de más o menos 30 metros y hasta 100 centímetros de DAP (Meyer, 2009).

Es un árbol nativo de la Amazonía ecuatoriana, cultivado en la Costa, Andino y Amazonía, crece en las provincias: Esmeraldas, Guayas, Los Ríos, Morona Santiago, Napo, Pastaza, Santo Domingo de los Tsáchilas, Sucumbíos, Zamora Chinchipe; entre 0-900 m s.n.m. (Jorgensen y León , 1999).

2.1.1.2. Descripción botánica

Árbol deciduo de 20 metros de altura. Fuste cilíndrico y recto, con cicatrices marcadas debido a la autopoda. Copa muy amplia, alargada, abierta, con ramas dispersas, casi verticales. Corteza finamente áspera, verde en árboles jóvenes, y grisácea en árboles adultos, a veces agrietada en la parte basal del tronco. Hojas compuestas, alternas, con 15-25 pares de pinas, cada una con 20-30 pares de hojuelas oblongas de 2-3 cm (MAGAP, 2015).

La densidad de la madera está en $0,41 \text{ g/cm}^3$, teniendo un color amarillo pálido, utilizada como encofrado en la construcción civil (Mendoza *et al.*, 2015) En Ecuador se estima una producción de $375 \text{ m}^3/\text{ha}$, en un turno de 18 años, $20 \text{ m}^3 /\text{ha/año}$ (Estrada, 1997).

2.1.1.3. Importancia económica

La producción de pachaco es bastante rentable en inversiones a mediano plazo para chapas ya que es una especie de rápido crecimiento. Esta especie también ofrece posibilidades en combinar cultivos agrícolas de corto a mediano ciclo (Vasquez , 2010).

2.1.1.4. Plagas y enfermedades encontradas en plantaciones de pachaco

Es una especie sensible a las malezas, que en exceso permiten que su tronco sea colonizado por el hongo *Armillaria mellea*. En plantación es frecuentemente atacado por la hormiga arriera (*Atta spp.*) (Trujillo, 2003). Es un árbol heliófito que no soporta sombra y tiene poca resistencia al ataque de hongos y termitas.

Según Ospina *et al.* (2003) las plagas que afectan esta especie son:

- Barrenador del tallo del Pachaco *Deliathus quadritaeniator* (White) (Coleoptera: *Cerambycidae*; subfamilia: *Lamiinae* y tribu *Monochamini*).
- Polilla Fantasma *Hepialus sp.* (Lepidoptera: *Hepialidae*).
- Perforador de madera *Xyleborus affinis* (Eichhoff) (Coleoptera: *Scolytidae*).
- Barrenador de ramas (Coleoptera, *Curculionidae*).
- Perforador del tallo (Coleoptera, *Platypodidae*).

En plantaciones de *S. parahybum* el hongo *Armillaria mellea* se manifiesta en su primera etapa de ataque sobre las hojas y ramas, donde se observa una decoloración y decaimiento general; posteriormente, aparece la pudrición de la madera y cuando el árbol está muriendo o muerto, se notan los sombrerillos en la base del tronco, o en los

tocones de los árboles caídos. Las plantas enfermas van aumentando y su difusión se realiza en forma radial (González *et al.*, 2012).

Las medidas de control son muy difíciles de realizar debido principalmente a que la dispersión de la enfermedad es a través de los rizomorfos subterráneos que pasan de las raíces enfermas a las sanas. Las características del hongo para su reconocimiento, pueden ser de carácter macro o microscópicos (González *et al.*, 2012).

Existen otros factores ambientales externos, o aún dentro de la planta, como la presencia del o los insectos barrenadores, los cuales de alguna manera no solo colaboran en la penetración del hongo en el tallo de los árboles, sino en su diseminación dentro de ellos, como se observa en las plantaciones afectadas (Ospina *et al.*, 2003).

2.1.2. *Fusarium* spp

Las especies ubicadas dentro del género *Fusarium*, se las clasifican taxonómicamente de la siguiente forma (Arias y Jerez, 2008):

Reino	Mycetae
División	Eumycota
Sub División	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Tuberculariceae
Género	<i>Fusarium</i>

2.1.2.1. Descripción

Fusarium spp. es un hongo Deuteromicete (imperfecto), patógeno, causante del marchitamiento vascular principalmente en vegetales y flores; además recientemente se ha conocido que es responsable de micosis en animales y humanos. Presenta especies fitopatógenos como, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. roseum*, *F. lateritium* y *F. oxysporum*.

2.1.2.2. Patogenicidad y síntomas

Fusarium spp., penetra la epidermis de las raíces y/o corteza, finalmente entra a los vasos de la xilema, colonizando el sistema vascular, en el cual el fitopatógeno produce compuestos complejos que interfieren con la capacidad de la planta al traslocar la toma de agua y nutrientes; ocasionando la degradación de tejidos y la muerte (Ochoa, 1996).

Los síntomas de la enfermedad aparecen de forma unilateral; se acompaña de un amarillamiento parcial de las hojas, a veces se observa una mitad clorótica y la otra verde normal y el doblamiento de los brotes hacia el lado de la planta enferma; a su vez se observa enanismo de éstos y disminución en el crecimiento de la planta, los síntomas avanzan lentamente por la planta hacia arriba hasta causar un marchitamiento generalizado y la muerte (Arbelaez, 2000).

2.1.2.3. Metabolitos tóxicos excretados por *Fusarium*

El género *Fusarium* aparte de inactivar las sustancias tóxicas producidas por el anfitrión como mecanismo de defensa, genera sus propias toxinas que aumentan su patogenicidad. Entre estas toxinas que aumentan su patogenicidad están las fitotóxicas como las eniatinas y ácido fusárico (Villa *et al.*, 2015).

2.1.3. *Botryodiplodia* sp. (Muerte descendente)

Esta especie se encuentran dentro de la división *ascomycota* y se caracterizan por ser patógenos endófitos, que tienen la capacidad de permanecer en estado de latencia durante un largo periodo de tiempo; por lo general en las plantas afectadas se generan enfermedades oportunistas, dado que ataca las plántulas cuando se encuentran débiles ya sea por cambios bruscos en la temperatura, estrés o heridas realizadas por insectos o sistemas de poda inadecuados (Mohali *et al.*, 2007).

En un estudio realizado por Jami *et al.* (2013) se demostró que el patógeno afecta generalmente el follaje de plantas del género *Schizolobium* ocasionando muerte del follaje, y sobre las hojas y ramas se observaron abundantes estructuras reproductivas del microorganismo o picnidios, junto con esporas de *Puccinia* spp.

En las plantas enfermas se pueden observar diferentes síntomas, inicialmente chancros localizados en las ramas, acompañados de muerte descendente, exudación de resina o gomas, caída prematura de las hojas y pudrición de la fruta; como consecuencia de la enfermedad los tejidos internos del duramen y la medula presentan coloraciones oscuras o negras (Jami *et al.*, 2013).

2.1.4. *Trichoderma* sp.

Es un género de hongos que se encuentran en los suelos de todas las zonas climáticas del mundo y son importantes descomponedores de materiales leñosos y herbáceos. *Trichoderma* es un hongo invasor oportunista, que se caracteriza por su rápido crecimiento, por la capacidad de asimilar una amplia gama de sustratos y por la producción de una variedad de compuestos antimicrobianos (Cano, 2011).

Algunas cepas han sido explotadas como agentes de control biológico de patógenos, incluyendo hongos y nematodos, todo mediado por la producción de enzimas de degradación de la pared celular, como: celulasas, quitinasas, glucanasas, entre otras, y la producción de antibióticos. También, han sido usadas en biorremediación, por su capacidad de degradar hidrocarburos, compuestos clorofenólicos, polisacáridos y los plaguicidas xenobióticos, utilizados en la agricultura (Verma *et al.*, 2007).

Igualmente, debido a la existencia de transposones ABC en sus moléculas, se considera estimulador del crecimiento vegetal e inductor de resistencia sistémica, debido a que modula o estimula algunas respuestas en la planta (Howell y Puckhaber, 2005). Entre los efectos positivos de la inoculación de plantas con *Trichoderma* se incluyen (Harman *et al.*, 2004):

- Control biológico de enfermedades causadas por patógenos.
- En la raíz y en algunos foliares presenta resistencia frente a enfermedades.
- Inducción de resistencia sistémica en las plantas.
- Cambios en la composición de la microflora de las raíces.
- Mejora la absorción de nutrientes, incluyendo, pero no limitado, al nitrógeno.

- Mejora de la solubilidad de los nutrientes del suelo.
- Mayor desarrollo de las raíces.
- Aumento de la formación de pelos radiculares.
- Presenta enraizamiento más profundo.

2.1.4.1. Características microscópicas

Las colonias del género *Trichoderma* se caracterizan por su rápido crecimiento, en cuanto a su coloración pueden variar de blanco-verde o amarillo-verdoso, pudiendo presentar anillos concéntricos. Al ser observado al lado reverso del medio de cultivo las colonias son color amarillo, ámbar o amarillo-verde (Poalacin, 2015).

Las colonias de este género en medio de cultivo con agar crecen de forma acelerada y los conidios se forman rápido y abundantemente en forma de polvillo, no hay micelio aéreo y la pigmentación es típica en tonos verdes, verdes-amarillos. Algunos cultivos presentan un olor parecido al coco y muchas de estas cepas crecen eficientemente que pueden ser en medios sólidos o líquidos y en un amplio rango de temperaturas, además son parcialmente tolerantes a baja humedad y tienden a crecer en suelos ácidos (Robles, 2014).

2.1.4.2. Condiciones de crecimiento de *Trichoderma* sp.

Según Flores (2015), las condiciones óptimas para un buen desarrollo:

- Temperatura: puede ser variable de 15-35 °C, siendo la óptima de desarrollo 25 °C.
- Humedad relativa: se desarrolla entre el 20 y 80%. Siendo la mejor 70%.
- pH: se desarrollan de la mejor manera entre 6 – 6,5, resistiendo valores mayores, debido a la secreción de ácidos orgánicos que acidifican al medio.
- Carbono: la principal fuente de este elemento es la celulosa.

2.1.4.3. Aplicaciones del género *Trichoderma* sp.

El género *Trichoderma* es de gran interés industrial, por ejemplo *T. reeser* es empleado en la producción de enzimas celulolíticas relacionadas con las fermentaciones alcohólicas, los detergentes, el blanqueo de papel, reciclaje, combustible, etc. El uso de *Trichoderma* en la biorremediación es conocido mundialmente, en el control biológico, en tanto que la biotecnología considera a este género como fuente de genes para la obtención de plantas transgénicas resistentes a enfermedades (Tijerino, 2010).

2.1.4.4. Mecanismo de acción en biocontrol

El género *Trichoderma* es conocido por emplearse en biocontrol de hongos fitopatógenos, debido a su comportamiento como hiperparásitos frente a ellos. Los mecanismos que le favorecen en biocontrol son enzimas, antibióticos, espacio, entre otros (Villaruel, 2015).

2.1.4.5. Capacidad antagonista

Trichoderma sp. presentan capacidades antagonistas variables, que dependen de la especificidad de la cepa y de sus modos de acción, las cepas nativas son más efectivas que las importadas. Dentro de los mecanismos responsables de su capacidad antagonista tenemos: antibiosis, competencia (espacio-nutrientes), micoparasitismo, desactivación de enzimas de los patógenos y otros (Martinez *et al.*, 2013).

2.1.4.6. Antibiosis

Trichoderma sp. produce metabolitos secundarios (compuesto volátiles y no volátiles) o antibióticos con actividad antifúngica, estos metabolitos inhiben a otros microorganismos sin la necesidad de establecer un contacto físico (Martinez *et al.*, 2013). La producción de metabolitos secundario varía de acuerdo a la cepa, en tanto que la cantidad y tipo de compuestos se relaciona con las condiciones ambientales y patológicas (Villaruel, 2015).

2.1.4.7. Micoparasitismo

Es el ataque de un hongo a otro siendo un proceso completo secuencial, que inicia con el

reconocimiento, ataque, penetración para finalmente provocar la muerte del huésped; para que esto se produzca se requiere que los microorganismos estén próximos (Villaruel, 2015).

Las enzimas son importantes en el micoparasitismo, debido que la penetración de la hifa de *Trichoderma* en el hospedaje está regulada por la maquinaria enzimática, la que varía de acorde al aislamiento y a las características del hospedante (Martinez *et al*, 2013).

2.1.4.8. Competencia

La competencia ocurre cuando diferentes microorganismos necesitan de un mismo recurso para su sobrevivencia, estos recursos pueden ser nutrientes, espacio físico, luz, oxígeno, etc. (Villaruel, 2015).

Trichoderma es un gran competidor de nutrientes y espacio, dentro de los nutrientes tenemos principalmente carbono, nitrógeno y hierro. Entre las características que le permiten prevalecer en este mecanismo antagonista, tenemos la alta velocidad de crecimiento, y la secreción de metabolitos que limitan el desarrollo de otros microorganismos (Martinez *et al.*, 2013).

2.2. Marco referencial

El control de microorganismos fitopatógenos del suelo es de los más difíciles de lograr; para ello se han desarrollado prácticas culturales, control biológico y control químico, siendo este último el más utilizado por ser económico y eficaz, en comparación con otras medidas (Rubio *et al.*, 2008). Las enfermedades de las plantas causadas por este tipo de hongos se hallan entre los factores más importantes que aumentan las pérdidas y afectan los rendimientos de los cultivos (Villa-Martínez *et al.*, 2015).

En el tratamiento de enfermedades causadas por *Fusarium* spp. y otros hongos se utilizan fungicidas sistémicos como los benzimidazoles, en este grupo se incluyen el benomil, carbendazim, tiabendazol, y tiofanato. Sin embargo, es probable que estos fungicidas sean agentes mutagénicos de las plantas (Agrios, 2005).

Las especies de *Trichoderma* poseen la capacidad de identificar la presencia del hospedante

debido a que este produce moléculas volátiles por lo que se genera un crecimiento acelerado en dirección del patógeno como respuesta al estímulo químico (Infante *et al.*, 2009).

La activación del mecanismo de competencia por espacio y nutrientes de *Trichoderma* contra *Fusarium*, lleva consigo el incremento en la producción micelio con el fin de limitar la obtención de nutrientes del medio al fitopatógeno por lo que éste no se llega a desarrollar en su totalidad (Infante *et al.*, 2009).

Estudios desarrollados por Osorio *et al.* (2014) revelaron la efectividad de las enzimas quitina, y glucanasa producidas por *T. asperellum* (T9), *T. virens* (T6), *T. gamsii* (T13), *T. longibrachiatum* (T19) en el control de *F. oxysporum*, donde el aislado T19 produjo quitina y glucanasa, observándose la reducción del área de crecimiento de *Fusarium* en presencia de dichos compuestos.

La inducción de resistencia sistémica en el hospedero es uno de los mecanismos indirectos de *Trichoderma* de mayor interés en el campo (Mukherjee *et al.*, 2013); dicho proceso involucra cambios celulares en el hospedero, tales como el aumento de depósitos de calosa en el interior de la pared celular y aumento en la actividad de peroxidasas y quitinasas (Harman, 2006). Otros procesos relacionados con la inducción sistémica contra patógenos del suelo, tal como *F. oxysporum*, *Fusarium* sp. *lycopersici* son el confinamiento, la inhibición del patógeno y los cambios histológicos en el hospedero (Hermosa *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que algunas especies de *Trichoderma* inducen el desarrollo de la planta y propician en ellas mecanismos de defensa contra patógenos (Vinale *et al.*, 2006), y además tiene la capacidad de estimular el desarrollo de tejidos meristemáticos primarios, los cuales están relacionados a la germinación, altura, peso de la planta y raíz, reflejándose en la planta como aumento a la tolerancia por estrés (Cupull *et al.*, 2003).

Este estudio desarrollado por Osuna *et al.* (2018) todas las cepas de *Trichoderma* sp. tuvieron mayores tasas de crecimiento radial que las cepas del patógeno; tres cepas de *Trichoderma* spp. mostraron alta capacidad de micoparasitismo y otra más mostró gran capacidad para modificar radicalmente el color del medio de cultivo. Se observaron los diferentes mecanismos de biocontrol de patógenos en las cepas de *Trichoderma* spp. confrontadas con *Fusarium* sp., lo que permitió seleccionar a las más promisorias (Osuna *et al.*, 2018).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

2.3. Localización del sitio experimental

La investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Microbiología Ambiental y Vegetal-UTEQ, y Biotecnología de la empresa PLANTABAL S.A., localizados en el Campus Ing. Manuel Haz Álvarez, km 1.5 vía a Santo Domingo de los Tsáchilas, y km 3 vía Valencia, Quevedo, Ecuador, respectivamente. En la figura 1 se muestra la ubicación geográfica de los laboratorios donde se realizó la investigación.

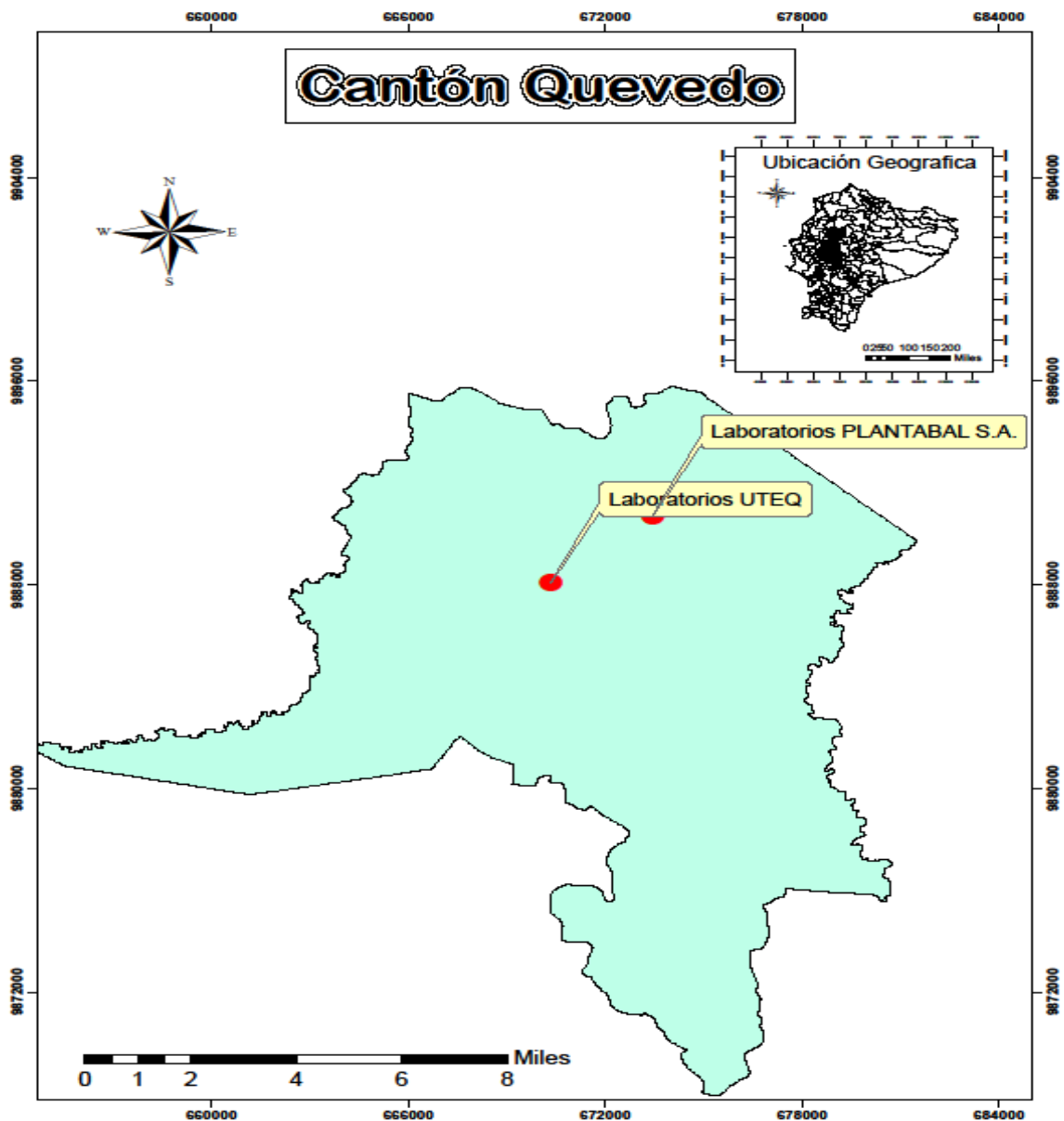


Figura 1. Ubicación de los laboratorios donde se realizó la investigación.

2.4. Tipo de investigación

Esta investigación es de tipo empírico-analítico que inicio de la experimentación y lógica, apoyada en la observación de resultados; ya que fue posible establecer deducciones al analizar los datos recogidos mediante la observación y de la información bibliográfica, antecedentes relacionados a la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp. frente a distintos fitopatógenos aislados de árboles enfermos de especies forestales.

2.5. Métodos de la investigación

Se utilizó el método comparativo, donde se comparó información existente en la literatura e investigaciones previas sobre la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp.

2.6. Fuentes

La información recopilada se la obtuvo a partir de revistas científicas, libros, boletines, etc., así mismo la información recopilada en la investigación se la realizo por registro de datos.

2.7. Materiales y equipos

Para la ejecución del presente proyecto de investigación se utilizaron los siguientes materiales.

3.5.1. Materiales de laboratorio

- Placas de Petri (plásticas y/o vidrio)
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación
- Erlenmeyer
- Microscopio
- Estereomicroscopio
- Bisturís
- Cinta de parafilm

- Agua destilada
- Sacabocado
- Asa micológica
- Algodón
- Cinta métrica o pie de metro

3.5.2. Reactivos

- Medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA)
- Ácido láctico
- Antibióticos (penicilina y estreptomicina)
- Detergente

3.5.3. Equipos de oficina

- Internet
- Cámara fotográfica
- Cuaderno
- Lápiz
- Pendrive
- Papel bond formato A-4
- Computador
- Impresora

3.6. Diseño de la investigación

3.6.1. Diseño para determinar la velocidad de crecimiento *in vitro* de dos cepas nativas de *Trichoderma sp.* en medio de cultivo PDA.

Para la evaluación del crecimiento *in vitro*, de las dos cepas nativas de *Trichoderma sp.* de estudio, se empleó un Diseño Completamente al Azar (DCA), constituido por seis tratamientos en cinco repeticiones en placas de Petri utilizando medio de cultivos PDA. A continuación, en la tabla 1, se detallan los tratamientos evaluados.

Tabla 1. Descripción de tratamientos para la evaluación del crecimiento *in vitro* de las de las dos cepas de *Trichoderma* sp.

N° Tratamiento	Descripción del tratamiento	N° de Repeticiones
1	<i>Trichoderma</i> sp. 1 a 4 ± 2 °C	5
2	<i>Trichoderma</i> sp. 1 a 24 ± 2 °C	5
3	<i>Trichoderma</i> sp. 1 a 30 ± 2 °C	5
4	<i>Trichoderma</i> sp. 2 a 4 ± 2 °C	5
5	<i>Trichoderma</i> sp. 2 a 24 ± 2 °C	5
6	<i>Trichoderma</i> sp. 2 a 30 ± 2 °C	5

- ***Trichoderma* sp. 1:** cepa aislada desde un cultivo de *Capsicum annuum* L. (pimiento) en el cantón Portoviejo, provincia de Manabí.
- ***Trichoderma* sp. 2:** cepa aislada desde plantaciones de *Tectona grandis* (teca) de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.

3.6.2. Diseño para ensayos antagonistas de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. a hongos fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA), constituido por doce tratamientos conformados por la combinación de antagonistas y fitopatógenos, y sus respectivos controles. Por cada tratamiento se empelaron cinco repeticiones en placas Petri, utilizando medios de cultivos PDA. A continuación, en la tabla 2, se detallan los tratamientos evaluados.

Tabla 2. Descripción de tratamientos con sus respectivas repeticiones para la evaluación de ensayos antagonistas.

N° Tratamiento	Descripción del tratamiento	N° de Repeticiones
1	<i>Trichoderma</i> sp. 1 Vs. <i>Fusarium</i> sp. 1	5
2	<i>Trichoderma</i> sp. 1 Vs. <i>Fusarium</i> sp. 2	5
3	<i>Trichoderma</i> sp. 1 Vs. <i>Botryodiplodia</i> sp.	5
4	<i>Trichoderma</i> sp. 2 Vs. <i>Fusarium</i> sp. 1	5
5	<i>Trichoderma</i> sp. 2 Vs. <i>Fusarium</i> sp. 2	5
6	<i>Trichoderma</i> sp. 2 Vs. <i>Botryodiplodia</i> sp.	5
7	<i>Trichoderma</i> sp. 1 y 2 Vs. <i>Fusarium</i> sp. 1	5
8	<i>Trichoderma</i> sp. 1 y 2 Vs. <i>Fusarium</i> sp. 2	5
9	<i>Trichoderma</i> sp. 1 y 2 Vs. <i>Botryodiplodia</i> sp.	5
10	<i>Fusarium</i> sp. 1 (control)	5
11	<i>Fusarium</i> sp. 2 (control)	5
12	<i>Botryodiplodia</i> sp. 2 (control)	5

- ***Trichoderma* sp. 1:** cepa aislada desde un cultivo de *Capsicum annum* L. (pimiento) en el cantón Portoviejo, provincia de Manabí.
- ***Trichoderma* sp. 2:** cepa aislada desde plantaciones de *Tectona grandis* (teca) de la Estación Experimental Tropical Pichilingue del INIAP.

3.7. Manejo del experimento.

3.7.1. Velocidad de crecimiento *in vitro* de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo PDA.

3.7.1.1. Preparación de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. en medio de cultivo PDA.

Para la preparación de las dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. previamente aislados y conservados en la colección, se realizaron siembras en placas de Petri de 8.5 cm de diámetro, conteniendo aproximadamente 10 ml de medio de cultivo (PDA), se incubaron durante ocho días a temperatura de laboratorio (24 ± 2 °C). Después de la incubación, con la asistencia de

un sacabocado estéril de 0,5 cm de diámetro, se realizó cortes circulares en las colonias, con el propósito de dar inicio al ensayo del crecimiento de cepas nativas de *Trichoderma* sp.

3.7.1.2. Evaluación de *Trichoderma* sp.

Mediante un sacabocado se extrajeron disco de agar de medio centímetro de diámetro desde colonias puras de las dos cepas de *Trichoderma* sp., y se sembraron en la parte central de las placas de Petri con medio de cultivos PDA, de tal manera que se evaluó el crecimiento micelar de cada una.

La variable estudiada fue el diámetro de crecimiento de los dos hongos (*Trichoderma* sp.1 y *Trichoderma* sp.2) bajo tres temperaturas (4 ± 2 °C, 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C) y se evaluó cada 24 horas, durante 96 horas de incubación.

3.7.2. Capacidad antagonica de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. a hongos fitopatogenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*

3.7.2.1. Preparación de los microorganismos

A partir de cepas de los hongos antagonistas y fitopatogenos previamente aislados y conservados en las colecciones, se realizaron siembras en placas de Petri de 8.5 cm de diámetro, conteniendo aproximadamente 10 ml de medio de cultivo PDA, e incubaron durante ocho días a temperatura de laboratorio (24 ± 2 °C). Después de la incubación, con la asistencia de un sacabocado estéril de 0,5 cm de diámetro se realizó cortes circulares en las colonias con el propósito de dar inicio y establecer el experimento de confrontación antagonica *in vitro*.

3.7.2.2. Evaluación de la capacidad antagonica.

Se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro*. Para el efecto mediante un sacabocados se extrajeron discos de agar de medio centímetro de diámetro, desde colonias puras de cada hongo fitopatogeno aislado de *S. parahybum*, y se sembraron en los extremos de las placas de Petri con medio de cultivo PDA, de tal manera que se evaluó el antagonico frente a los patogenos.

Una vez que se realizó las siembras para confrontar los microorganismos se hizo un seguimiento durante siete días, con lecturas cada 24 horas a partir de la siembra, con el fin de medir el crecimiento micelial de los hongos antagonicos y fitopatogenos. Las lecturas se suspendieron cuando el aislamiento del antagonico logro crecer hasta el extremo opuesto sobre el crecimiento micelial del patogeno. Se calcularon los valores medios de Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) a través de la siguiente ecuación [1] (Guédez *et al.*, 2012):

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} * 100 \quad [1]$$

Dónde: **R1** = Radio mayor (radio de patógeno testigo).

R2 = Radio menor (radio del patógeno enfrentado al antagonista).

De las zonas de confluencia de las colonias, se tomaron muestras de micelio y se hicieron montajes para observar al microscopio óptico y verificar la interacción hifal característicos de los procesos micoparasíticos de cada organismo (Garrido y Vilela, 2019). También se determinó el grado de antagonismo según la escala de clase planteada por (Bell *et al.*, 1982) (Tabla 3).

Tabla 3. Escala para clasificación del antagonista según Bell *et al.* (1982).

Grado	Capacidad antagónica
1	<i>Trichoderma</i> coloniza el 100% de la superficie del medio y crece sobre el fitopatógeno
2	<i>Trichoderma</i> coloniza las dos terceras partes de la superficie del medio de cultivo y limita el crecimiento del fitopatógeno.
3	<i>Trichoderma</i> y el fitopatógeno colonizan cada uno la mitad de la superficie, ningún hongo domina.
4	El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de <i>Trichoderma</i> .
5	El fitopatógeno coloniza dos terceras partes de la superficie del medio y limita el crecimiento de <i>Trichoderma</i> .

3.7.3. Influencia de la temperatura sobre la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp.

Para el efecto se emplearon la metodología descrita anteriormente, con la variante que en esta ocasión se consideraron tres temperaturas distintas y constantes (4 ± 2 °C, 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C).

CAPÍTULO IV
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Velocidad de crecimiento *in vitro* de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp.

Se determinó que *Trichoderma* sp.1 y *Trichoderma* sp.2 no mostraron crecimiento a temperatura de 4 ± 2 °C, mientras que a 24 ± 2 °C las cepas de *Trichoderma* sp.1 y *Trichoderma* sp.2, alcanzaron su máximo crecimiento a las 72 horas con diámetro de 8.5 cm, colonizando en su totalidad todo el medio de cultivo PDA. En el transcurso de las 24 y 48 horas *Trichoderma* sp.1 mostró el menor crecimiento con 2.2 cm y 6.3 cm de diámetro, seguido con *Trichoderma* sp.2 con mayor crecimiento a las 24 y 48 horas con 2.7 cm y 8.2 cm de diámetro. Estos resultados indican que *Trichoderma* sp.2 tuvo la mayor velocidad de crecimiento en medios de cultivos PDA, a partir de las 24 horas (figura 2).

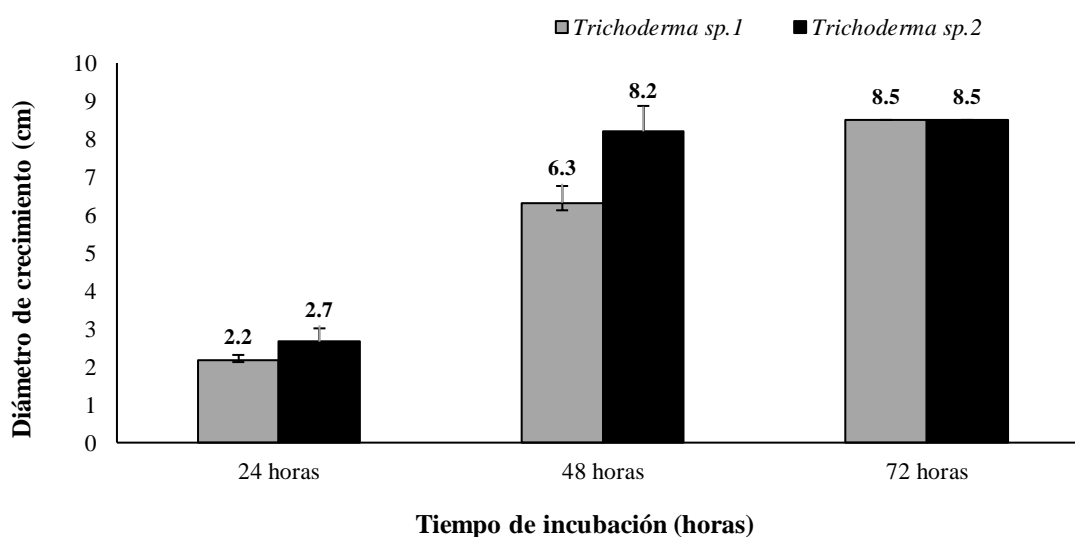


Figura 2. Diámetro de crecimiento (cm) alcanzado por *Trichoderma* sp.1 y *Trichoderma* sp, 2 durante 72 horas bajo condiciones de incubación a 24 ± 2 °C. Valores corresponden al promedio de crecimiento de colonias en cinco placas de Petri con medio de cultivo PDA.

Trichoderma sp.2, alcanzó su máximo crecimiento a las 72 horas cuando fue incubada a 30 ± 2 °C, colonizando totalmente el medio de cultivo PDA con sus 8.5 cm de diámetro. Mientras *Trichoderma* sp.1 mostró el menor crecimiento, con 2 cm, 4.4 cm y 6.9 cm de diámetro a las 24, 48 y 72 horas. Estos resultados indican que el crecimiento de *Trichoderma* sp.2 es favorecido por temperaturas iguales o superiores a los 24 ± 2 ° C (figura 3).

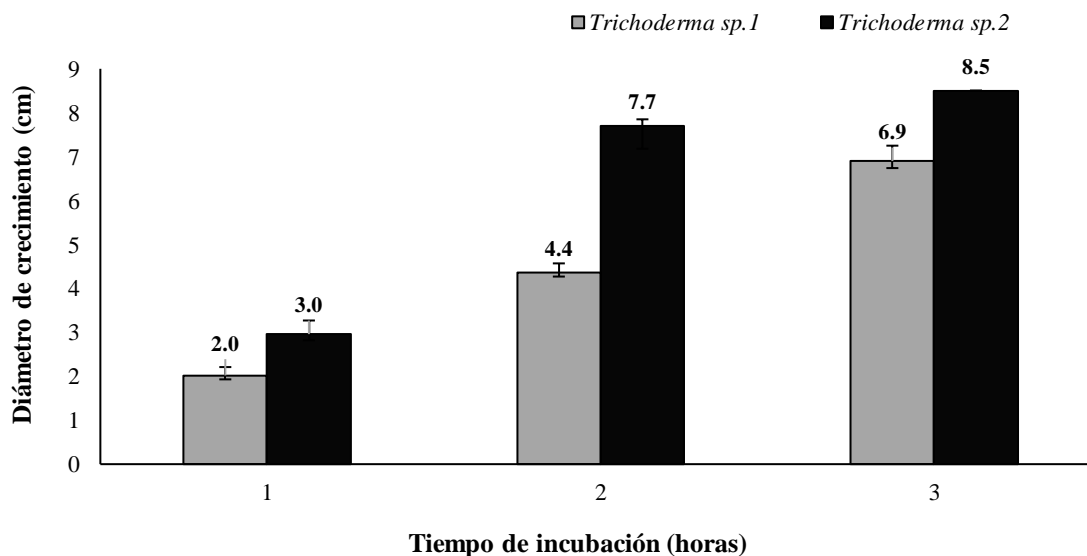


Figura 3. Diámetro de crecimiento (cm) alcanzado por *Trichoderma sp. 1* y *Trichoderma sp.2*, durante 72 horas bajo condiciones de incubación a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$. Valores corresponden al promedio de crecimiento de colonias en cinco placas de Petri con medio de cultivo PDA, con su respectiva desviación estándar y error estándar.

4.2. Capacidad antagonista de dos cepas nativas de *Trichoderma sp.* a hongos fitopatógenos de *S. paratyphum* a nivel *in vitro*

En los ensayos antagonista de confrontamiento *in vitro*, se determinó que los antagonistas y los fitopatógenos no mostraron crecimiento micelar bajo condiciones de incubación a temperatura de $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, mientras que a temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos fitopatógenos de pachaco, ejercido por dos cepas de *Trichoderma sp.*, se detectaron diferencias estadísticas significativas en todas las evaluaciones (24, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 horas).

En la figura 4 se aprecia la reducción del crecimiento radial en los hongos fitopatógenos, siendo notorio su efecto desde las primeras 24 horas de incubación, y esta inhibición se fue acentuando conforme aumentó el tiempo de incubación, donde en algunos tratamientos a las 168 horas superó el 50%.

La inhibición del crecimiento del micelio patógeno, varío de acuerdo a los enfrentamientos o tratamiento y sus respectivos testigos.

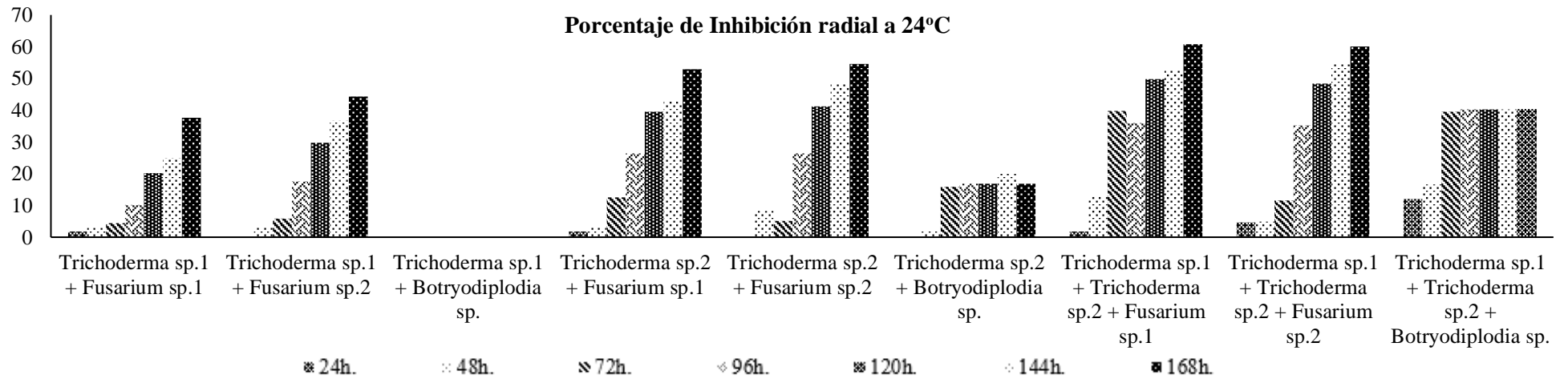


Figura 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de *S. parahybum* (pachaco) frente a dos cepas de *Trichoderma* sp. a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de incubación.

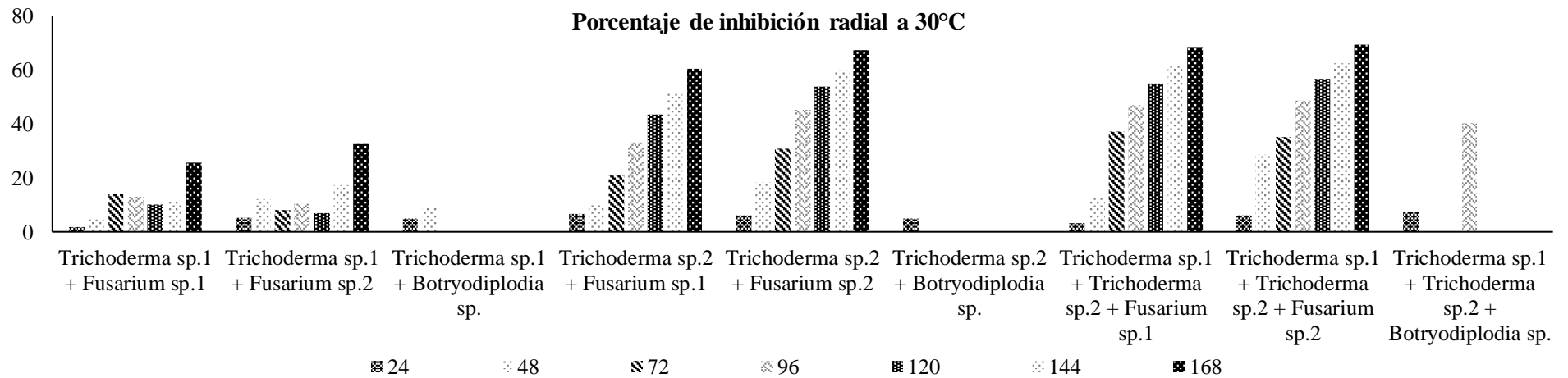


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial de hongos fitopatógenos de *S. parahybum* (pachaco), frente a dos cepas de *Trichoderma* sp. a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ de incubación

En temperatura de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos fitopatógenos de *S. parahybum* (pachaco), ejercido por dos cepas de *Trichoderma* sp., se detectaron diferencias estadísticas significativas en todas las evaluaciones (24, 48, 72, 96, 120, 144, y 168 horas). En la figura 5 se aprecia la reducción del crecimiento radial en los hongos fitopatógenos, siendo notorio su efecto desde las primeras 24 horas de incubación, y esta inhibición se fue acentuando conforme aumentó el tiempo de incubación, donde en algunos tratamientos a las 168 horas superó el 60%.

De acuerdo a la escala propuesta por Bell *et al.* (1982), la capacidad antagónica de *Trichoderma* sp.2 frente a los fitopatógenos de *S. parahybum*, corresponden al grado 1 a temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, desde las 168 horas de incubación. La capacidad antagónica de *Trichoderma* sp.1 frente a *Fusarium* sp. 1 y *Fusarium* sp. 2 corresponde al grado 1, mientras que frente a *Botryodiplodia* sp se ubica en el grado 2, a temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, desde las 168 horas de inoculación.

4.2.1. Características de microorganismos.

Durante las 168 horas bajo condiciones de incubación a temperaturas $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, se observó el nivel de crecimiento y características de cada microorganismo, llegando a obtener diferencias tanto en crecimiento de sus diámetros, coloración y en el aspecto (Tabla 4).

Tabla 4. Crecimiento y caracterización a nivel *in vitro* de cada microorganismo en estudio.

Característica	<i>Trichoderma</i> sp. 1	<i>Trichoderma</i> sp.2	<i>Fusarium</i> sp.1	<i>Fusarium</i> sp.2	<i>Botryodiplodia</i> sp.
Diámetro (cm)	8,5	8,5	5,3	6,2	8,5
Coloración	Blanquecino	Verde claro	Vino	Naranja oscuro	Negro
Aspecto	Esponjoso	Polvoriento	Esponjoso	Esponjoso	Esponjoso

Trichoderma sp 1, presentó una invasión total del medio de cultivo PDA, a las 168 horas a temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, con coloración blanquecina, aspecto esponjoso abundante, sin

presencia de anillos concéntricos y a temperaturas de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ presentó formaciones de anillos concéntricos, desde las 168 horas de incubación.

El *Trichoderma* sp. 2, presentó una invasión total en el medio de cultivo PDA, a las 168 horas de incubación a temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$, se presentó de coloración verde claro con aspecto polvoriento, sin presencia de formaciones de anillos concéntricos. En temperaturas de $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, *Trichoderma* sp. 2 presentó formaciones de grupos de conidias.

Fusarium sp. 1, presentó un crecimiento promedio de 5,3 cm de diámetro durante las 168 horas de incubación, desde temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, dentro de las características se presentó de una coloración frontal de color blanquesina, con aspecto algodonoso, con formaciones de anillos concéntricos, micelio color blanco, conidios color vino y al reverso de la placa Petri tuvo una coloración vino claro.

Fusarium sp. 2, presentó un crecimiento promedio de 6,2 cm de diámetro a las 168 horas de incubación, desde temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, dentro de las características se presentó de una coloración frontal de color blanquesina, con aspecto algodonoso, con formaciones de anillos concéntricos, micelio color blanco, conidios color naranja y al reverso de la placa Petri tuvo una coloración naranja amarilloso.

Botryodiplodia sp., presentó un crecimiento de 8,5 cm de diámetro, invadiendo todo el medio de cultivo PDA. en temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $30\pm 2^{\circ}\text{C}$, dentro de las características se presenta de una coloración frontal de color negra, con aspecto algodonoso, con formaciones de picnidios, micelio color blanco y conidios de color negro.

4.2.1.1. Microscopía de las interacciones de *Trichoderma* sp. y los fitopatógenos

Las dos cepas de *Trichoderma* sp. mostrarán diferentes tipos de interacción hifal, como vacuolización, enrollamiento, presencia de esporas e invasión (figura 6), a temperaturas de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ y $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ desde las 168 horas de incubación.

Presentando acción por micoparasitismo en algunos tratamientos, donde se observó entrelazamientos de hifas, limitando el crecimiento micelar y actividad de los hongos fitopatógenos de pachaco.

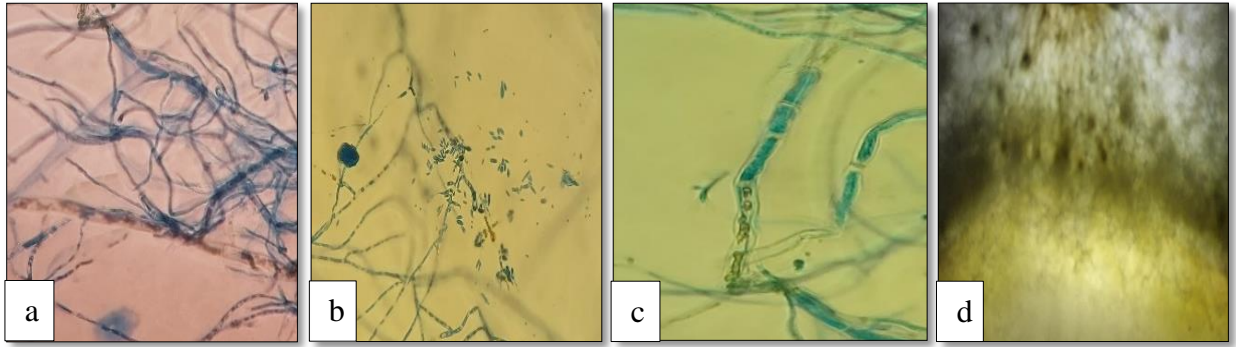


Figura 6. a) Interacción de antagonismo por enrollamiento b) Presencia de esporas c) Vacuolización d) Zona de confrontamiento.

4.3. Discusión

De acuerdo con los resultados expuestos, las dos cepas nativas de *Trichoderma* sp., tienen un buen desarrollo en su crecimiento a temperaturas de $24\pm 2^\circ\text{C}$ y $30\pm 2^\circ\text{C}$, siendo la cepa de *Trichoderma* sp. 2 quien mostró mayor agresividad en su capacidad antagónica, desde el inicio de su incubación, enfrentados con los fitopatógenos de *S. parahybum*; tal como señala Tronsmo y Dennis (1978) en general las temperaturas de 25°C y 30°C fueron muy favorables para el crecimiento de todas las cepas nativas *Trichoderma* spp .

Sin embargo, el porcentaje de colonización de las mismas, estuvo relacionado con la velocidad a la cual desarrolló el patógeno. Según Mitidieri (1988), para que un microorganismo ejerza su aptitud a la competencia, las exigencias térmicas del antagonista deben ser compatibles con las del patógeno. Esto significa que para que un sustrato determinado, la velocidad de crecimiento a las diferentes temperaturas debe ser superiores o al menos iguales a las del patógeno (Rollan *et al.*, 1999). En el control de crecimiento de los patógenos, presentaron un buen desarrollo en temperaturas de $24\pm 2^\circ\text{C}$ y $30\pm 2^\circ\text{C}$, similares a los antagonistas, lo que muestra la buena acción biocontroladora de las dos cepas nativas *Trichoderma* sp. contra los fitopatógenos de *S. parahybum*.

La reducción del crecimiento de los fitopatógenos de *S. parahybum*, se evidenció a las 96 horas hasta las 168 horas en todos los tratamientos. La cepa *Trichoderma* sp. 2 presentó mayor desarrollo sobre la superficie del medio, con porcentaje de inhibición de los patógenos, *Fusarium* sp.1 y *Fusarium* sp. 2 con 52.8 % y 54,6 %, en temperaturas de $24\pm 2^\circ\text{C}$ C, a 168 horas y a la temperatura de $30\pm 2^\circ\text{C}$, presentó mayor desarrollo sobre la superficie del medio con porcentaje de inhibición en *Fusarium* sp.1 y *Fusarium* sp.2. de 60,34 % y 67,24% a las 168 horas. Los valores de porcentaje inhibición presentado en este estudio son similares a los reportados por Mechel *et al.* (2009), quienes encontraron que al evaluar el efecto antagónico de aislamientos nativos de *Trichoderma* spp, sobre el crecimiento del micelio de *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*, los valores máximos de inhibición fueron de 42.0 % y 62.9% respectivamente.

Al hacer las evaluaciones diarias, el confrontamiento de las dos cepas *Trichoderma* sp., con los fitopatógenos de pachaco ocurrió a las 72 horas similares a los reportados por Michel *et*

al (2009) quienes encontraron que al evaluar el efecto antagónico de aislamientos nativos de *Trichoderma* spp, sobre el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* y *F. subglutinans* en cultivos duales con las cepas seleccionadas de *Trichoderma*, el tiempo al primer contacto para Fo fue entre 3 y 4 días, mientras que para Fs entre 2 y 3 días.

Las dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. presentaron un alto nivel de antagonismo, uno de su mecanismo de acción fue por competencia y espacio contra los tres fitopatógenos de *S. parahybum*. La velocidad de crecimiento es un carácter ventajoso en la disputa por colonizar el área, compitiendo por espacio y nutrientes; esta es una manera de ejercer biocontrol, al reducir o detener completamente al desarrollo del micelio (Dennis y Webster, 1971).

Estudios desarrollados por Osorio *et al.* (2014) revelaron la efectividad de las enzimas quitina, y glucanasa producidas por *T. asperellum* (T9), *T. virens* (T6), *T. gamsii* (T13), *T. longibrachiatum* (T19) en el control de *F. oxysporum*, donde el aislado T19 produjo quitina y glucanasa, observándose la reducción del área de crecimiento de *Fusarium* en presencia de dichos compuestos.

En los confrontamientos de las dos cepas de *Trichoderma* sp. junto a cada patógeno, se observó un mayor nivel de antagonismo con la cepa *Trichoderma* sp. 2, siendo el primero en invadir a los fitopatógenos de *S. parahybum*. *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp.2 contra *Fusarium* sp. 1 y *Trichoderma* sp. 1, *Trichoderma* sp.2 contra *Fusarium* sp.2 a temperaturas de 24 ± 2 ° C y 30 ± 2 ° C desde las 168 horas de incubación, invadieron todo el medio de cultivo PDA, la cepa *Trichoderma* sp.2 ocupó el 70 % de área del medio de cultivo y la cepa *Trichoderma* sp.1 ocupó un 30 % del área.

En confrontamiento de las dos cepas antagonista frente a *Botryodiplodia* sp. se mostró una invasión de la cepa *Trichoderma* sp.1 con 40% y la cepa *Trichoderma* sp.2 con 60% en todo el medio de cultivo, limitando el crecimiento del patógeno por acción de antibiosis, ante el contacto hifal, por lo que se observó el cambio de pigmentación en los micelios del patógeno desde las 168 horas a temperatura de 24 ± 2 ° C y 30 ± 2 ° C, esto se explica por la excreción de metabolitos al medio con efectos fungistáticos, estos resultados se corroboran con lo obtenido por Martínez *et al.* (2013) y Schirmbock *et al.* (1994) quienes afirman que *Trichoderma* incorpora metabolitos, como *trichodermin*, *trichodermol*, *harzianum* A y *harzianolide*.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- La cepa nativa *Trichoderma* sp. 2 tuvo el mayor desarrollo en crecimiento micelar, desde el inicio de su incubación hasta las 72 horas, alcanzando un diámetro de 8.5 cm, colonizando todo el medio de cultivo PDA, en temperaturas de 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C.
- Los principales mecanismos de acción de las dos cepas nativas *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*, fue por parasitismo, actividad antibiótica y por competencia de nutrientes y espacio, ya que se desarrollaron rápidamente, superando el crecimiento de *Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2 y *Botryodiplodia* sp., impidiendo el desarrollo normal e inhibiendo en más de 50% a temperatura de 24 ± 2 °C y más de 60% a temperatura de 30 ± 2 °C, desde las 168 horas de incubación.
- La variación de temperatura si influyó en la capacidad antagónica de las dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. frente a hongos fitopatógenos de *S. parahybum* a nivel *in vitro*. Con mayor capacidad antagónica en temperaturas de 24 ± 2 °C y 30 ± 2 °C hasta las 168 horas de incubación, mostrando un buen desarrollo en el control de *Fusarium* sp. 1, *Fusarium* sp. 2 y *Botryodiplodia* sp.

5.2. Recomendaciones

- Las dos cepas nativas de *Trichoderma* sp. frente a fitopatógenos aislados de árboles de *S. parahybum*, con síntomas de enfermedad “decaimiento y muerte descendente” a nivel *in vitro* presentaron alta capacidad antagónica, se sugiere continuar con investigaciones en condiciones *in situ*.
- Realizar pruebas cuantitativas y cualitativas que permitan determinar dosis eficientes de estos biocontroladores en plantaciones de *S. parahybum* y su capacidad protectante a través del tiempo.
- Realizar estudios con las dos cepas nativas de *Trichoderma* sp, frente a otras especies forestales y agrícolas.

CAPÍTULO VI
BIBLIOGRAFÍA

6.1. Bibliografía

- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. United States of América. 922 p.
- Arbelaez, G. (2000). Investigación y desarrollo en el control de marchitamiento vascular del clavel en Colombia . Edición Harti Tecnic. 89-98 p.
- Arbito, M. (2017). Evaluación *in vitro* de la capacidad antagónica de *Trichoderma* spp. frente a *Fusarium* spp. Tesis de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador. 76 p.
- Arias, J. y Pérez, A. (2008). Elaboración de un atlas para la descripción macroscópica y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la Sabana de Bogotá. Trabajo de grado en Microbiología Industrial. Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de Microbiología Industrial. Bogota , Colombia. 31 -42 p.
- Belezaca, C., Suárez, C. y Vera, D. (2011). Hongos Fitopatogenos asociados a la enfermedad de muerte regresiva y pudricion del fuste de pachaco (*Schizolobium parahybum*) en el tropico húmedo ecuatoriano. *Boletín Micológico*, 26: 15-2.
- Bell, D., Well, H. y Markham, C. (1982). *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against sixfugal plant pathogens. *Phytopathology*, 72: 379-382
- Borja, C. (2010). Plantas nativas para la reforestación en el Ecuador. Fundación Natura, AID. Edunac III. Quito, Euador. 85 p.
- Cano, M. (2011). Interacción de microorganismo beneficos en plantas :Micorrizas,*Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. *U.D.C.A* .14 (2): 15-31. Recuperado de from <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>
- Cupull, S., Andréu, C., Pérez, N. y Delgado, P. (2003). Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación, el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Centro Agrícola*, 30(1): 21-25.
- Dennis, D. y Webster, J. (1971). Antagonistic Properties of species group of *Trichoderma*. I: Production of non-volatile antibiotics. *Trans Brit Mycol Soc.* 57: 25-39.
- Dwiastuti, M. , Fajri, M. y Yunimar, Y. (2016). Potensi *Trichoderma* spp. sebagai Agens Pengendali *Fusarium* spp. Penyebab Penyakit Layu pada Tanaman Stroberi. *Jurnal Hortikultura*, 25(4): 331-339 .
- Eraso, C., Acosta, R., Salazar, G. y Betancourth, G. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium*

- oxysporum*. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(2):237-249.
- López, N., Ruales, G., Celi, H. y Jimenez, H. (2015). Trabajabilidad de madera *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake y diselos de un mueble prototipo con madera de pequeñas dimensiones. *Bosques latitud cero*, 5: (2), 1-12.
- Flores, L. (2015). Determinación del efecto antagonista de cepas nativas de *Trichoderma* spp. frente a *Mycosphaerella fijiensis* en plantas de banano a nivel de invernadero. Riobamba. Trabajo de grado de Ingeniería en Biotecnología Ambiental. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Chimborazo, Ecuador, 20-45 p.
- Garrido, M. y Vilela, N. (2019). Capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum* frente a *Rhizoctonia*, *Nakatea sigmoidea* y *Sclerotium rolfsii* y su efecto en cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de cultivos de arroz. *Scientia Agropecuaria* 10 (2): 199-206.
- González, M., Torres, L. y Guzmán, H. (2002). Búsqueda de resistencias natural contra patógenos de raíz *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani* y *Fusarium oxysporum* en colectas de Chile. Tampico: Proceedings of the 16 th Internacional Pepper. Retrieved Agosto 04, 2020, from file:///C:/Users/VAIO/Downloads/Dialnet-AntagonismoInVitroDeTrichodermaHarzianumRifaiSobre-2868712%20(2).pdf
- Guédez, C., Cañizales, L., Castillo, C. y Olivar, R. (2012). Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 32: 44-49 .
- Harman, G. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*, 96: 190-94. Recuperado en Agosto 14, 2020, from <https://revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/961/820>
- Harman, G., Petzoldt, R., Comis, A. y Chen, J. (2004). Interactions Between *Trichoderma harzianum* strain T22 and maize inbred line Mo17 and effects of these interactions on diseases caused by *Pythiummultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopath*, 94:147-153.
- Hermosa, M., Keck, E., Chamorro, I., Rubio, B., Sanz, L. y Vizcaino, J. (2004). Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. *Mycol Res*, 108: 897-906.
- Howell, C., y Puckhaber, L. (2005). A study of the characteristics of “P” and “Q” strains of *Trichoderma virens* to account for differences in biological control efficacy against cotton seedling diseases. *Biol. Control.*, 33: 217-222. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v14n2/v14n2a03.pdf>

- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Vegetal*, 24 (1): 14-21.
- Jami, F., Slippers, B., Wingfield, M. y Gryzenhout, M. (2013). Botryosphaeriaceae diversidad de tejidos sanos de especies forestales, asociados con enfermedad. *Australasian Plant Pathology*. 42 (4): 421-430.
- Jorgensen, P. y León, Y. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Missouri Botanical Garden*, 75:1-1181.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). (2015). Programa de Incentivos para la reforestación con fines comerciales. Guayas, Ecuador. 69 p.
- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Protección Vegetal*. 12: 1-11.
- Martínez, P., Osorio, E., Estrada B., López J., Varela, S. y Torres, J. (2017). Control biológico de fitopatógenos mediante aislados de *Trichoderma* spp. *Agroproductividad*, 10: 9-14.
- Martínez, B., Infante, D., González, E., Baños, H. y Cruz, A. (2008). Selección de aislamiento de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev. Protección Vegetal*. 23 (2): 118-125.
- Masapanta, C. (2011). Propagación vegetativa del Pachaco (*Shizolobium parahybum*), con la utilización de hormonas ANA Y AIB. Tesis de Ingeniería Forestal, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. Quevedo, Los Ríos, Ecuador. 35–50 p.
- Mejía, M., Reyes, A., Cristobal, J., Tun, J., Borges, L. y Pacheco, J. (2016). *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. *Mexican Journal of Phytopathology*. 34(3): 208–222.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1603-1>
- Mendoza, Z., Loja, A., Solano, M. y Aguirre, N. (2015). Especies Forestales más aprovechadas del Sur del Ecuador. Universidad Nacional de Loja. Ecuador. 128 p.
- Meyer, C. (2009). El diálogo político regional sobre bosques en la cuenca Amazónica. *Bosques Latitud Cero*. 12 : 32-34.
- Michel, A., Otero, S., Solano, P., Barrios, A. y Rebolledo, M. (2009). Biocontrol *in vitro* con *Trichoderma* spp. de *Fusarium subglutinans* (Wollenweb. y Reinking) Nelson, Toussoun y Marasas y *F. oxysporum* Schlecht., agentes causales de la “escoba de bruja” del mango (*Mangifera indica* L.). *Mexicana de Fitopatología*, 27: 18-26.
- Mitidieri, I. (1988). Control Biológico de hongos patógenos del suelo. Bol. Div. Técnica N°4. INTA. 12 pp.

- Mohali, S., Slippers, M. y Wingfield, J. (2007). Two new *Fusicoccum* species from *Acacia* and *Eucalyptus* in Venezuela based on morphology and DNA sequence data. *Mycological Research*. 110 (4):405–413
- Mukherjee, P., Horwitz, B., Herrera, E., Schmoll, M., y Kenerley A. (2013). *Trichoderma* Research in the Genome Era. *Annu. Phytopathol.* 51: 29-105.
- Ochoa, J. (1996). Control biológico del marchitamiento vascular del clavel ocasionado por *Fusarium oxysporium* f. sp. dianthi. Mediante el uso de los microorganismos potencialmente antagonistas *Pseudomonas fuorences*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum*. Trabajo de grado (biologo). Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Carrera de biología. Bogotá, D.C. 32-142 p.
- Osorio, E., Hernández, J., Conde, V., Michel, A., Cibrián, J. y Vaquera, H., (2014). Biocontrol of *Phytophthora* parasitica and *Fusarium* spp. by *Trichoderma* spp. in *Hibiscus sabdariffa* plants under field and greenhouse conditions. *African Journal of Agricultural Research* 9: 1345-1398.
- Ospina, P., Hernández, C. y Arist, R. (2003). Aspectos ecológicos y silviculturales para el manejo de especies forestales nativas. *Centro Nacional de Investigaciones de Café CENICAFÉ. 1*, 144-145.
- Osuna, C., Canul, J., García, F., Ramírez, S., Rangel, S. y Patricio, L. (2018). Aislamiento y selección *in vitro* de cepas nativas de *Trichoderma* spp. para el biocontrol de *Fusarium* sp. en *Euphorbia polcherrima*. *Agro productividad*, 11: 21-27.
- Poalacin, J. M. (2015). Estudio del adecuado crecimiento del hongo *Trichoderma haezianum* y *Trichoderma hamatum* en sustratos sólidos. Tesis de grado para la obtención del Título de Ingeniería Química. Carrera de Ingeniería Química. Quito: UCE. 90 p.
- Robles, A. (2014). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. *Centro de biotecnología*. 1: 34-43.
- Rollan, M., Mónaco, C. y Nico, A. (1999). Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre las especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. minor* y *Sclerotium rolfsii*. *Invest. Agr.: Prod. Protectora Vegetal*. 14: 1-2.
- Rosales, L., Suhartono, F., Dvorak, W. y Romero, J. (1999). Parámetros genéticos y variación entre procedencias de *Schizollobium parahybum* (Vell) Blake establecidas en Venezuela. *Foresta Veracruzana*, 1(2):13–18.
- Rubio, G., Baltodano, F., Abanto, L., Wilson, J. y Muñoz, M. (2008). Resistencia *in vitro* de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* a los fungicidas Benzomil 500, Rhizolex-

- T y Homai-WP. Biológica de la Universidad de Trujillo, 34-36 p.
- Schirmbock, M., Lorito, M., Wang, L., Hayes, K., Arisan, I., Scala, F., Harman, E. y Kubicek P. (1994). Parallel formation and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol.* 60 (12): 4364-4370.
- Stefanova, M. (1996). Producción y aplicación de *Trichoderma* spp. como antagonista de hongos fitopatógenos. La Habana: Instituto de Sanidad Vegetal. Retrieved Agosto 04, 2020, from file:///C:/Users/VAIO/Downloads/Dialnet-AntagonismoInVitroDeTrichodermaHarzianumRifaiSobre-2868712%20(2).pdf
- Tijerino, A. (2010). Aislamiento caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* *Trichoderma brevicompactum*. Tesis de pregrado (microbiología). Universidad de Salamanca. España. 20-60 p.
- Tronsmo, A. y Dennis, C. (1978). Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 74(3): 469-474.
- Trujillo, E. (2003). Manual de árboles. 2 ed. El semillero. Bogotá, Colombia. 158-160 p.
- Vasquez, E. (2010). Usos probables de algunas maderas del Ecuador. (Ministerio de Agricultura y Ganadería. Programa Nacional Forestal. Quito- Ecuador.
- Verma, M., Brar, S., Tyagi, D., Surampalli, Y. y Valero, H. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering J.* 37:1-20.
- Villa, A., Pérez, R., Morales, A., Basurto, M., Soto, M. y Martínez, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2):194-205. doi:0120-2812.
- Villaruel, E. (2015). Evaluación del control biológico de *Fusarium* spp. mediante fusión de protoplastos de cepas nativas de *Trichoderma harzianum* y *T. asperellum* e inducción de crecimiento de *Arabidopsis thaliana*. Tesis de pregrado (Biotecnología). Universidad de las Fuerzas Armadas. Salgoquin -Ecuador. 1-120 p.
- Vinale, F., Marra, R., Scala, F., Ghisalberti, E., Lorito, M., y Sivasithamparam, K. (2006). Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Lett. Appl. Microbiology.* 43: 143-148 .

CAPÍTULO VII

ANEXOS

Anexo 1. Cajas Petri con medios de cultivos PDA.



Anexo 2. Siembra de microorganismos en estudio.



Anexo 3. Evaluaciones de crecimiento de *Trichoderma* sp. a temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$.



Figura 7. Crecimiento de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp., a las 48 horas a $24 \pm 2^\circ \text{C}$.

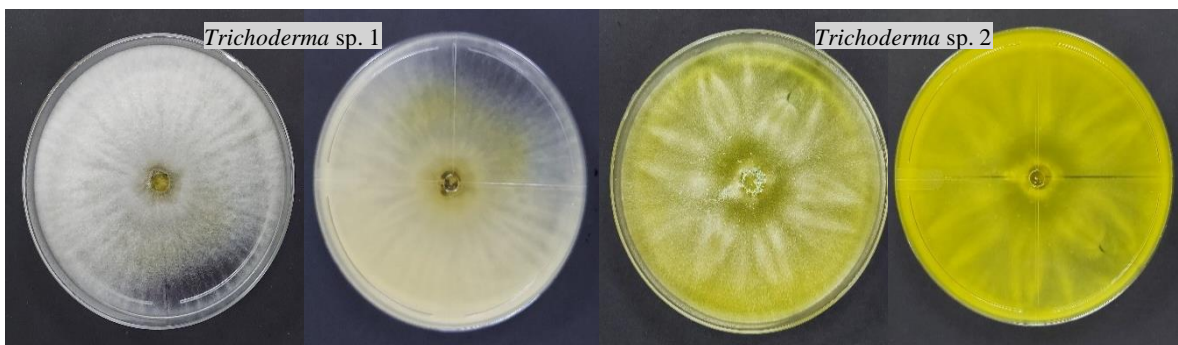


Figura 8. Crecimiento de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp., a las 72 horas $24 \pm 2^\circ \text{C}$.

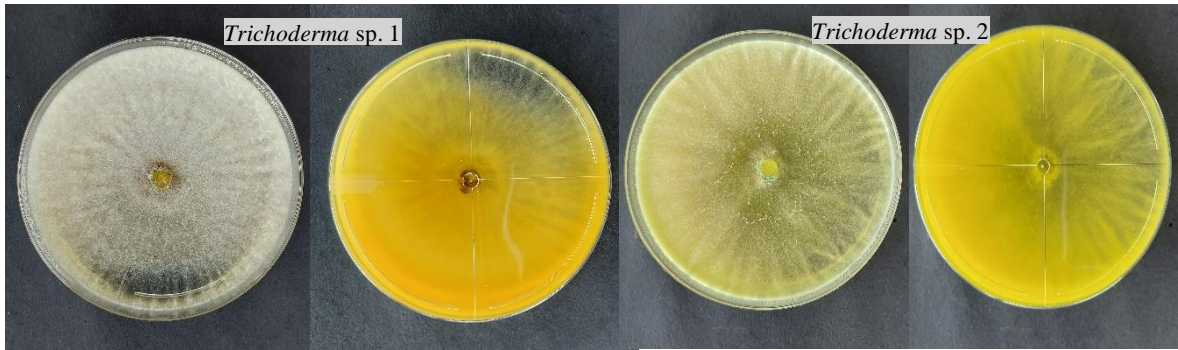


Figura 9. Crecimiento de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp., a las 96 horas $24 \pm 2^\circ \text{C}$.

Anexo 4. Evaluaciones de crecimiento de *Trichoderma* sp. a temperatura de $30 \pm 2^\circ \text{C}$.

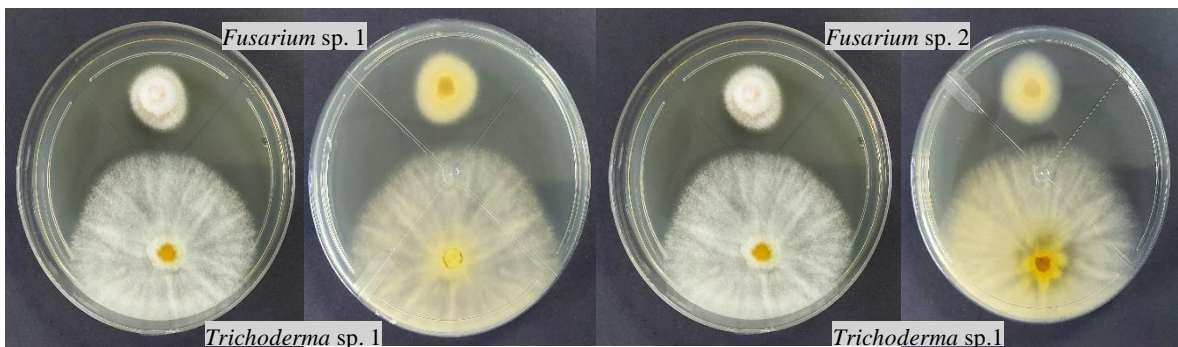


Figura 10. Crecimiento de las dos cepas nativas de *Trichoderma* sp., a las 72 horas $30 \pm 2^\circ \text{C}$.



Figura 11. Crecimiento de dos cepas nativas de *Trichoderma* sp., a las 96 horas a $30 \pm 2^\circ \text{C}$.

Anexo 5. Evaluación antagonista a temperatura de $24 \pm 2^\circ \text{C}$ según sus tratamientos y control.



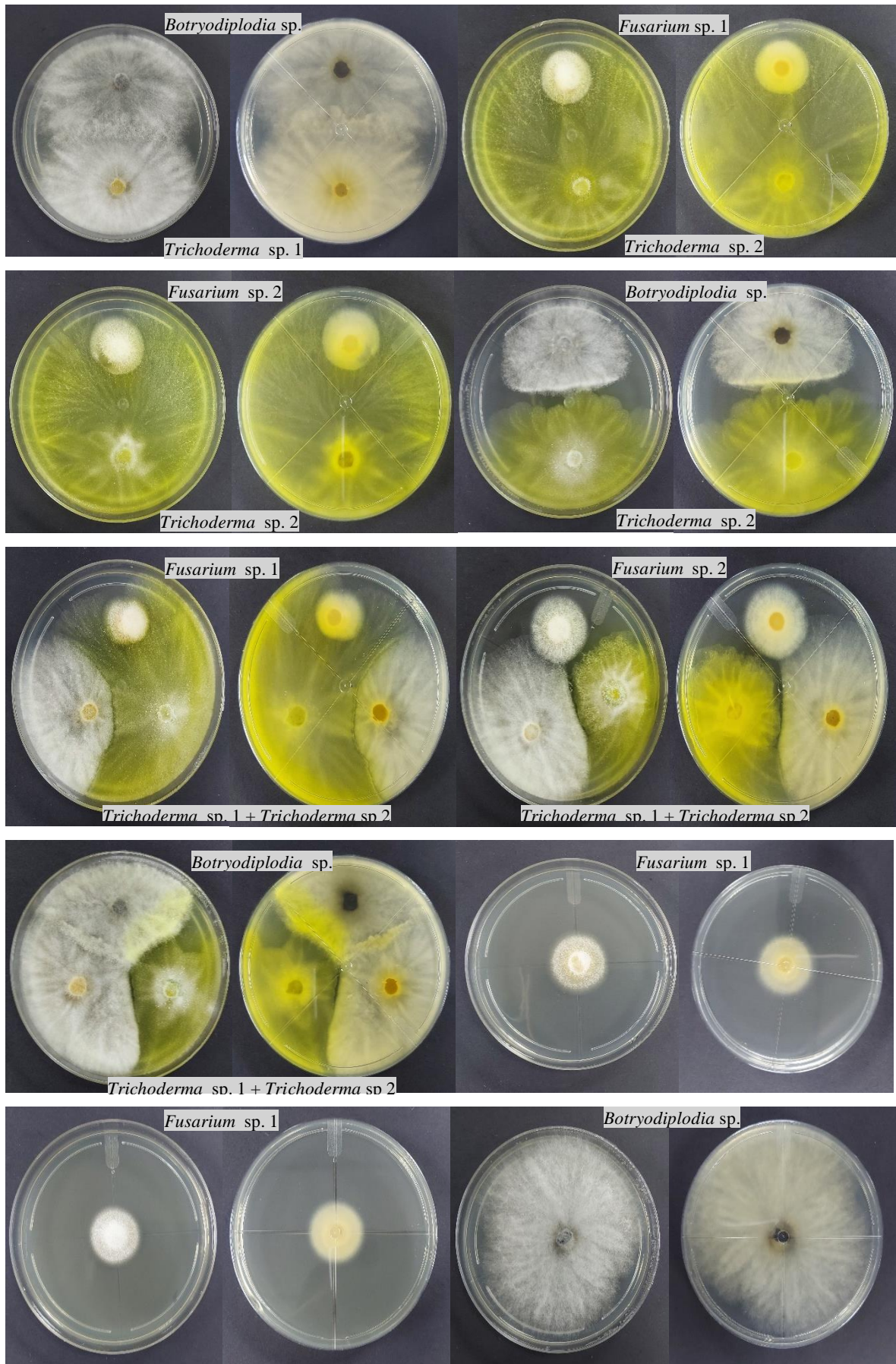
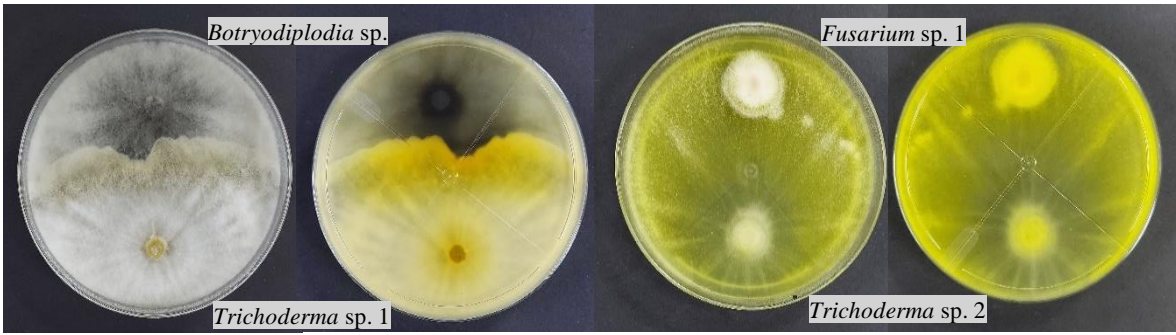


Figura 12. Evaluación antagonística a las 48 horas de incubación a 24 ± 2 °C



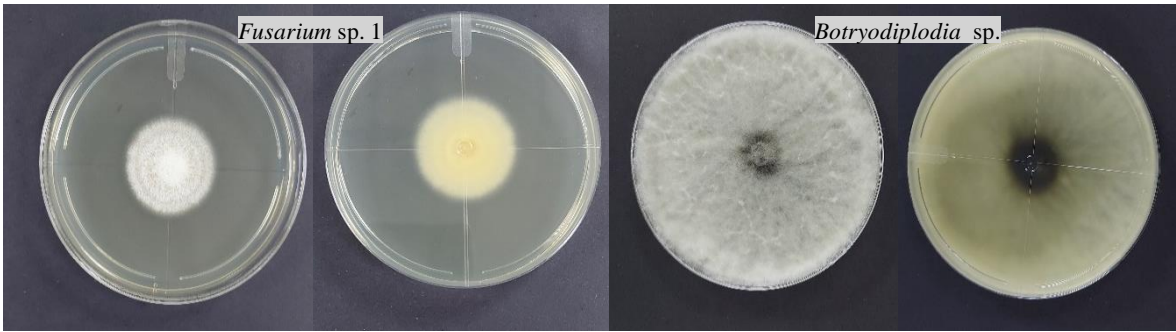
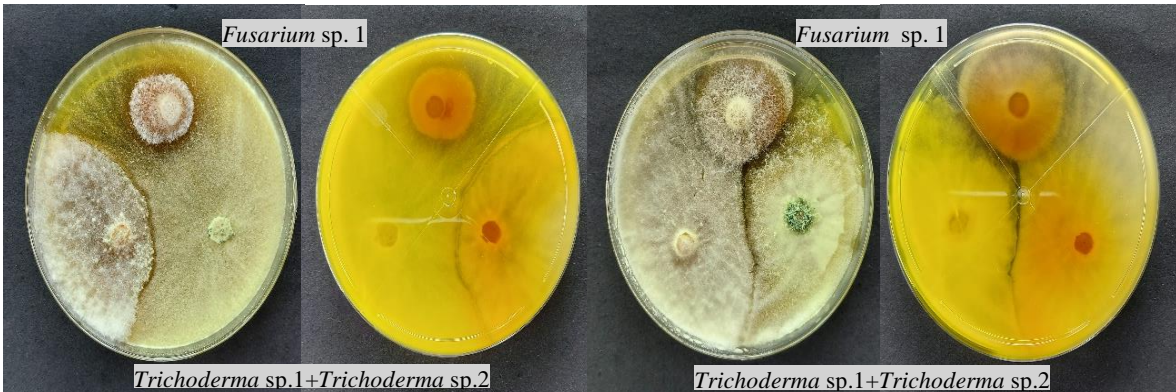
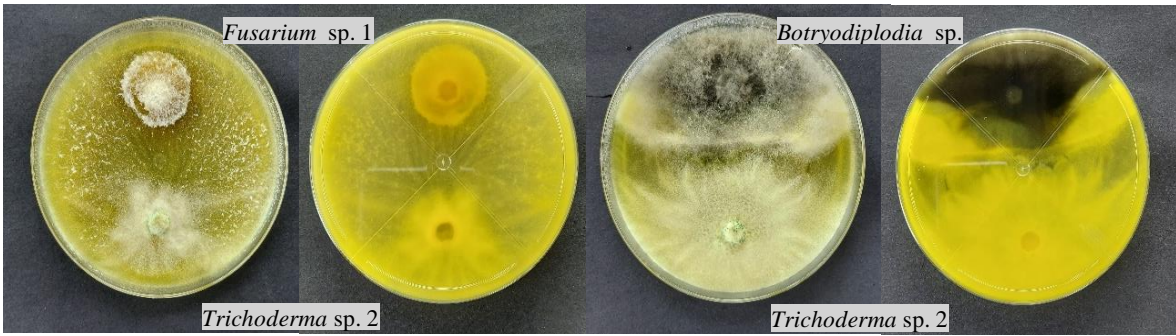
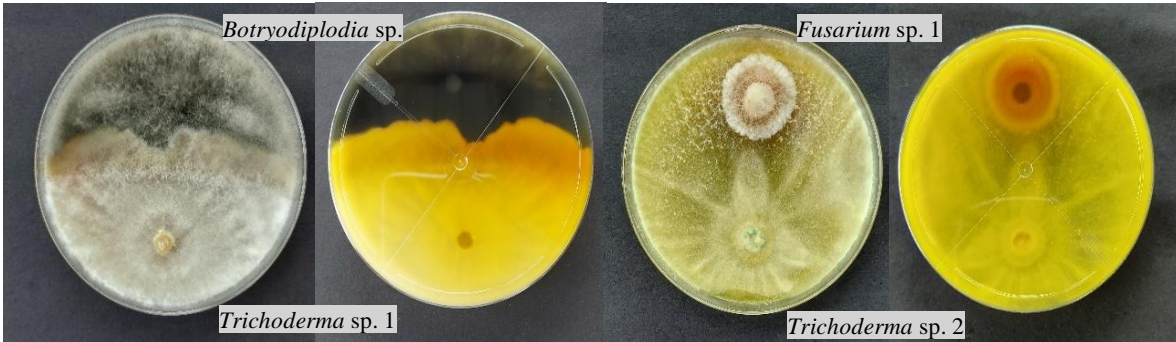


Figura 13. Evaluación antagonista a las 72 horas de incubación a 24 ± 2 °C.



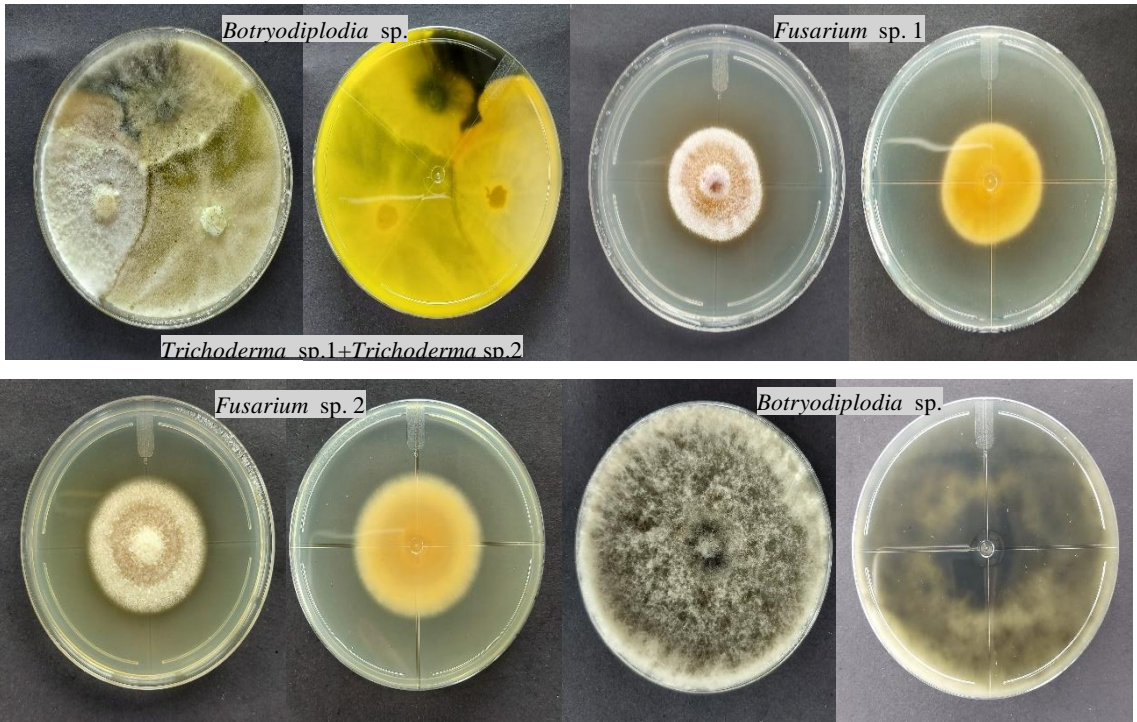
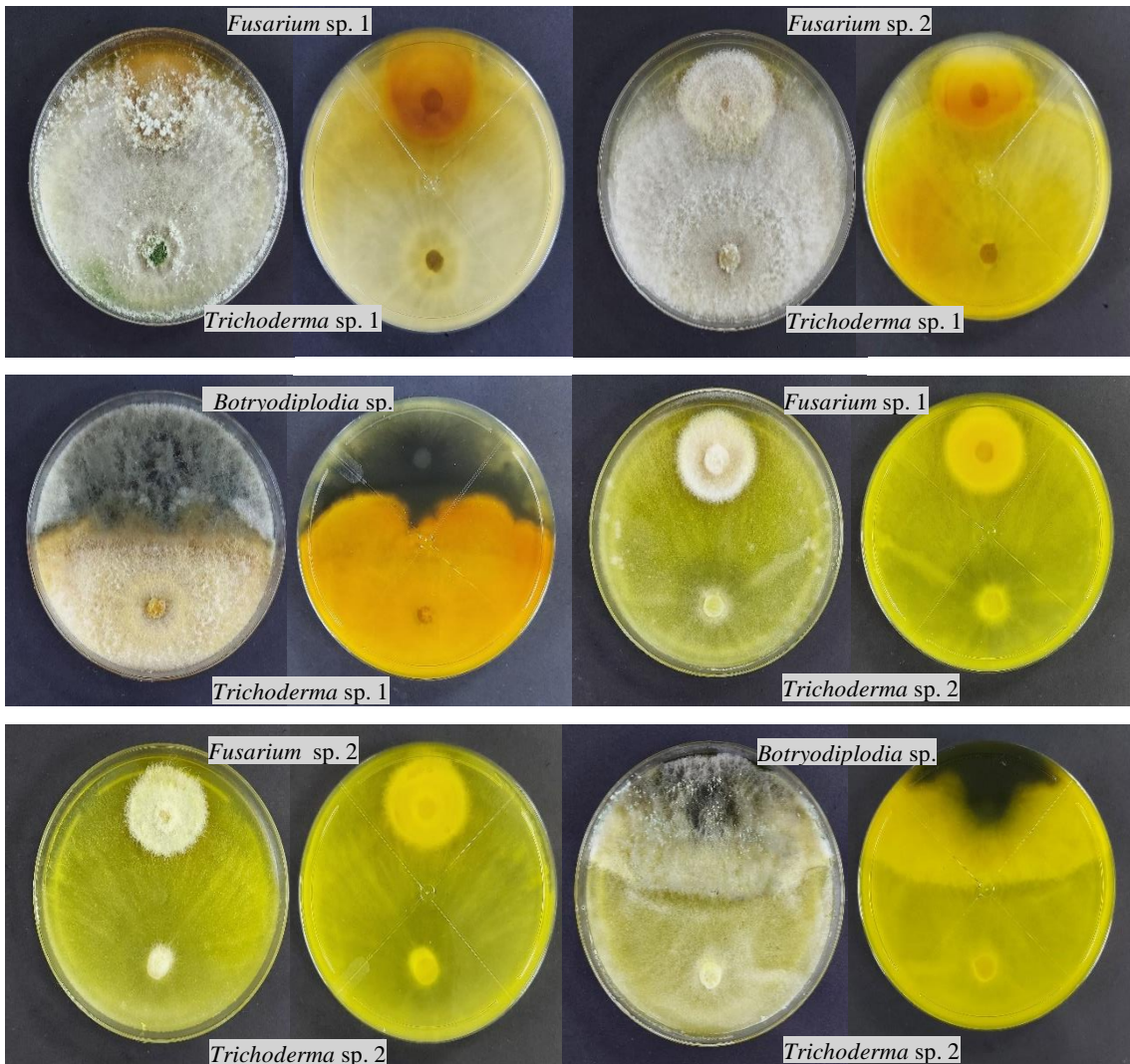


Figura 14. Evaluación antagonística a las 96 horas de incubación a 24 ± 2 °C.



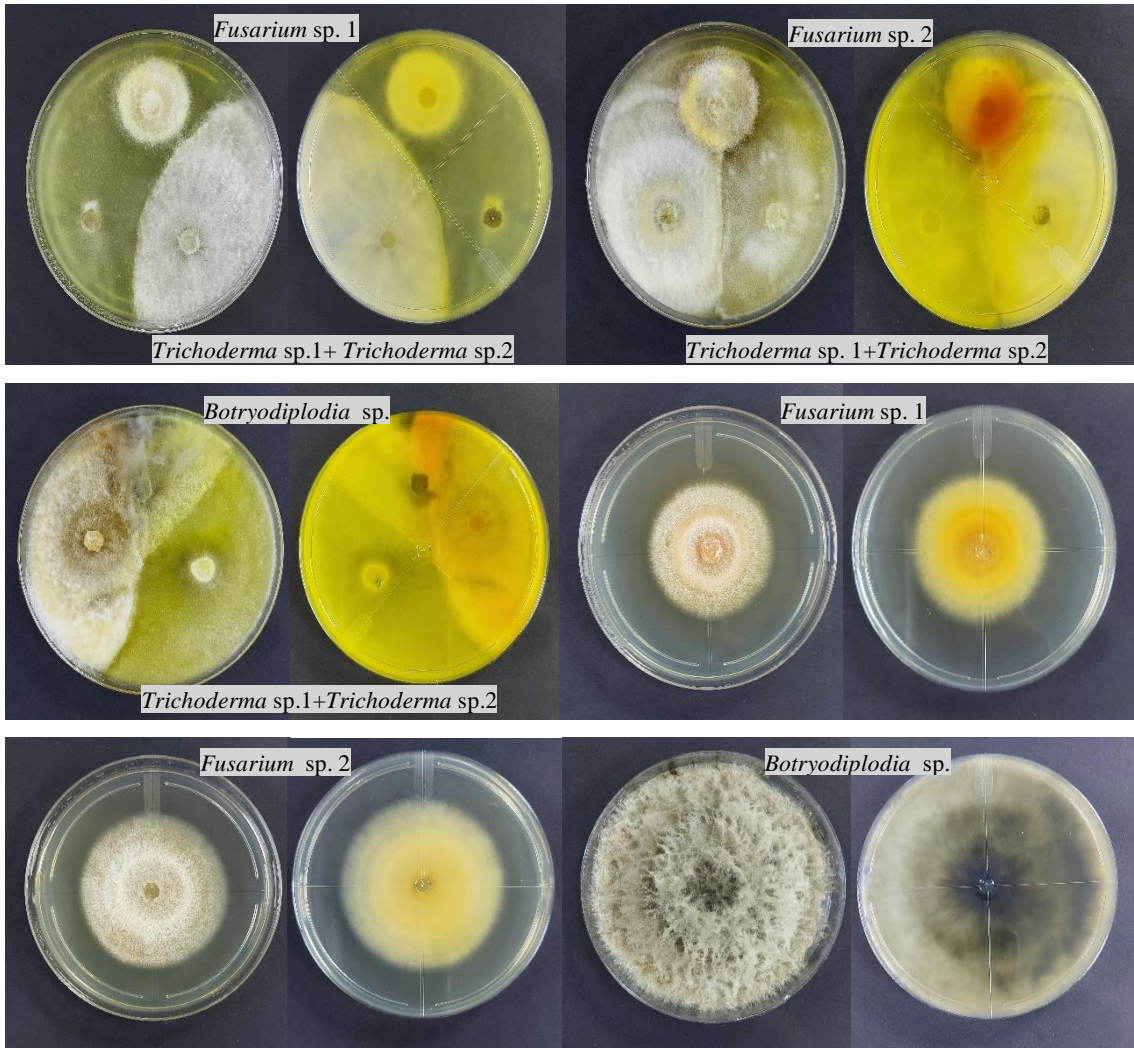
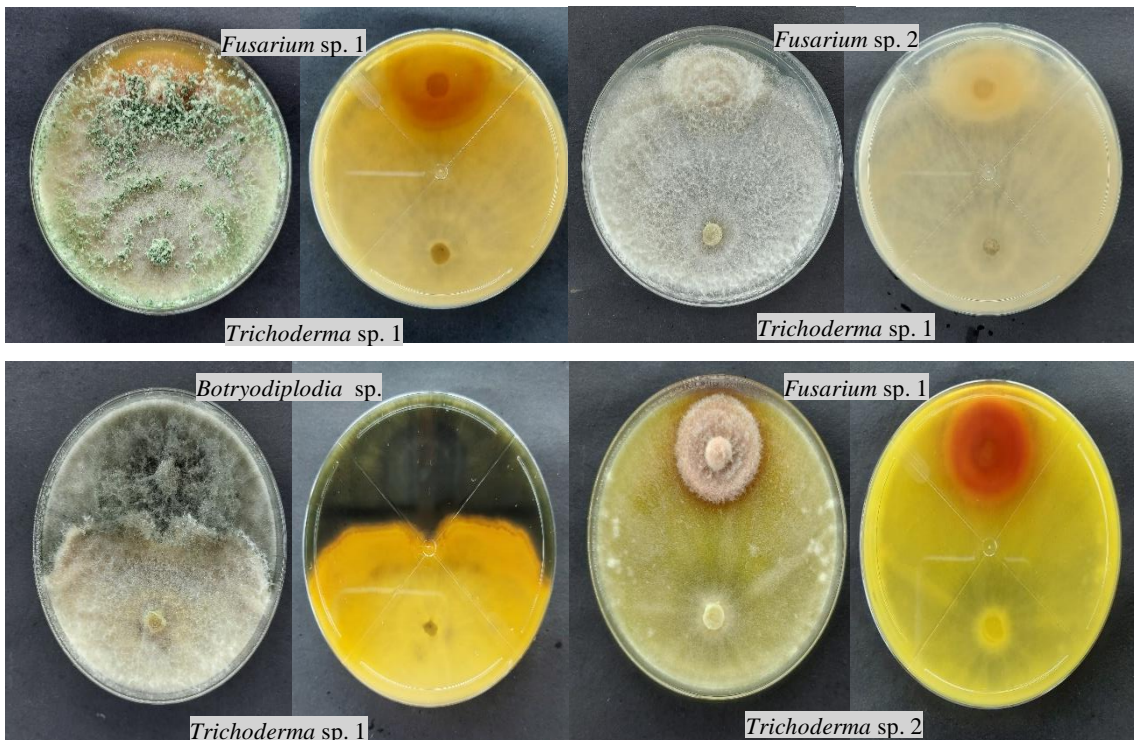


Figura 15. Evaluación antagonística a las 144 horas de incubación a 24 ± 2 °C.



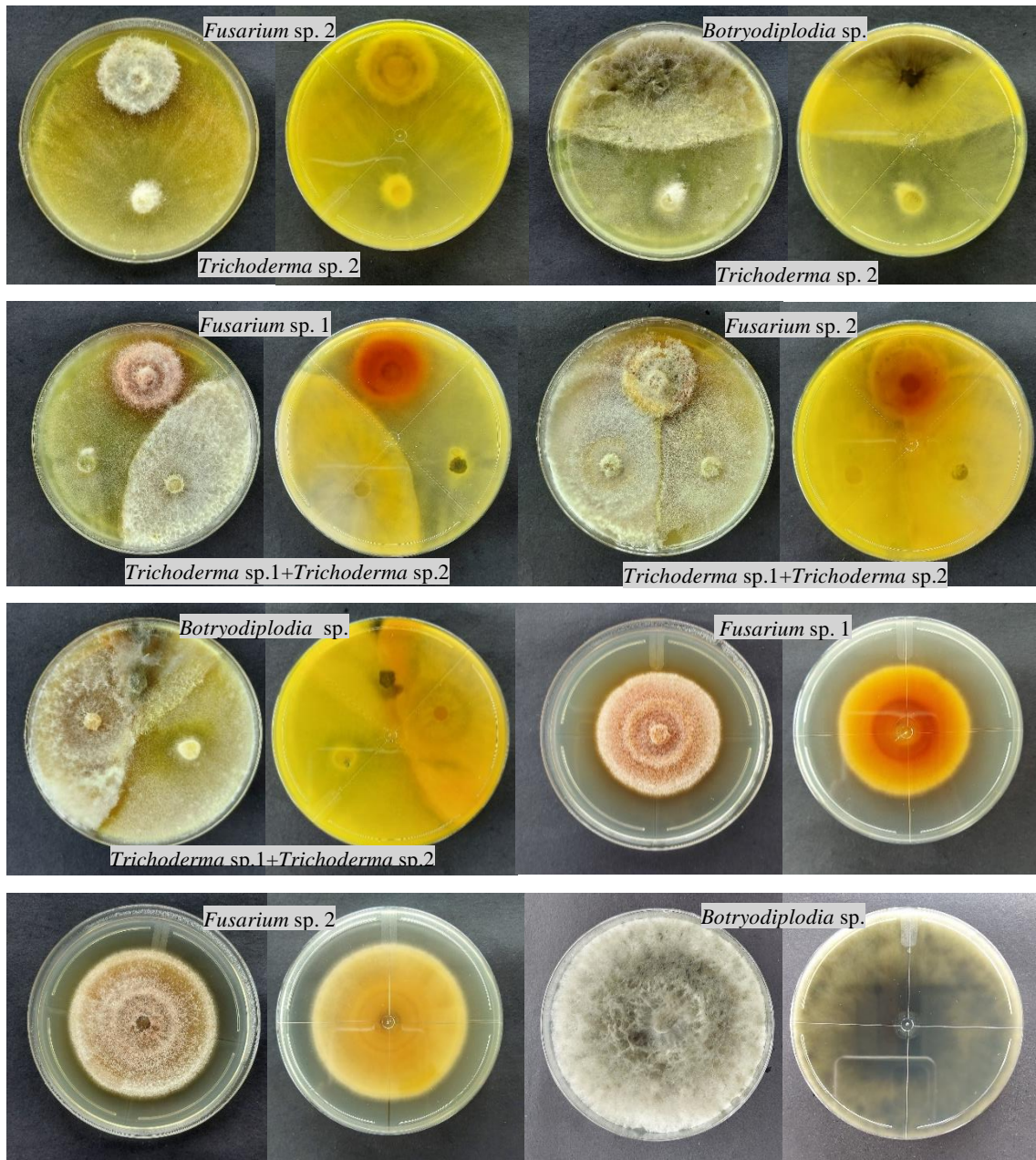
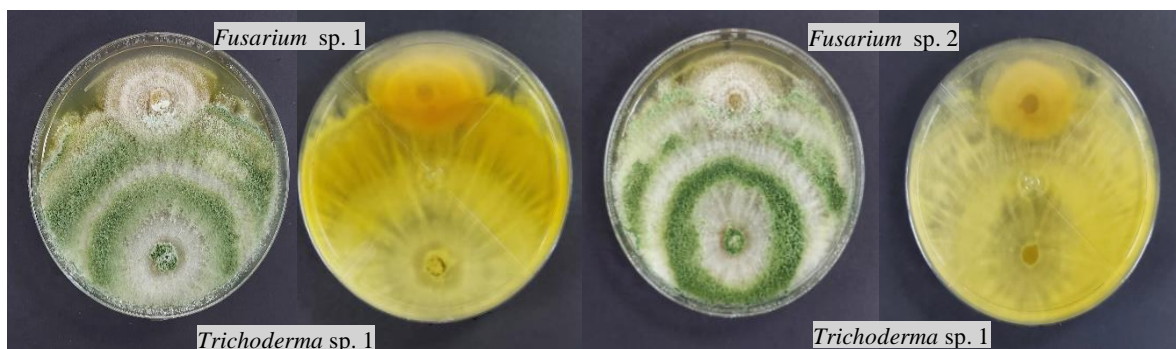


Figura 16. Evaluación antagonica a las 168 horas de incubación a 24 ± 2 °C.

Anexo 6. Evaluación antagonica a temperatura de 30 ± 2 °C según sus tratamientos y control.



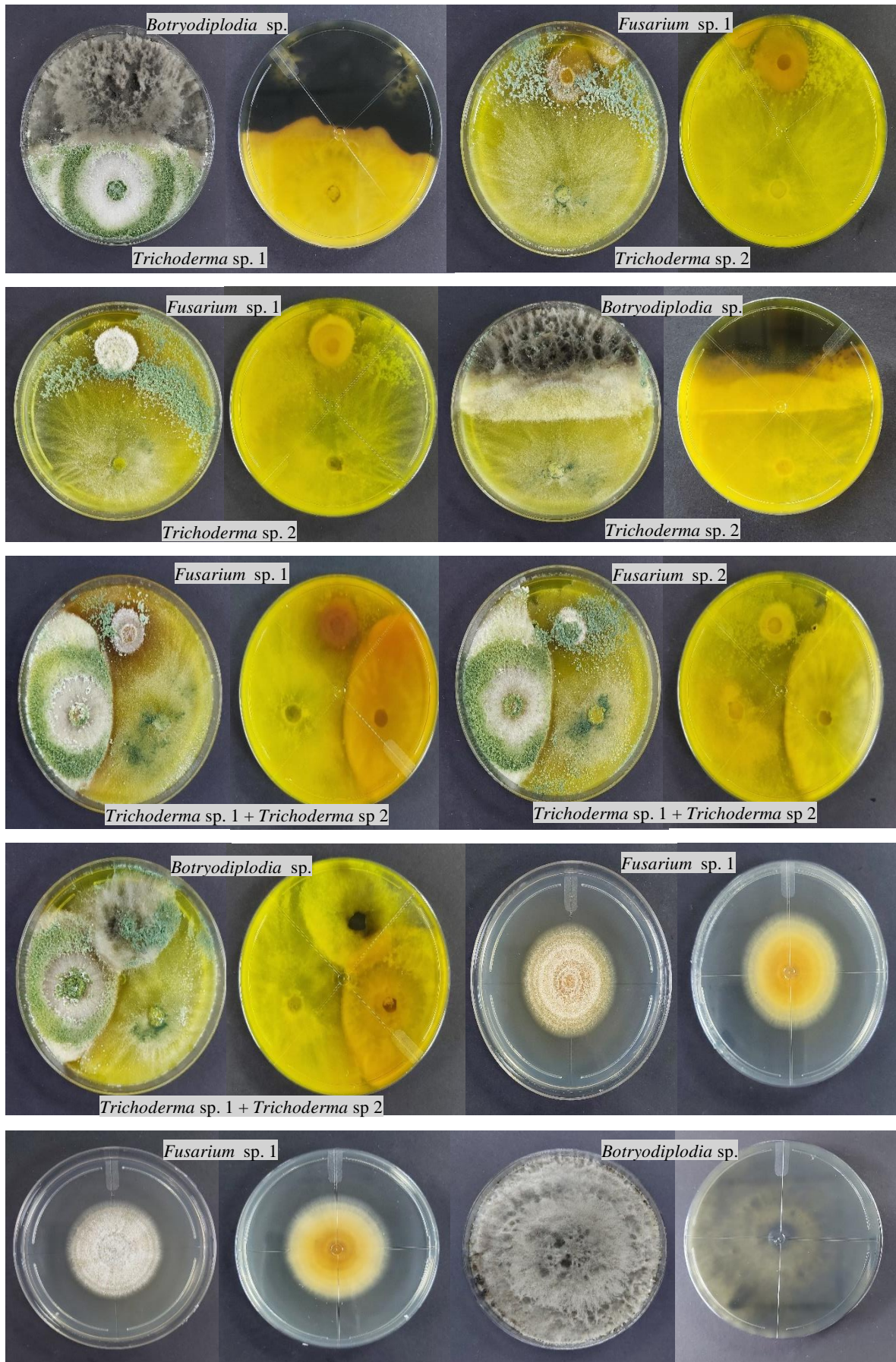


Figura 17. Evaluación antagonística a las 144 horas de incubación a 30 ± 2 °C.

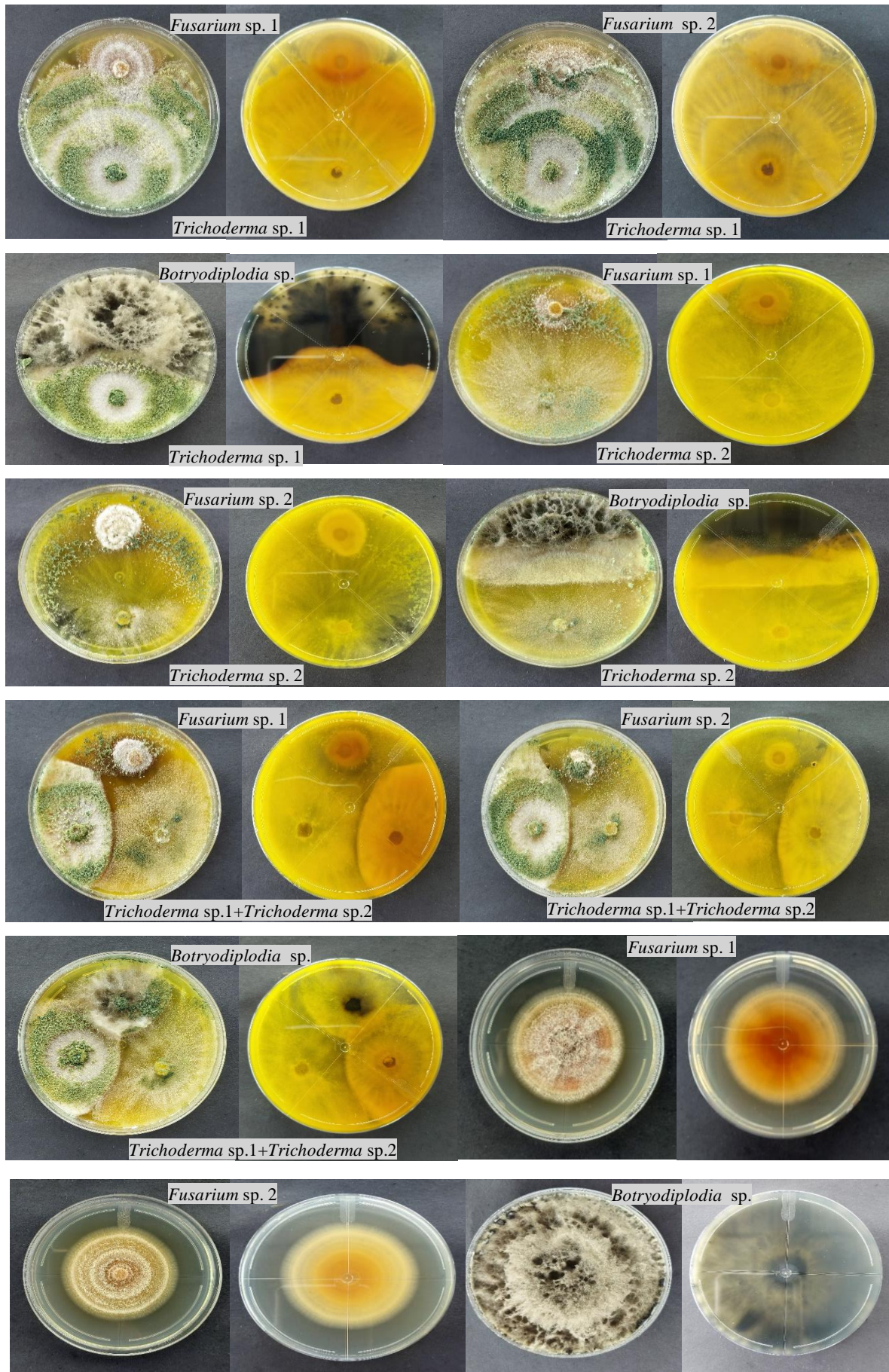


Figura 18. Evaluación antagonista a las 168 horas de incubación a 30 ± 2 °C.