



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

FACULTAD AGROPECUARIA Y DE RECURSOS  
NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**TESIS DE GRADO:**

PROSPECCIÓN Y SELECCIÓN DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp. Y  
*Pochonia* spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO  
AGALLADOR DE TOMATE EN CONDICIONES *IN VITRO* E INVERNADERO

TESIS DE GRADO PREVIO A LA  
OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERA AGRÓNOMO.

**AUTORA:**

Idalmis Romina León Ochoa

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Tulio Fernando Solano Castillo, Mg. Sc.

*Loja-Ecuador*

2019

## CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS



Universidad Nacional de Loja  
Dirección de Investigación  
Carrera de Ingeniería Agronómica

Proyecto "Generación de alternativas agroecológicas para el manejo de nematodos agalladores *Meloidogyne* spp en cultivo de tomate en la provincia de Loja"

Dr. Tulio Fernando Solano Castillo Mg.Sc.

PROFESOR TITULAR DE LA CARRERA DE INGENIERIA AGRONOMICA  
DIRECTOR DE TESIS

### CERTIFICO QUE:

Con el auspicio del proyecto de investigación institucional "Generación de alternativas agroecológicas para el manejo de nematodos agalladores *Meloidogyne* spp en la provincia de Loja", la Señorita Idalmis Romina León Ochoa, Egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica, Responsable del Proyecto de Tesis "PROSPECCIÓN Y SELECCIÓN DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp Y *Pochonia* spp PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO AGALLADOR DE TOMATE EN CONDICIONES IN VITRO E INVERNADERO", previamente aprobado por la Comisión de la Carrera de Ingeniería Agronómica con fecha 12 de enero del 2018, ha concluido todas las actividades previstas en sus fases de prospección, evaluación *in vitro*, evaluación en invernadero y desarrollo del documento de tesis.

Loja, 26 de febrero de 2019

Dr. Tulio Fernando Solano Castillo  
DIRECTOR DE TESIS

## CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

### APROBACION DEL TRIBUNAL DE GRADO

Una vez cumplida la reunión del Tribunal de calificación del trabajo Final de Tesis **PROSPECCIÓN Y SELECCIÓN DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp. Y *Pochonia* spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO AGALLADOR DE TOMATE EN CONDICIONES *IN VITRO* E INVERNADERO**, de la autoría de la Srta. Idalmis Romina León Ochoa, Egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica, se le propuso realizar algunas correcciones, mismas que ya han sido incluidas en el documento final.

En tal virtud nos permitimos certificar que el trabajo final consolidado de investigación está acorde a los requerimientos de la Carrera de Ingeniería Agronómica de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, por lo tanto, se autoriza continuar con los trámites correspondientes.

Loja, 15 de mayo de 2019.



Dr. Max Encalada Cordova  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



Ing. Javier Guayllas Mg. Sc.  
VOCAL DEL TRIBUNAL



Ing. Klever Chamba  
VOCAL DEL TRIBUNAL

## AUTORÍA

Yo, Idalmis Romina León Ochoa, declaro ser autora del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de los posibles reclamos o acciones legales, por el contenido de la misma.

Adicionalmente acepto y autorizo a la Universidad Nacional de Loja, la publicación de mi tesis en el Repositorio Institucional-Biblioteca Virtual.

Autor: Idalmis Romina León Ochoa

Firma: .....



Cédula de identidad: 1950006427

Fecha: 17 de mayo de 2019

## CARTA DE AUTORIZACIÓN

### CARTA DE AUTORIZACION DE TESIS POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA CONSULTA, REPRODUCCION PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACION ELECTRÓNICA DEL TEXTO COMPLETO

Yo Idalmis Romina León Ochoa declaro ser autora del presente trabajo de tesis titulado "**PROSPECCIÓN Y SELECCIÓN DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp. Y *Pochonia* spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO AGALLADOR DE TOMATE EN CONDICIONES *IN VITRO* E INVERNADERO**", como requisito para optar al grado de: INGENIERA AGRÓNOMO, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que, con fines académicos, muestre al mundo la reproducción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional

Los usuarios pueden consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las Redes de Información del país y del exterior, con las cuales tenga convenio la Universidad.

La Universidad Nacional de Loja, no se responsabiliza por el plagio o copia de las tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los diecisiete días del mes de mayo del año dos mil diecinueve, firma la autora.

Firma:  .....

Autora: Idalmis Romina León Ochoa

Cédula: 1950006427

Dirección: Ciudad Victoria

Correo: irleono@unl.edu.ec

Teléfono: 0979444968

### DATOS COMPLEMENTARIOS

Director de Tesis: DR. Tulio Solano Castillo Mg.Sc

Tribunal de Grado:

**PRESIDENTE:** Dr. Max Encalada Córdova

**VOCAL:** Ing. Francisco Javier Guayllas, Mg.Sc

**VOCAL:** Dr. Klever Chamba Caillagua

## **AGRADECIMIENTO**

Gratitud a la Universidad Nacional de Loja a través de la Facultad Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Ingeniería Agronómica por haberme brindado la formación como profesional para el servicio del país. Mi agradecimiento a los miembros del Tribunal de Grado conformado por el Dr. Max Encalada Córdova, Ing. Javier Guayllas Mg. Sc, y Ing., Klever Chamba por su valioso tiempo encaminado a perfeccionar el trabajo de investigación.

Mi agradecimiento profundo al Dr. Ing. Tulio Solano Castillo Mg.Sc., en calidad de director de tesis, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo el proyecto de tesis en las instalaciones del Laboratorio de Sanidad Vegetal e invernadero de la Universidad, por el respaldo, apoyo, orientación, amplios conocimientos y experiencia contribuyendo así a culminar con éxito esta investigación.

A mi amiga y compañera de tesis Ingeniera Lucia Vínces, por su apoyo y colaboración brindado, lo cual nos llevó a la formación de una profunda amistad que ansío perdure en el tiempo. A mi compañero de Carrera Alex Pangay por su colaboración desinteresada en la ejecución de mi trabajo.

Así mismo a la Ingeniera Sandra Curimilma, Ingeniera Jeamel Ruiz, e Ingeniera María Paccha, Técnicas del Laboratorio de Sanidad Vegetal, por su apoyo incondicional durante la ejecución de mi tesis, quienes impartieron sus conocimientos, experiencias y consejos, para llevar a cabo de buena manera la finalización de mi tesis.

Expreso mi más sincero agradecimiento a los distinguidos catedráticos de la Carrera de Ingeniería Agronómica, por sus sabios conocimientos impartidos a lo largo de la carrera, para nuestra formación profesional y humana.

## DEDICATORIA

*A la mujer de mi vida  
Mamá el mundo es mejor si puedo recurrir a ti,  
todo lo alcanzado te lo debo  
y todos mis triunfos te serán dedicados.  
Tu valentía, amor y coraje,  
me enseñó a cómo manejarme en la vida  
y me diste la herramienta más importante  
mi educación*

*A mi amado padre  
quien me enseñó que  
las barreras no se superan imaginando  
sino afrontando con valentía los miedos  
para ser el propio artífice de mi felicidad*

*A mis hermanos  
Mayra, Euclides, Lavinia,  
Lucelia, Anaely y a mis sobrinos  
quienes me han brindado mis mejores alegrías.*

*Permítanme retribuir todo su apoyo  
con este nuevo comienzo*

*A Dios, por poner todo a mi favor,  
el da esfuerzo al cansado  
y multiplica las fuerzas  
al que no tiene ninguna.*

*Finalmente dedico estas líneas, a la mujer más fuerte que conozco, a quien veo diariamente  
frente al espejo.*

*“No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar el cielo” (M.B)*

## INDICE GENERAL

PORTADA.....	i
CERTIFICACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS.....	ii
CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO.....	iii
AUTORÍA.....	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
DEDICATORIA.....	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
RESUMEN.....	xvii
SUMMARY.....	xviii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1. EL CULTIVO DE TOMATE.....	3
2.2. EI NEMATODO AGALLADOR DE RAÍCES <i>Meloidogyne incognita</i> .....	5
2.2.1. Generalidades.....	5
2.2.2. Morfología de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	5
2.2.3. Ciclo biológico y parasitismo de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	6
2.2.4. Daños causados por <i>Meloidogyne incognita</i> .....	7
2.2.5. Distribución geográfica de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	7
2.3. MANEJO DE <i>Meloidogyne incognita</i> .....	8
2.4. CONTROL BIOLÓGICO DE <i>Meloidogyne incognita</i> .....	8
2.4.1. <i>Trichoderma</i> spp. como agente biocontrolador de nematodos.....	9
2.4.2. <i>Pochonia</i> spp., como agente biocontrolador de nematodos.....	14

2.5. AISLAMIENTOS DE HONGOS.....	19
2.5.1. Aislamiento de hongos a partir de mazas de huevo .....	19
2.5.2. Aislamiento de hongos nematófagos en muestras de suelo .....	20
2.6. PROPAGACIÓN DE HONGOS NEMATÓFAGOS.....	20
TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA .....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. Ubicación de los ensayos .....	26
3.2. Materiales .....	26
3.2.1. Materiales de laboratorio .....	26
3.2.2. Materiales de campo e insumos .....	26
3.3. Métodos .....	27
3.3.1. Metodología para el primer objetivo:.....	27
3.3.2. Metodología para el segundo objetivo: .....	32
4. RESULTADOS .....	35
4.1. Evaluación de aislados nativos de <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Pochonia</i> spp., por su parasitismo sobre <i>M. incognita</i> (Kofoid & White) en condiciones <i>in vitro</i> .....	35
4.1.1. Prospección, aislamiento e identificación de hongos nematófagos. ....	35
4.1.2. Evaluación de los aislados nematófagos en la fase <i>in vitro</i> .....	36
4.1.3. Caracterización morfológica (Macroscópica y Microscópica de los aislados con mayor capacidad parasítica .....	39
4.1.4. Caracterización morfológica de los aislados de <i>Trichoderma</i> .....	39
4.1.5. Caracterización morfológica de los aislados de <i>Pochonia</i> spp. ....	41

4.2. Evaluación de los aislados nematófagos por su acción parasítica sobre <i>M. incognita</i> en condiciones de invernadero .....	43
5. DISCUSIÓN .....	47
5.1. Evaluación de los aislados de hongos nematófagos <i>Trichoderma</i> spp. y <i>Pochonia</i> spp., en condiciones <i>in vitro</i> . .....	47
5.1.1. Prospección .....	47
5.1.2. Evaluación <i>in vitro</i> de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. ....	48
5.1.3. Evaluación <i>in vitro</i> de los aislados de <i>Pochonia</i> spp.....	49
5.1.4. Caracterización morfológica y determinación taxonómica .....	50
5.2. Selección de aislados nematófagos <i>Trichoderma</i> spp., y <i>Pochonia</i> spp., sobre <i>M. incognita</i> (Kofoid & White) en condiciones de invernadero .....	54
6. CONCLUSIONES .....	59
7. RECOMENDACIONES.....	60
8. BIBLIOGRAFÍA.....	61
9. ANEXOS.....	78

## INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos (aislados) de <i>Trichoderma</i> evaluados en bioensayo <i>in vitro</i> .....	30
Cuadro 2. Tratamientos (aislados) de <i>Pochonia</i> evaluados en bioensayo <i>in vitro</i> . ....	31
Cuadro 3. Tratamientos evaluados en el ensayo en fase semicontrolada (invernadero).....	34
Cuadro 4. Zonas de muestreo para la obtención de aislados fúngicos para control de <i>M. incognita</i> .....	35
Cuadro 5. Parasitismo por <i>Trichoderma</i> spp. en huevos de <i>M. incognita</i> , en condiciones <i>in vitro</i> .....	37
Cuadro 6. Parasitismo por <i>Pochonia</i> spp. en huevos de <i>M. incognita</i> , en condiciones <i>in vitro</i> .....	38
Cuadro 7. Evaluación de los aislados nematófagos sobre <i>M. incognita</i> en condiciones de invernadero.....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de Crecimiento del Tomate: a) Tomate de crecimiento determinado; b) Tomate de crecimiento indeterminado .....	3
Figura 2. Reconstrucción esquemática de una sección transversal de la cáscara de huevo de nematodos parásitos de plantas. ....	18
Figura 3. (A, B) Micrografía de microscopía electrónica de crio-barrido que muestra una apresorio (flechas) de <i>Pochonia chlamydosporia</i> en la superficie de los huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> 24 h después de la inoculación.....	18
Figura 4. Zonas de muestro de la provincia de Loja .....	27
Figura 5. Aislado LEML-Tvir, (C1) de <i>Trichoderma</i> spp. ....	39
Figura 6. Aislado EMZL-Tvir (C2) de <i>Trichoderma</i> spp. ....	39
Figura 7. Aislado OPL-Tvir (C3) de <i>Trichoderma</i> spp. ....	40
Figura 8. Aislado SCPLGL-Thz (C4) de <i>Trichoderma</i> spp.....	40
Figura 9. Aislamiento LEML-Pchclm (C1) de <i>Pochonia</i> spp. ....	41
Figura 10. Aislado TB2CI-Pchclm (C2) de <i>Pochonia</i> spp. ....	41
Figura 11. Aislamiento TB1CL-Pchctnla (C3) de <i>Pochonia</i> spp. ....	42
Figura 12. Aislamiento LTrML-Pchclm (C4) de <i>Pochonia</i> spp. ....	42
Figura 13. Selección de muestras .....	79
Figura 14. A) Parasitismo de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp., sobre huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	79
Figura 15. B) Parasitismo de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp., sobre juveniles J <sub>2</sub> de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	79
Figura 16. A) Parasitismo de los aislados de <i>Pochonia</i> spp., sobre huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	80

Figura 17. B) Parasitismo de los aislados de <i>Pochonia</i> spp., sobre juveniles J <sub>2</sub> de <i>Meloidogyne incognita</i> .....	80
Figura 18. A) Colocación de la masa de huevo y la dilución fúngica en siracusa. ....	80
Figura 19. B) Evaluación de la capacidad parasítica de los aislados. ....	80
Figura 20. A) Siembra de aislamientos.....	81
Figura 22. B) Secado de aislamientos fúngicos en arroz partido estéril .....	81
Figura 23. A) Esterilización de sustrato .....	81
Figura 24. B) Preparación de semillero .....	81
Figura 25. C) Preparación del inóculo de los aislados Biocontroladores.....	82
Figura 26. D) Preparación del inóculo del nemàtodo <i>Meloidogyne</i> .....	82
Figura 27. E) Proceso de tutoraje a las plantas de tomate .....	82
Figura 28. F) Inoculación de los aislados al sustrato de la plata .....	82
Figura 29. A) Evaluación de la variable peso de maza foliar.....	82
Figura 30. B) Evaluación del índice de agallamiento.....	82

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Escala de evaluación de índice de agallas para el nematodo agallador (Escala de Bridge y Page, 1980).....	78
Anexo 2. Prospección y, en los sectores productores de la provincia de Loja.	79
Anexo 3. Observación del parasitismo por parte de <i>Trichoderma</i> spp. ....	79
Anexo 5. Observación del parasitismo por parte de <i>Pochonia</i> spp. ....	80
Anexo 7. Montaje del bioensayo en condiciones <i>in vitro</i> .....	80
Anexo 9. Proceso de la masificación de los aislados .....	81
Anexo 11. Preparación de bioensayo en condiciones de invernadero. ....	81
Anexo 15. Evaluación de las variables del bioensayo en condiciones de invernadero.. ....	82
Anexo 16. Parasitismo de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> , por aislados nativos del hongo nematófago <i>Trichoderma</i> spp., en condiciones <i>in vitro</i> .....	83
Anexo 17. Parasitismo en J <sub>2</sub> de <i>Meloidogyne incognita</i> , por aislados nativos del hongo nematófago <i>Trichoderma</i> spp., en condiciones <i>in vitro</i> .....	84
Anexo 18. Parasitismo de huevos de <i>Meloidogyne incognita</i> , por aislados nativos del hongo nematófago <i>Pochonia</i> spp., en condiciones <i>in vitro</i> .....	85
Anexo 19. Parasitismo en J <sub>2</sub> de <i>Meloidogyne incognita</i> , por aislados nativos del hongo nematófago <i>Pochonia</i> spp., en condiciones <i>in vitro</i> .....	85
Anexo 20. Efecto de aislamientos, sobre la variable altura de planta en tomate, en invernadero .....	86
Anexo 21. Efecto de aislamientos, sobre la variable peso de área foliar en plantas de tomate, en invernadero. ....	87
Anexo 22. Efecto de los aislamientos, sobre la variable peso de raíz en plantas de tomate, en invernadero.....	88

Anexo 23. Efecto de aislamientos, sobre la variable índice de agallamiento en raíces en plantas de tomate, en invernadero. ....	89
Anexo 24. Efecto de aislamientos, sobre la variable población de raíces en 10 gr de raíces en plantas de tomate, en invernadero.. ....	90
Anexo 25. Efecto de aislamientos, sobre la variable población de nematodos en 100 c3 de suelo en plantas de tomate, en invernadero. ....	91
Anexo 26. Formulario de información de prospección en el campo .....	92

**PROSPECCIÓN Y SELECCIÓN DE AISLADOS DE *Trichoderma* spp. Y  
*Pochonia* spp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO  
AGALLADOR DE TOMATE EN CONDICIONES *IN VITRO* E INVERNADERO**

## RESUMEN

El nematodo formador de agallas (*Meloidogyne incognita*) constituyen una de las plagas más importantes que afectan el cultivo del tomate debido a las pérdidas provocadas anualmente. Con el objetivo de reducir los niveles de infestación de esta plaga en el cultivo de tomate y aportar con alternativas amigables con el ambiente, en el laboratorio de Sanidad Vegetal e invernadero del área agropecuaria pertenecientes a la Universidad Nacional de Loja, se desarrolló el presente trabajo de tesis, evaluándose el efecto parasítico de aislados nativos del género *Trichoderma* y del género *Pochonia* obtenidos a partir de muestras de suelo y raíces de plantas de tomate en zonas productoras de la provincia de Loja, los cuales fueron evaluados por su capacidad biocontroladora en huevos y juveniles J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*. En condiciones *in vitro*, se realizó el aislamiento y la evaluación parasítica de 11 aislados nematófagos del hongo *Trichoderma* spp. y 7 aislados del género *Pochonia* spp., en 3 concentraciones conidiales de 10<sup>7</sup>, 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>. La evaluación del bioensayo para *Trichoderma* spp, permitió seleccionar 4 aislados con un parasitismo en huevos de 70 a 88.8% y en larvas J<sub>2</sub> de 70% a 81.3%; mientras que el bioensayo para *Pochonia* spp., se seleccionaron 4 aislados con un parasitismo en huevos del 70% a 90.8% y 14,7 a 50.3 en juveniles J<sub>2</sub>. Los estudios de caracterización morfológica determinaron dos especies del género *Trichoderma* identificadas como *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* y dos especies del género *Pochonia* conocidas como *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* y *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. En condiciones de invernadero, se evaluaron los aislados de mayor efectividad parasítica en plantas cultivadas en macetas de polietileno, inoculadas con 3000 J<sub>2</sub> de *M. incognita* y esporas fúngicas de los aislados en 3 concentraciones conidiales de 10<sup>8</sup>, 10<sup>9</sup>, 10<sup>10</sup> en dos aplicaciones (2 días después el trasplante y 40 días después de la primera inoculación), que incidieron en la reducción del índice de agallamiento (Bridge y Page, 1980), reducción de poblaciones J<sub>2</sub> en suelo y raíces, así como en la expresión positiva de las variables agronómicas.

**Palabras clave:** *Trichoderma* spp., *Pochonia* spp., *Meloidogyne incognita*, biocontrol, tomate.

## SUMMARY

The gall-forming nematode (*Meloidogyne incognita*) is one of the most important pests that affect the tomato crop due to the losses caused annually. With the aim of reducing the levels of infestation of this pest in the tomato crop and provide environmentally friendly alternatives, in the laboratory of Plant Health and greenhouse of the agricultural area belonging to the National University of Loja, the present work was developed of thesis, evaluating the parasitic effect of native isolates of the genus *Trichoderma* and the genus *Pochonia* obtained from samples of soil and roots of tomato plants in producing areas of the province of Loja, which were evaluated for their biocontrol capacity in eggs and juveniles j2 of *Meloidogyne incognita*. Under in vitro conditions, the isolation and parasitic evaluation of 11 nematophagous isolates of the fungus *Trichoderma* spp. and 7 isolates of the genus *Pochonia* spp., in 3 conidial concentrations of 107, 108, 109. The evaluation of the bioassay for *Trichoderma* spp, allowed to select 4 isolates with a parasitism in eggs of 70 to 88.8% and in J2 larvae of 70% 81.3%; while the bioassay for *Pochonia* spp., 4 isolates were selected with parasitism in eggs from 70% to 90.8% and 14.7 to 50.3 in juveniles J2. The morphological characterization studies determined two *Trichoderma* species identified as *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* and two *Pochonia* species known as *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* and *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* Under greenhouse conditions, the most effective parasitic isolates were evaluated in plants grown in polyethylene pots, inoculated with 3000 J2 of *M. incognita* and fungal spores of the isolates in 3 conidial concentrations of 108, 109, 1010 in two applications (2 days after the transplant and 40 days after the first inoculation), which affected the reduction of the gill index (Bridge and Page, 1980), reduction of J2 populations in soil and roots, as well as in the positive expression of the agronomic variables .

**Key words:** *Trichoderma* spp., *Pochonia* spp., Nematode, *Meloidogyne incognita*, biocontrol, tomato.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de tomate presenta limitantes en su producción debido al ataque de una gran diversidad de agentes nocivos entre estos, virus, bacterias, hongos, insectos y nematodos (CAB International, 2007). Una de las plagas que más daño causa al cultivo es el nematodo nodulador *Meloidogyne* spp., infesta más de 3000 especies de plantas ornamentales, frutales, cereales y hortícolas como el cultivo de tomate (Abad *et al.*, 2003), deteriora sus raíces, formando agallas o tumores que afectan a los haces vasculares de la planta, impidiéndole la absorción de nutrientes y agua del suelo, ocasionando pérdidas económicas en los cultivos (Argerich y Troilo, 2011).

En Ecuador, este complejo de plagas y enfermedades en el tomate produce una reducción en la producción de hasta el 47 % y en el caso concreto de los nematodos agalladores se han registrado pérdidas de hasta el 40 % en zonas productoras de tomate en la región litoral y valles interandinos. En la provincia de Loja los estudios de diagnóstico realizados por Solano (2014) sobre nematodos agalladores en 5 zonas productoras de tomate han determinado la presencia *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) con altos índices de agallamiento, en la escala de diez grados de Bridge y Page (1980), así como altas densidades poblacionales en suelos que van entre 2049 a 2746 J2 por 100 cm<sup>3</sup> de suelo y en raíces poblaciones entre 2010 a 2703 J2 en 10g de raíz.

Las estrategias de control más utilizadas desde el siglo pasado, se han basado en el uso de productos químicos como el bromuro de metilo y el carbofurán, con un significativo incremento en los costos de producción, contaminación del agua y suelos e incluso daños en la salud de las personas que lo utilizan, debido a su alto poder residual (200 días o más), estos químicos permanecen en el suelo varios meses después de la cosecha (Nyczepir y Thomas, 2009; Becker y Van Alfen, 2014; Rodríguez *et al.*, 2014). En los últimos 20 años se han propuesto varias alternativas al uso de los nematicidas, tales como semillas mejoradas, medidas culturales y el control biológico con hongos nematófagos (Delgado, 2010; Castro *et al.*, 2011)

El control biológico a través de antagonistas como algunas especies del género *Trichoderma* poseen buenas cualidades por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, lo que ha permitido su utilización en el manejo de enfermedades de plantas causadas por patógenos del suelo (Bernal *et al.*, 2000). De las investigaciones revisadas, en Ecuador, se deduce un limitado uso de las estrategias agronómicas y biológicas, en el manejo de nematodos fitoparásitos y particularmente la provincia de Loja, existen escasos reportes de investigaciones relacionadas con el control biológico utilizando aislados nativos de hongos con acción nematófaga de los géneros *Pochonia* y *Trichoderma* (Solano *et al.*, 2014; Castillo y Medina, 2014; Duarte, 2015; Solano *et al.*, 2017).

El presente trabajo investigativo se desarrolló bajo los siguientes objetivos:

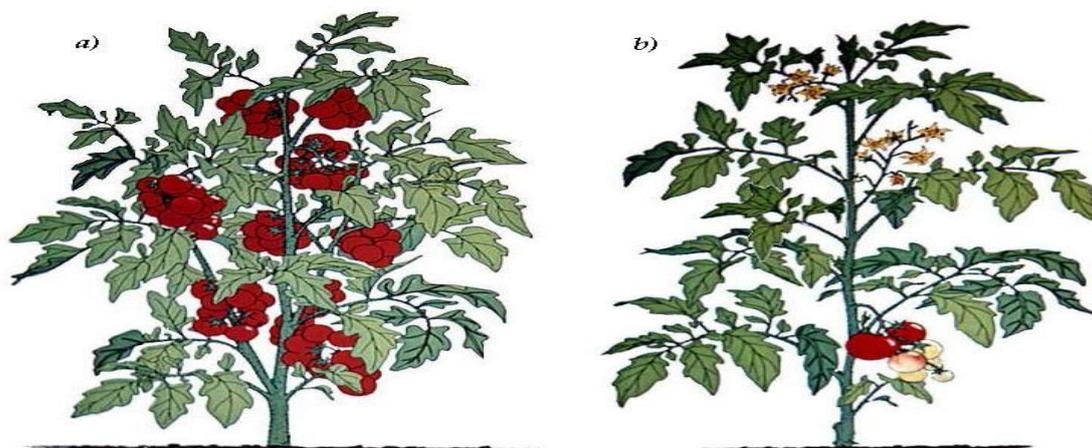
- ✓ Evaluar aislados nativos de los hongos nematófagos *Trichoderma* spp., y *Pochonia* spp., con altos niveles de parasitismo sobre *M. incognita* (Kofoid & White) en condiciones *in vitro*.
  
- ✓ Seleccionar aislados nativos de los hongos nematófagos *Trichoderma* spp., y *Pochonia* spp., con altos niveles de parasitismo sobre *M. incognita* (Kofoid & White) en condiciones de invernadero

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. EL CULTIVO DE TOMATE

El nombre científico del tomate *Lycopersicon esculentum*, Mill., se compone del genérico de origen griego *lykopersikon* que significa planta de olor desagradable; y su especie *esculentum* es un epíteto latino que significa comestible, haciendo referencia a los frutos de esta planta. Tiene su centro de origen en la región montañosa, estrecha, y alargada los Andes bajos entre en Perú, Ecuador, Chile y las islas Galápagos; las formas silvestres de “tomate cereza”, *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*, originarias de Perú, migraron a través del Ecuador, Colombia, Panamá y América Central hasta llegar a México, donde fue domesticado por el hombre; en la lengua nahua de México era llamado *tomatl*, que sin lugar a dudas dio origen a su nombre actual (Jones *et al.* 2001; Jaramillo *et al.* 2007; Bergougnoux, 2014)

El tomate es una planta perenne de porte arbustivo que se cultiva como anual, puede desarrollarse de forma rastrera, semierecta o erecta, y su crecimiento es limitado en las variedades determinadas e ilimitadas en las indeterminadas (Jaramillo *et al.* 2007). Existen dos tipos de cultivares de tipo determinado y de tipo indeterminado, los determinados producen una inflorescencia junto con cada hoja o cada dos hojas, suelen ser más precoces y de porte bajo, terminando el tallo en un racimo floral. Los de tipo indeterminado presentan inflorescencias más espaciadas. El tallo termina en una yema vegetativa, lo cual determina que la planta continúe creciendo de manera indefinida (Jaramillo *et al.*, 2007)



**Figura 1.** Tipos de Crecimiento del Tomate: a) Tomate de crecimiento determinado; b) Tomate de crecimiento indeterminado (Jaramillo *et al.*,2007)

La producción mundial de tomate fresco *Lycopersicon esculentum*, Mill., en los últimos años experimentó un crecimiento continuo, al elevarse de 76,3 millones de toneladas en 1990 a 163,9 millones de toneladas en 2013, es decir, un incremento promedio anual del 3,4%. (FAO, 2014).

Según el MAG (2016) la producción mundial de tomate riñón en el año 2016 se incrementó en 0.16% con respecto al año 2015; dicha tasa refleja una aceleración constante en el crecimiento de la producción mundial. Este comportamiento incidió directamente en el nivel de exportaciones internacionales, las cuales aumentaron 4%. El incremento de la oferta influyó en la disminución de los precios mundiales (23%) con respecto al año anterior.

Contrario a lo que ocurre con la producción mundial de tomate riñón en el año 2016 la producción nacional decreció respecto al año 2015, pasando de 62,989 a 51,190 toneladas. Dicha disminución se debió a la variación negativa, con respecto al mismo periodo de la superficie cosechada. La disminución de la producción no influyó en las exportaciones nacionales; ya que, subieron en 700% con respecto al 2015. Al igual que en años anteriores, no se reportaron importaciones de tomate fresco; lo que se puede catalogar al Ecuador como un país autosuficiente en la producción de tomate riñón. (MAG, 2016)

El precio Internacional promedio del tomate riñón en los puertos de embarque de estados unidos del año 2016, disminuyó 23% con respecto al año 2015, ubicándose en 13,72 dólares el precio del cartón de 25 libras. En el año 2011 el precio del tomate alcanzó el mayor precio de todo el periodo analizado, llegando a 18.43 USD/cartón 25lb. La disminución del precio del año 2016 frente al de 2015 se debe al crecimiento de la oferta de los principales productores de tomate riñón. (MAG, 2016)

El tomate es un alimento que forma parte de la canasta básica, siendo altamente vulnerable a fluctuaciones de precios. El consumo per cápita de tomate de mesa en el Ecuador es de 5 kg por persona en el año 2013 y se espera que aumente debido a las nuevas tendencias de alimentación, esta cifra es baja comparada con otros países sudamericanos; sin embargo, la industria agroalimentaria necesita de materia prima abundante y de alta calidad. (SINAGAP, 2013)

## **2.2. EI NEMATODO AGALLADOR DE RAÍCES *Meloidogyne incognita***

### **2.2.1. Generalidades**

El nematodo agallador de las raíces, constituyen una plaga de importancia económica en todo el mundo, especialmente en países tropicales y subtropicales, particularmente en las regiones de escasos recursos, en cultivos de exportación con limitaciones en el uso de nematicidas y las interacciones patogénicas asociadas a otros microorganismos. (Moens *et al.*, 2009)

A nivel mundial, las especies del género *Meloidogyne* provocan daños en plantaciones cultivadas tanto por los métodos tradicionales, como por las tecnologías modernas (cultivos protegidos, hidropónicos, invernaderos y organopónicos) con pérdidas de hasta 30%, debido a la susceptibilidad de los cultivares empleados, la intensidad del cultivo y los factores ambientales (Arias *et al.*, 2009); en vegetales cultivados en condiciones de campo en zonas tropicales, se han registrado pérdidas de 17-20 % en berenjena *Solanum melongena* L., 18-33 % en melón *Cucumis melo* L., y de 24-33 % en tomate *Lycopersicon esculentum*, Mill. (Arévalo, 2012)

Según Hunt y Handoo (2009), las especies importantes por los daños económicos que provocan en diversas regiones del mundo son: *M. incognita*, *M. javanica* (Treub) Chitwood, *M. arenaria* (Neal) Chitwood y *M. hapla* Chitwood, las dos primeras son comunes en climas tropicales, *M. arenaria* es frecuente en climas subtropicales y *M. hapla* en regiones templadas, aunque también puede encontrarse en las regiones tropicales altas (Karssen y Moens, 2006). En Ecuador se encuentran presentes las cuatro especies del género *Meloidogyne* spp., (*M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* y *M. hapla*). La especie más abundante con un 80% de incidencia es *M. incognita*, seguido de *M. javanica* (Revelo, *et al.*, 2007; Triviño, 2010), la cual también fue identificada como especie predominante en estudios taxonómicos realizados en zonas productoras de la provincia de Loja. (Solano, 2014)

### **2.2.2. Morfología de *Meloidogyne incognita***

Agrios (2010) menciona que los machos de *Meloidogyne incognita*., son vermiformes y miden aproximadamente de 1,2 a 1,5 mm de largo por 0.30 a 0.36 mm de diámetro. Las hembras tienen forma de pera y un tamaño aproximado de

0,40 a 1,30 mm de largo por un ancho de 0,27 a 0,75 mm, cada hembra deposita aproximadamente 500 huevecillos en una sustancia gelatinosa que ella misma produce. Kenneth (2008) señala que las hembras son de color blanco, con cuellos alargados y delgados, estiletes bien desarrollados, perillas basales y los machos son delgados, semejantes a gusanos.

### **2.2.3. Ciclo biológico y parasitismo de *Meloidogyne incognita***

El ciclo biológico de estos nematodos comienza en la fase de huevos, depositados por la hembra en una matriz gelatinosa compuesta por glicoproteínas, secretadas por glándulas rectales de la hembra; las masas de huevos se ubican en la superficie de las agallas pudiendo estar entre los tejidos y tiene propiedades antimicrobiales; la primera etapa larvaria ( $J_1$ ) se desarrolla en el huevecillo, sufre la primera muda y en la segunda etapa larvaria ( $J_2$ ) emerge del huevecillo. (Moens *et al.*, 2009)

El segundo estadio juvenil ( $J_2$ ) es la fase infectiva, si está dentro de los tejidos, puede penetrar en los tejidos circundantes de la raíz o, por el contrario, migran al suelo en busca del hospedante, atraídos por emanaciones de  $CO_2$  y aminoácidos provenientes de la zona de elongación de las raíces, captadas por órganos sensoriales denominados anfidas (Karssen y Moens, 2006). La migración del  $J_2$  sigue un patrón de movimientos continuos de la cabeza conjugados con periodos de introducción del estilete e inyección de enzimas durante todas las fases del parasitismo, se mueve intercelularmente por el cilindro vascular hasta formar células gigantes o puntos de alimentación permanente que los tejidos forman en respuesta a las secreciones que el nematodo inyecta. (Gheysen y Jones, 2006; Caillaud *et al.*, 2008; Marín, 2012)

Los juveniles, una vez inmovilizados, pasan por una segunda, tercera y cuarta muda hasta alcanzar la fase adulta y madurez sexual en la cual se distingue como macho o hembra; durante la última muda los machos cambian su forma y abandonan la raíz; las hembras engrosan su cuerpo y provocan ruptura de tejidos quedando conectadas con su estilete al sitio de alimentación. (Karssen y Moens, 2006)

#### **2.2.4. Daños causados por *Meloidogyne incognita***

El principal síntoma son las agallas en las raíces, formadas por el conjunto de células gigantes como consecuencia de una hipertrofia e hiperplasia celular, al formarse las células gigantes, los vasos de la xilema se bloquean e inducen la multiplicación de nuevas células corticales aumentadas en tamaño y número, produciéndose la agalla. El tamaño de la agalla está relacionado con la planta hospedante, número de juveniles J<sub>2</sub> y la especie (Karssen y Moens, 2006). Una vez establecidos en el sitio de alimentación, los nematodos quedan atrapados en el interior de las agallas. (Gheysen y Jones, 2006)

Los daños radiculares afectan la absorción de agua y nutrientes con el consiguiente debilitamiento de la planta y disminución del rendimiento en la producción, lo cual se manifiesta con síntomas foliares como: clorosis, amarillamiento, enanismo, marchitez y muerte de la planta, los daños provocados por los nematodos agalladores en el sistema radicular por lo general están asociados con otros agentes patógenos como hongos y bacterias formando complejos fitopatológicos que aceleran los procesos de infección y pudrición de la raíz. (Agrios,2005; Moens *et al.*, 2009; Arias *et al.*, 2009; Becker y Van Alfen, 2014)

Varias escalas son usadas para evaluar el índice de agallamiento, basadas en el número de agallas, como la sugerida por el tamaño de las agallas y la apariencia del sistema radical, la escala cualicuantitativa de 10 grados propuesta por Bridge y Page (1980) la cual considera valores de 0 a 10: 0= raíces sanas, 1-4= agallas sobre raíces secundarias solamente, 5-10= agallas sobre raíces laterales (5, 50% de raíces con agallas y 10, máxima infección).

#### **2.2.5. Distribución geográfica de *Meloidogyne incognita***

Las especies del género *Meloidogyne* constituyen los nematodos patógenos de plantas de mayor importancia económica por su amplia distribución mundial y por el gran número de hospederos que atacan (Bridge y Starr, 2007). El nematodo agallador está distribuido en todo el mundo, aunque ocurre con mayor frecuencia en regiones con clima cálido. (Moens *et al.*, 2009)

### **2.3. MANEJO DE *Meloidogyne incognita***

De manera general, se reconocen cinco estrategias de manejo: legales, químicas, biológicas, físicas (solarización, vaporización, inundación) y culturales (rotación de cultivos, cultivos de cobertura, cultivos trampa, cultivares resistentes, biofumigación/desinfestación con materiales orgánicos, barbecho, inversión del prisma). La estrategia de control más utilizada por su acción inmediata es el uso de nematicidas químicos. (Delgado, 2010; Castro *et al.*, 2011; Nyczepir y Thomas, 2009; Mehta *et al.*, 2014)

### **2.4. CONTROL BIOLÓGICO DE *Meloidogyne incognita***

Una de las estrategias alternativas al uso de los nematicidas en los últimos años, es el control biológico, mediante el uso de microorganismos tales como bacterias, virus, nematodos saprobióticos y especialmente hongos nematófagos identificados como agentes de control biológico (ACB) por su capacidad de reducir poblaciones de fitonematodos a niveles mínimos de forma natural (Timper, 2011; Singh *et al.*, 2013; Mukhtar *et al.*, 2013; López *et al.*, 2014). *Trichoderma* spp. y *Pochonia chlamydosporia* son un enemigo importante de nematodos en suelos supresores, De ahí su uso potencial para controlar plaga, como estrategias de biogestión para el control los nematodos se deben incorporar al suelo estos hongos partiendo de una profunda comprensión de la biología del hongo, y la cuidadosa selección y combinación del biotipo aislado del hongo con cultivares seleccionados de plantas hospederas que son menos susceptibles o resistentes al nematodo y soportan un crecimiento extenso. (López *et al.*, 2014)

Los hongos que podrían soportar el crecimiento en la rizosfera y/o un comportamiento endofítico deberán ser considerados, desde la perspectiva ecológica por su interacción con el microbiota residente (por ejemplo, la competencia, la depredación y el parasitismo de otros macroorganismos), incluidos los patógenos no diana\*, y otros posibles agentes de control biológico, así como su respuesta a pesticidas químicos o no químicos. Se necesita más información sobre las capacidades multitróficas del hongo, incluido el efecto o la función que los aislamientos de suelo pueden tener sobre la sostenibilidad de los agroecosistemas.

\*Patógeno no diana: patógeno que no es objeto de estudio.

También hay una necesidad de desarrollar la capacidad de infraestructura para seguir el establecimiento, la dinámica y si es posible, la epidemiología del hongo en el suelo y la rizosfera. (López *et al.*, 2014)

#### **2.4.1. *Trichoderma* spp. como agente biocontrolador de nematodos**

##### **2.4.1.1. Características generales de *Trichoderma* spp.**

Las diferentes especies del género *Trichoderma* spp., se caracterizan por ser hongos saprófitos, sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, siendo capaces de descomponerla, bajo ciertas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Samuels, 2010). *Trichoderma* tiene la capacidad de producir diversos metabolitos siendo capaz de adaptarse a diversas condiciones ambientales y sustratos, convirtiéndolo en uno de los agentes fúngicos útiles en la industria biotecnológica. La capacidad de *Trichoderma* depende de la especificidad de la especie, de la cepa y de sus modos de acción; existen aislados más eficientes para el control de un patógeno que de otro; por tal motivo, evaluar la especificidad cobra gran importancia. (Martínez y Reyes, 2008)

El género *Trichoderma* es uno de los hongos que se encuentra comúnmente en suelos de diferentes clases texturales y contenidos mínimos de materia orgánica, aportando de manera natural a los rendimientos agrícolas, por su gran capacidad para producir diferentes tipos de enzimas que estimulan las respuestas de defensa de las plantas, la tolerancia al estrés biótico y abiótico y promueve el crecimiento vegetal. (Singh *et al.*, 2014)

##### **2.4.1.2. Taxonomía del género *Trichoderma* spp.**

Los estudios taxonómicos de este género se inician con Persoon (1794), quien describió el género *Trichoderma* por primera vez, y aún se continúa trabajando en esta descripción. El género *Trichoderma* se ubica en la clase Hyphomycetes, orden Moniliales, familia: Moniliaceae. su fase sexual (estado Teleomorfo) se

encuentra ubicado en la clase Ascomycetes, serie Pyrenomycetes, orden Hypocreales, género *Hypocrea* (Druzhinina & Kubicek, 2005; Samuels *et al.*, 2006, 2010). Las especies del género *Trichoderma* son un grupo de derivados clonales del género *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual.

Según Samuels (2006), "*Trichoderma* spp. se clasifica como un hongo anamórfico. El estado teleomorfo se ha detectado en pocas especies". En este sentido se han identificado: *Hypocrea lixii* Chaverri como el estado teleomorfo de *Trichoderma harzianum* Rifai, *Hypocrea atroviridis* Dodd como el teleomorfo de *Trichoderma atroviride* P.karst e *Hypocrea virens* Kullnig Gradinger como el teleomorfo de *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) (Hjeljord y Tronsmo, 1998; Chaverri *et al.*, 2003; Dodd *et al.*, 2003). Las especies antes mencionadas se utilizan ampliamente como agentes de control biológico. (Monte, 2001)

#### **2.4.1.3. Características morfológicas de *Trichoderma* spp.**

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa (Samuels, 2010). El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal, estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas (Samuels, 2006, 2010). "Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos" (Harman, 2003). Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio. Gran parte de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo. (Samuels, 2006)

#### **2.4.1.4. Mecanismos de acción de *Trichoderma* spp.**

El género *Trichoderma* posee diferentes modos de acción, entre estos se encuentran: antibiosis, competencia (por espacio y nutrientes), micoparasitismo, desactivación de enzimas de los patógenos y otros (Harman,2000). Por su parte, Harman (2006) informa nuevos mecanismos con los que *Trichoderma* ejerce su acción como antagonista y colonizador de las raíces, estos son: aceleración del desarrollo del sistema radicular que posibilita la tolerancia al estrés por parte de la planta, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos, estimulación del crecimiento vegetal, inducción de resistencia.

##### **a) Antibiosis**

Los metabolitos con actividad antifúngica secretados por *Trichoderma* constituyen un grupo de compuestos volátiles y no volátiles, muy diverso en cuanto a estructura y función. Muchas cepas de *Trichoderma* producen estos metabolitos secundarios, algunos de los cuales inhiben otros microorganismos, con los que no se establece contacto físico y estas sustancias inhibitorias fueron consideradas antibióticos (Hjeljord y Tronsmo, 1998). “Se identificaron compuestos del tipo de las alquil-pironas (6-a-pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina, atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichozianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina)” (Howell,2003). Recientemente, Vinale *et al.* (2006), caracterizaron un grupo de metabolitos secundarios (azapilona, butenolide, 6-pentil-á-pirona, 1-hidroxi-3-metil-antraquinona, 1,8-dihidroxi-3-metil-antraquinona, koniginina, ácido heptelídico, trichoviridina, ácido harziánico, gliotoxina, gliovirina, viridina, viridiol) obtenidos de interacción entre *R. solani* y dos cepas comerciales (T22 y T39) de *T. harzianum*.

Con relación al efecto de *Trichoderma* sobre nematodos se notificó que las quitinasas y proteasas de *Trichoderma* spp. que son muy similares a las de los hongos nematófagos que poseen potencial para atacar estos invertebrados (Morton y Hirsch, 2004). El proceso parasítico y el efecto de las enzimas y metabolitos de *Trichoderma* sobre nematodos pueden ocurrir en el suelo, en el interior de las raíces o sobre la superficie de estas. (Morton y Hirsch, 2004)

## **b) Competencia**

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros. (Samuels, 1996; Hjeljord y Tronsmo, 1998; Pérez, 2004)

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros (Durman *et al.*, 2003). La competencia por sustrato o espacio depende de: si el sustrato está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato. (Durman *et al.*, 2003)

## **c) Micoparasitismo**

Este es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas. (Harman, 2000; Howell, 2003; Woo *et al.*, 2006)

a) *Crecimiento químico trófico*, donde *Trichoderma* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes, b) *reconocimiento*, debido a una alta especificidad del antagonista por su sustrato (Hoyos *et al.*, 2008) c) *adhesión y enrollamiento*, ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno Chet (1998) d) y *actividad lítica*, por la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del

patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* (Küçük & Kivanç, 2004). El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación (Nico *et al.*, 2005). Diferentes interacciones hifales están involucradas en el micoparasitismo, tales como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis. En el parasitismo a nivel microscópico no todas estas interacciones son siempre observadas, pues al parecer dependen del aislado, de la especie de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del ambiente. (Nico *et al.*, 2005).

#### **d) Desactivación de las enzimas de patógenos y estimulación del crecimiento vegetal**

La desactivación de los factores de patogenicidad de *Trichoderma* contra hongos fitopatógenos constituye un mecanismo de antagonismo indirecto poco estudiado. Se sabe que *T. harzianum* (T39), secreta una proteasa que degrada las enzimas que utiliza *B. cinerea* para atacar la pared celular de las plantas Harman (2000), mientras que *T. viride* es capaz de producir  $\alpha$ -glucosidasa para degradar una fitotoxina de *R. solani* (Howell, 2003). Se piensa que el potencial enzimático de *Trichoderma* para detener el proceso infeccioso de los patógenos es mucho mayor, pues este controlador biológico secreta más de 70 metabolitos, entre ellos sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas (Howell, 2003). Entre las enzimas, se considera fundamental la b-1,3 glucanasa, estrechamente relacionada con la degradación de la pared celular de patógenos. (Sanz *et al.*, 2005)

Se evidenció una correlación positiva entre la secreción de b-1,3 glucanasa y N-acetylhexosaminidasa con la capacidad controladora de aislamientos de *Trichoderma*. (Larralde-Corona *et al.*, 2008)

#### **e) Inducción de resistencia**

Estudios recientes a niveles celular y molecular explican la diversidad de vías y mecanismos de acción de este hongo, según Harman *et al.* (2004), se descubrió, que algunas cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo de defensa en

las plantas, conocido como Inducción de Resistencia Sistémica (por sus siglas en inglés IRS). Esto supone que puedan controlar a patógenos distantes del lugar donde se encuentra físicamente el antagonista. Prueba de ello, fue que la colonización de las raíces de pepino con *T. asperellum*, indujo resistencia a *Pseudomonas* en el follaje (Shoresh *et al.*, 2010). Registrándose también evidencias de este modo de acción frente a nematodos (Shoresh *et al.*, 2010).

#### **2.4.1.5. Especies del género *Trichoderma* reconocidas como biocontroladores de *Meloidogyne incognita***

Según Sharon *et al.* (2007) algunas especies como *Trichoderma harzianum*, *T. asperellum*, *T. viride* y *T. atroviride*, parasitan a diferentes estadios de nematodos agalladores. Estudios taxonómicos de aislados de *Trichoderma* obtenidos en zonas productoras de tomate de la provincia de Loja, refieren 2 especies nuevas, con acción nematófaga *T. longibrachiatum* y *T. koningii* (Solano, 2014). Las especies nematófagas de *Trichoderma* tienen la capacidad de envolver al nematodo con su micelio, producen quitinasas que degradan la cutícula del nematodo y metabolitos que actúan como nematocidas; por ejemplo, *T. harzianum* parasita juveniles por acción de los metabolitos tóxicos que produce y parasita huevos por acción de las quitinasas (Yang *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que las especies de este género son capaces de colonizar las raíces del tomate en forma endófitas (Sikora *et al.*, 2008). Induce resistencia a nematodos y otros patógenos en las raíces, lo cual permite hablar de tres mecanismos de control biológico: antibiosis, competencia, parasitismo o lisis. (Kaewchai *et al.*, 2009; González *et al.*, 2010)

#### **2.4.2. *Pochonia* spp., como agente biocontrolador de nematodos**

##### **2.4.2.1. Características generales del género *Pochonia***

Hace más de 50 años el género *Pochonia* fue descubierto por micólogos brasileños Batista y Fonseca (1965), basándose en *P. humicola* aislada del suelo en el noreste de Brasil. Décadas más tarde, se notó que este taxón se había descrito mucho antes y asignado al género *Verticillium*, bajo el nombre de *V. chlamydosporia*, basado en las características morfológicas y moleculares, *V. chlamydosporia* se transfirió a *Pochonia* (Zare *et al.*, 2000; 2001). Actualmente, el género *Pochonia* comprende una sola especie dividida en cinco variedades.

Debido a su potencial como agente de biocontrol y su aparición en todo el mundo, *P. chlamydosporia* var. *Chlamydosporia* ha sido el taxón más estudiado en el género. (Manzanilla & Lopez, 2017)

*Pochonia chlamydosporia* tiene un estilo de vida multitrófico, se comporta como un saprófito, un parásito y un endófito, asociado a la rizosfera, la cual está sujeta a modificaciones resultantes de las interacciones de la planta y su entorno. Por lo tanto, este agente de control biológico necesita establecer interacciones específicas con su anfitrión y también requiere plasticidad fenotípica para lidiar con la competencia de otros organismos (Manzanilla & Lopez, 2017).

Estudios realizados con aislamientos de esta especie se reconocen los de la cepa IMI SD:187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata*, la cual ha demostrado reducir la infestación de este nematodo en sistemas de producción comercial en Cuba (Kerry, 2004). Crece fácilmente *in vitro*, algunos aislamientos son competidores de la rizosfera y virulentos; producen esporas de resistencia y sobreviven en el suelo; su eficacia depende de las densidades de nematodos y de la planta hospedante (Kerry, 2004). Además, se ha demostrado su importancia como parásito facultativo de huevos de nematodos formadores de quistes (*Globodera* spp., *Heterodera* spp.) y agalladores (*Meloidogyne* spp.) (Kerry, 2004; Hidalgo, 2013).

#### **2.4.2.2. Clasificación taxonómica.**

Gams y Zare (2001) informan la siguiente posición sistemática:

- **Reino:** Fungi
- **Phylum:** Deuteromycota
- **Clase:** Hyphomycetes
- **Género:** *Pochonia*
- **Especie:** *Pochonia chlamydosporia*

En el último tratamiento taxonómico de *Pochonia* (Seifert *et al.*, 2011), se describe como "Un género de anamorfos dimórficos para especies con aspecto de *Verticillium*. conidióforos y, a menudo, dictyochlamydosporas ". Las esporas presentan las siguientes tipologías: a) anamorfo [morf asexual] presenta espora

ameroconidia (aseptada), hialina, viscosa; b) anamorfo con dictyochlamydospora acechada, hialina. Una clamidiospora, se define como “de pared gruesa, resistente, persistente, no siendo liberada por un mecanismo de dehiscencia (Seifert *et al.*, 2011). Claramente, hay una considerable ambigüedad, y aquí se sugiere que un compromiso de trabajo sería adoptar el dimorfo, terminología para los dos morfos asexuales. (Seifert *et al.*, 2011)

#### **2.4.2.3. Características morfológicas *Pochonia***

Las colonias de *Pochonia chlamydosporia* en agar son de color blanco o blanquecino a amarillo ocre y algodonoso. Es un hongo de crecimiento relativamente lento que alcanza hasta 0,3 cm por día según la incubación temperatura ambiente. (Kerry, 2004)

Los conidióforos son postrados y pequeños diferenciados de hifas vegetativas o erectas, verticiladas o sólidas. Los conidios se adhieren para formar cabezas o cadenas globosas de esporas mucoides. (Kirk *et al.* 2008)

Las clamidiosporas (dictyochlamydospores) son de forma variable, formadas en tallos cortos, o menos diferenciados y sin tallo. Las clamidiosporas son comúnmente una estructura en reposo del hongo Kirk *et al.* 2008) se sabe que se forman solo en la fase sexual del hongo.

La esporulación puede ser controlada por interruptores genéticos activados por factores ambientales, las esporas (conidios y clamidiosporas) germinan en el suelo dando lugar a propágulos. El conidio individual tiene un núcleo, sin embargo, durante la germinación, el conidio puede dar la impresión de tener dos núcleos Los conidios en germinación producen un tubo germinativo que crece y da lugar a hifas. (Manzanilla & Lopez, 2017).

Presenta conidióforos erectos, con ramificación verticilada, presentando una protuberancia en forma de mazo en la punta del conidióforo que sostiene una sola espora; fiálides cilíndricas de 15 – 30  $\mu\text{m}$  de longitud en forma de espiral de 3 a 5. Fialosporas hialinas, de 2 - 5 x 1,5 - 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, ovoides ligeramente cilíndricas, de paredes lisas. Aleuriosporas muy comunes, que presentan de 4 a 9 celdas globulares de paredes gruesas, miden de 15–30 x 10 a 20  $\mu\text{m}$ , muriformes, ligeramente lobulados, con contenido granular, que nacen sobre ramificaciones laterales cortas de 15 – 30  $\mu\text{m}$  de longitud, son muy persistentes.

El micelio maduro completamente cubiertos de aleuriosporas, llegando a presentarse polvoso de color crema u ocre. (Manzanilla & Lopez, 2017).

#### **2.4.2.4. Mecanismos de acción de *Pochonia***

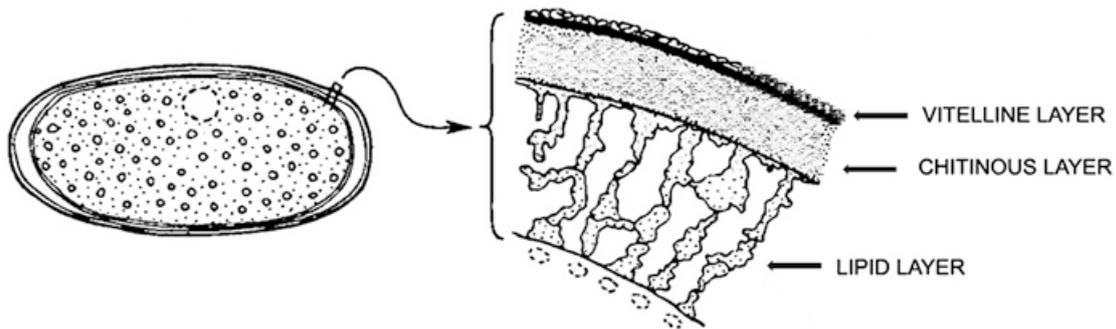
Los eventos involucrados en el parasitismo por *Pochonia* comprenden adhesión, penetración y colonización:

##### **a) Adherencia**

La adhesión es un paso crítico en el proceso de infección que permite al hongo ganar apoyo para el parasitismo exitoso y, en última instancia, para su supervivencia. *Pochonia* produce glucoproteínas que son responsables de la adhesión de conidios e hifas a los huevos (López-Llorca et al. 2002). Estos metabolitos ayudan a la fijación del tubo germinal de esporas o la hifa al sustrato, al mismo tiempo que ofrece protección contra la desecación. En general, el proceso de adhesión comienza en un ambiente húmedo, sugiriendo que las sustancias adhesivas pueden ser insolubles en agua. El desarrollo del tubo germinal de hongos y su diferenciación, especialmente la formación del apresorio puede ocurrir en respuesta a señales de superficie; incluso dureza, hidrofobicidad y topografía. (Tucker y Talbot, 2001)

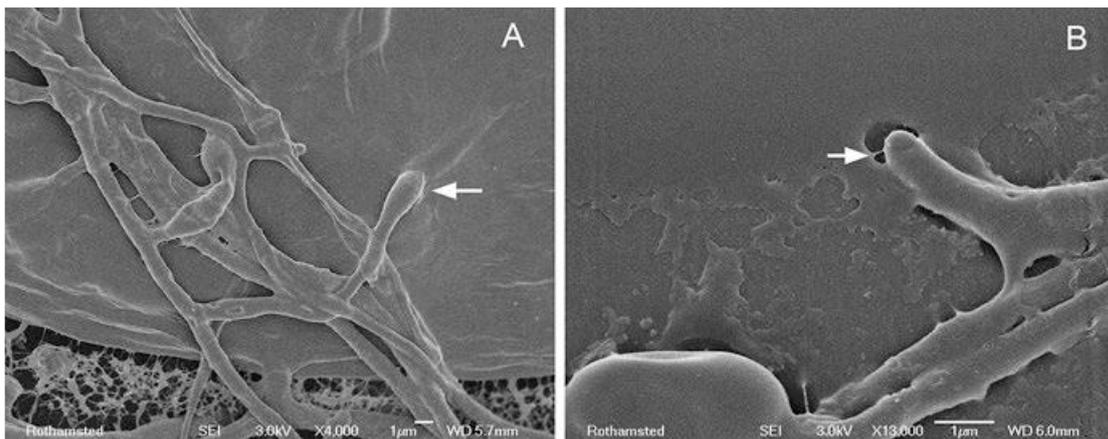
##### **b) Penetración**

*Pochonia* produce apresorios y secreta enzimas extracelulares para la penetración del huésped, es decir, la misma estrategia utilizada por entomopatógenos y hongos patógenos de plantas. Esta similitud en los mecanismos de patogénesis puede explicar por qué la homología genética entre *P. chlamydosporia* y el hongo entomopatógeno *Metarhizium* (Larriba et al., 2014). Los procesos que regulan la fuerza mecánica utilizada por el apresorio de *Pochonia* para penetrar en la cáscara de huevo aún no se han determinado, pero la secreción de enzimas juega un papel importante en la superación de la membrana vitelina y la exposición de la capa de quitina (fig. 2)



**Figura 2. Reconstrucción esquemática de una sección transversal de la cáscara de huevo de nematodos parásitos de plantas (Manzanilla & López, 2017).**

Los procesos físicos y químicos trabajan juntos para la penetración del tubo germinal en el huevo (López-Llorca *et al.*, 2002; Manzanilla-López *et al.*, 2011). Los apresorios pueden desarrollarse en la punta y laterales de los tubos germinales, así como en las hifas terminales de *Pochonia* (Fig. 3)



**Figura 3. (A, B) Micrografía de microscopía electrónica de crio-barrido que muestra un apresorio (flechas) de *Pochonia chlamydosporia* en la superficie de los huevos de *Meloidogyne incognita* 24 h después de la inoculación (Manzanilla & Lopez, 2017).**

Esto fue reportado por primera vez (López-Llorca y Claugher, 1990; Lopez-Llorca y Robertson 1992a; Segers *et al.*, 1996). La morfología y el número de apresorios formados dependen del huésped del nematodo. Por ejemplo, en la superficie del huevo de *Meloidogyne incognita* hay apresorios más numerosos y más grandes que en los huevos de *Globodera rostochiensis*. (Manzanilla-Lopez, 2017)

### **c) Colonización**

Tras la penetración, el hongo coloniza los tejidos del huésped para obtener nutrientes. Una vez adentro aumenta su capacidad reproductiva. *Pochonia chlamydosporia* utiliza los azúcares disponibles en el huevo como fuente de carbono. La trehalosa, por ejemplo, es una Caride comúnmente encontrado en la cáscara del huevo en los juveniles, que juega un papel importante en la protección de nematodos contra la desecación y que se asocia con anhidrobiosis y el mantenimiento de la latencia juvenil (J<sub>2</sub>) de segunda etapa dentro de la cáscara del huevo (Yen *et al.*, 1996; Wharton, 2011). *Pochonia chlamydosporia* coloniza tanto los huevos como los embriones, así como J<sub>2</sub> dentro de los huevos (Nasu, 2013). El hongo también parasita a las hembras y coloniza las células de alimentación especializadas de nematodos endoparasitarios sedentarios que acumulan nutrientes vegetales. (Nasu, 2013)

## **2.5. AISLAMIENTOS DE HONGOS**

### **2.5.1. Aislamiento de hongos a partir de mazas de huevo**

Taylor y Sasser (1973) describe una metodología para la extracción de mazas de huevo a partir de raíces agalladas, que consiste en el lavado y desinfección con hipoclorito de sodio al 1 %, por sumersión de 2 a 3 minutos, y enjuague con agua destilada estéril. En la raíz agallada se realizan cortes transversales y se extraen masas de huevos de *Meloidogyne* spp. con ayuda de una aguja de disección y bajo un estereoscopio a 45X, las cuales se colocan en un tubo eppendorf con 0.5 mL de agua agarizada al 0,005 % y se maceran con un émbolo metálico durante un minuto para la liberación de los huevos, hasta obtener una suspensión aproximada de 1 000 huevos/mL.

Solano (2014), sugiere una metodología para la purificación de estos hongos a partir de la suspensión agua-nematodos, tomar alícuota de 0,15 mL y sembrar en cajas de Petri con medio de cultivo AAA (Agar 18 g, Agua 1 000 mL y Antibióticos: 50 mg sulfato de estreptomycin, 50 mg de tetraciclina y 50 mg cloranfenicol), regulado a pH 5,8. Las cajas se incubadas a 25°C ±1°C. Se realizan observaciones de parasitismo a las 24 horas y 48 horas, bajo el microscopio invertido.

### **2.5.2. Aislamiento de hongos nematófagos en muestras de suelo**

Para el aislamiento de hongos a partir de muestras de suelo proveniente de la zona de la rizosfera de plantas muestreadas infestadas por *Meloidogyne incognita*, se recolecta 20 submuestras por cada plantación, las muestras se deben homogenizar para obtener una sola muestra representativa, se toma 10 g de suelo en un vaso de precipitación y se afora con 90 ml de agua estéril para formar una dilución madre 1:10, de la cual se realizaron diluciones seriadas de 1:100, 1:1000 y 1:10000 (Burges, 1960). De cada dilución se toma una alícuota de 1 ml y se procede a la siembra en medio PDA, incubadas a 25°C ± 1°C.

### **2.6. PROPAGACIÓN DE HONGOS NEMATÓFAGOS**

En la actualidad existen diversas tecnologías para la producción de un bioplaguicida a partir de hongos, esta producción involucra la elección de medios líquidos y sólidos, apropiados para el buen desarrollo del hongo, con la finalidad de obtener un biopreparado que brinde un producto de máxima eficacia en condiciones de campo mayormente. Las técnicas de producción más usadas son a partir de soportes sólidos, en cultivos líquidos sumergidos o combinaciones de ambos. Estos métodos se consideran generalmente artesanales o semiartesanales atendiendo al número y tipo de manipulación.

Cada método tiene ventajas y desventajas, lo más importante es la calidad del producto final y su factibilidad tecnológica y económica (Fernández-Larrea, 2001). El proceso de producción semi-industrial, el más utilizado, se realiza en varias fases, que van desde la obtención del cultivo puro hasta la formulación del producto, en general el proceso está organizado en dos etapas, la etapa de cepario y la etapa de producción masiva de inóculo, para lo cual se debe contar con un buen aislamiento que mantenga su virulencia y homogeneidad, conservadas cuidadosamente en un medio de cultivo adecuado (Márquez y Solano, 2017). El medio líquido debe estimular un rápido desarrollo micelial el cual se utiliza para inocular el sustrato sólido (Jenkins *et al.*, 1998). Debe contener fuentes de carbohidratos que le suministran energía y nitrógeno en forma de proteínas o aminoácidos, los cuales son esenciales para el desarrollo del hongo.

En cuanto a los sustratos sólidos, existe una gran variabilidad disponibles, estos buscan proveer un soporte físico para que el hongo produzca conidias aéreas.

Generalmente el sustrato suele ser cereal como arroz, mijo, maíz, trigo, cebada, avena, sorgo. Al entrar en contacto hongo-medio, estos utilizan ciertas proporciones de los nutrientes proporcionados por los sustratos durante su desarrollo y esporulación. La elección del sustrato depende de un número de factores que incluyen la disponibilidad local, costo y preferencia del aislado (Jenkins, *et al.*, 1998). Un sustrato ideal no solo deberá contener partículas con las dimensiones correctas, sino también mantener su integridad estructural durante la preparación de los procesos de producción (Bradley *et al.*, 1992). En el mundo, existen numerosos países en los cuales grupos de investigadores y empresas productoras se concentran en el desarrollo de productos comerciales a partir de hongos entre los que se encuentran, Cuba, Brasil, Italia, Inglaterra, Holanda, Estados Unidos. (Butt y Copping, 2000)

### **TRABAJOS RELACIONADOS CON EL TEMA**

Gómez *et al.* (2009) refiere que las poblaciones que sobrepasan los niveles de tolerancia en el tomate para nematodos agalladores, se ha estimado entre 0,5 a 1,0 huevos o larvas por gramo de suelo. Hernández *et al.* (2011), aislaron *T. hammatum*, *T. koningiopsis*, *T. asperellum*, de rizósfera de *Helianthus annuus* L., y *Trichoderma* sp, de la rizósfera de *Pinus cembroides* Zucc. Al respecto, Woo *et al.* (2006), mencionan que se pueden obtener cepas de *Trichoderma* tanto en praderas, bosques, desiertos, o en suelos de diferentes zonas climáticas.

Estudios realizados por Castillo y Medina (2014) determinaron el efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles (J<sub>2</sub>) de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio, concluyendo que *Trichoderma* spp., disminuyó significativamente tanto la población de huevos como J<sub>2</sub> de *Meloidogyne* spp., en condiciones de laboratorio.

Acevedo (2015) aplicó *Beauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* en concentraciones baja, media, alta y obtuvo la disminución de poblaciones de nematodos con los tratamientos  $3.81 \times 10^{12}$  y  $4.77 \times 10^{12}$  de *T. harzianum* correspondientes a concentración baja y alta con respecto a los resultados de *Beauveria bassiana*. Así mismo, estudios realizados por Sánchez de Prato *et al.*, 2015, en sustrato de mezcla 2 partes de tierra, 1 de materia orgánica y 1 de arena, aplicó *Trichoderma harzianum* con tres concentraciones de conidias y

erradicó el 100% de nematodos de los géneros *Meloidogyne* spp., y *Pratylenchus* spp., con el tratamiento sustrato-*Trichoderma*  $1 \times 10^{27}$  ufc/ml.

Jamshidnejad *et al.*, (2013) informó de la efectividad del género *Trichoderma* en la inhibición de la eclosión de huevos de *M. javanica* con aislamientos de *T. harzianum* de hasta el 80,36 %, efectividad atribuida a las quitinasas En la reducción significativa de agallas, masas de huevos y huevos por masa (Radwan *et al.*, 2012). Otros estudios determinaron el efecto de *Trichoderma atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* sobre huevos de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio, con seis tratamientos (T), de los cuales tres fueron controles, concluyendo que *T. atroviride*, *T. harzianum* y *T. viride* tienen un efecto negativo sobre la evolución de los huevos de *Meloidogyne incognita* en condiciones de laboratorio. (Mendoza *et al.*, 2013)

Insuasty *et al.* (2014), aisló cepas de *Trichoderma* de la rizosfera de plantas sana, se evaluó el crecimiento micelial y halo de inhibición en siembras duales, que sirvieron como criterio de selección para pruebas en invernadero, donde se evaluaron la altura de planta, longitud de raíces, materia seca de raíces y porcentaje de incidencia. En campo se evaluó componentes de rendimiento, altura de la planta y longitud de raíz con las mejores cepas, se obtuvieron diferencias significativas de antagonismo para *Fusarium oxysporum* entre cepas respecto al testigo.

En algunos trabajos se ha enfatizado mucho en las diferentes ventajas que presenta el uso de aislamientos nativos del hongo en el control de los nematodos agalladores, debido a que las acciones no solamente son de control. (Affokpon *et al.*, 2011)

Para muestra de esto Vargas *et al.* (2015) en su trabajo expone la evaluación de las cepas PB17 y B23 de *Trichoderma* spp., y de la inyección de oxamil 24 SL en el pseudotallo, para el combate de nematodos en banano, con aplicaciones mensuales a  $1 \times 10^9$  ufc.mL<sup>-1</sup> durante 20 meses; demostrando que no se redujeron las poblaciones de nematodos en las plantas tratadas con las cepas de *Trichoderma* spp.; sin embargo, las plantas tratadas con *Trichoderma* mostraron mayor peso del racimo en relación a las plantas inyectadas con oxamil

y al testigo, lo cual confirma la acción endofítica y estimulante de las cepas de *Trichoderma*.

Vergara (2012) Bajo un diseño experimental completamente aleatorio en cajas Petri con Papa-Dextrosa-Agar se les adicionó, y evaluó por separado, 1 mL de *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* en una concentración de  $1,03 \times 10^8$  esporas.mL<sup>-1</sup>; asimismo se les adicionó 30 µL que contenían 50 huevos, juveniles y adultos de *R. similis*., a las 24 h de estar en contacto con los huevos, juveniles y adultos, infectaron entre el 2 y 11% de estos. Vergara expone que después de 120 h, el porcentaje de individuos infectados aumentó entre 61 y 85%. En condiciones *in vitro*, *P. lilacinum* y *P. chlamydosporia* tienen un aumento creciente en individuos infectados desde las 12 h hasta las 120 h, sobre huevos, juveniles y adultos de *Radopholus similis*, convirtiéndose en una alternativa promisoriosa para su control en condiciones de campo dentro de un manejo integrado de plagas.

En estudios similares Jiram (2018) evaluó el potencial antagónico de cinco especies nativas de *Trichoderma*; *T. harzianum* (Th02-04), *T. harzianum* (Th10-D86), *T. simmonsii* (Th33-58), *T. virens* (Th33-59) y *T. virens* (Th26-52), especies comerciales y un testigo sin inoculantes fúngicos, distribuidas en un diseño completamente al azar y cuatro repeticiones en plántulas de tomate, inoculadas con tres aplicaciones de  $1 \times 10^6$  conidias ml<sup>-1</sup>. Se inocularon 18, 500 huevos de *M. incognita* y 10 ml con la concentración inicial de las conidias fúngicas, con aplicaciones al momento, a los ocho y 15 días después del trasplante. El producto comercial y las especies *T. virens* (Th26-52 y Th33-59) lograron disminuir hasta 22% la formación de agallas, 87 y 52.39% de inhibición de producción de formación de hembras por gramo de raíz.

Camacho (2007) evaluó cinco aislamientos mexicanos y uno brasileño del hongo *Pochonia chlamydosporia* para el control de tres poblaciones mexicanas de *Nacobbus aberrans*. Los experimentos se realizaron bajo condiciones controladas de temperatura (26°C), humedad relativa (80%) y fotoperíodo (14 h luz/10 h oscuridad) en cámara de crecimiento. Todos los aislamientos del hongo ejercieron un alto porcentaje de parasitismo sobre las masas de huevos y huevos

de *N. aberrans* por gramo de raíz, reduciendo el número de juveniles de segundo estadio del nematodo disponible como inóculo en el suelo.

Insuasty (2014) aisló cepas de *Trichoderma* para el control de *F. oxysporum*, estas se obtuvieron de la rizósfera de plantas sanas. Se evaluó el crecimiento micelial y halo de inhibición en siembras duales, que sirvieron como criterio de selección para pruebas en invernadero, donde se evaluaron la altura de planta, longitud de raíces, materia seca de raíces y porcentaje de incidencia. En campo se usó un diseño de bloques al azar, para evaluar componentes de rendimiento, altura de la planta y longitud de raíz con las mejores cepas. En laboratorio, se seleccionaron 5 cepas por presentar mejor actividad antagonística; en invernadero, 3 fueron las cepas más antagonísticas; en campo, se obtuvieron 2 cepas con capacidad antagónica consistente y pueden usarse en el manejo del hongo *F. oxysporum* en arveja.

Diferentes trabajos realizados con *P. chlamydosporia* parasitando a huevos de *Meloidogyne*, *Globodera* y *Nacobbus* mostraron que el hongo tiene la capacidad de reducir las poblaciones de estos nematodos (en invernadero y campo), establecerse en suelo y permanecer desde un mes hasta cinco años, (Medina, 2018). Por su parte Flores *et al.* (2008) aplicó cinco aislamientos nativos del hongo *Pochonia chlamydosporia* obtenidas de muestras colectadas en parcelas infestadas con *Nacobbus aberrans sensu stricto*, los resultados sostienen que los aislamientos mexicanos produjeron un parasitismo superior al 60% en los huevos del nematodo y una colonización del 100% de la rizosfera. Todos los aislamientos se identificaron molecularmente como pertenecientes a *Pochonia chlamydosporia var. chlamydosporia* usando cebadores específicos. (Flores *et al.*, 2008)

Estudios realizados para evaluar las actividades saprofítica y patogénica de tres cepas brasileñas y una cubana de *P. chlamydosporia* frente a *M. enterolobii*, en una sucesión de cultivos tomate - lechuga (*Lactuca sativa* L.), demostraron que la colonización de *P. chlamydosporia* se mantuvo en el orden de  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup> de suelo y mayor de  $10^3$  UFC.g<sup>-1</sup> en las raíces, el porcentaje de colonización de estos hongos sobre las masas de huevos fue superior al 60% en todos los tratamientos, mientras que en parasitismo de huevos estuvieron entre 45 y 55%. (Arévalo *et al.*, 2012)

Oca *et al.* (2005) evaluó a *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* como agente de control biológico de nematodos formadores de agallas, los resultados demostraron que no existen diferencias en las características morfológicas, culturales, enzimáticas, productivas y patogénicas al ser. La aplicación mostró valores de colonización de masas de huevos hasta un 98% y parasitismo de huevos de *M. incognita*, por encima del 70%.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación de los ensayos

Los ensayos *in vitro* se desarrollaron en el laboratorio de Sanidad Vegetal y el ensayo en condiciones semicontroladas en el invernadero del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja, ubicados en las siguientes coordenadas: **Latitud:** 9 553 600 – 9 553 650 N; **Longitud:** 699 250 – 699 300 O; **Altitud:** 2140 msnm

#### 3.2. Materiales

##### 3.2.1. Materiales de laboratorio

- **Vidriería e instrumentos de manipulación:** Cajas de Petri, erlenmeyer, lámparas de alcohol, pipeta graduada, porta y cubre objetos, siracusas, tubos de ensayo, varilla de agitación, vasos de precipitación de 100, 500 y 1000 mL, aza de siembra, agujas hipodérmicas, agujas quirúrgicas, pinzas, bandejas plásticas, bisturí, platos calados, puntas de micropipeta, saca bocados, fundas de polifan termo resistentes, fundas plásticas transparentes, jeringas de 1, 5 y 10 ml, parafilm, pipetas Pasteur, probetas graduada, tubos para microcentrifuga, envases de plástico, algodón, franela, lienzo, pañuelos faciales, papel filtro contador manual de unidades, cámara de Neubauer, micropipeta de 100-1000 µl, micropipeta de 10-100 µl, tamices nematológicos (No 60, 120 y 400).

- **Medios de cultivo y otros reactivos:** AA (agar y agua), AAA (agar, agua y antibióticos), arroz cocido y esterilizado, CMA (Agar harina de maíz), PDA (papa, dextrosa y agar), PDAA (papa, dextrosa, agar y antibióticos), ácido láctico 40 %, azul de metileno 1 %, eosina al 10 %, fucsina ácida 1 %, alcohol potable e industrial, hipoclorito de sodio 1 %, antibióticos (cloranfenicol, tetraciclina, estreptomycin al 0,05 %), tween 80.

- **Equipos:** Agitador magnético tipo vórtice, autoclave, balanza digital de 0,0001 g de precisión, baño de María, cámara de flujo laminar, cámara digital, centrífuga, destilador de agua, estereo microscopios, incubadoras.

##### 3.2.2. Materiales de campo e insumos

Semillas de tomate cultivar Floradade, sustrato 2:1 (Humus y turba), esterilizadora de sustrato, regaderas, etiquetas, vasos plásticos de 150 ml, materiales para tutoraje (alambre, hilo), podadoras, navajas, trasplantadoras, gavetas, etiquetas, cinta métrica, cámara digital.

### 3.3. Métodos

La investigación se ejecutó en las siguientes fases; prospección de hongos nematófagos, caracterización, identificación taxonómica y ensayos de efectividad *in vitro* e invernadero en plantas cultivadas en macetas en condiciones de invernadero.

La prospección de los hongos antagonistas se realizó en zonas hortícolas de 5 cantones de la provincia de Loja (Loja, Catamayo, Zapotillo, Gonzanamá).

La fase de laboratorio constó de las siguientes actividades: aislamiento, evaluación de los aislados en condiciones *in vitro*, caracterización e identificación taxonómica.

En la fase de invernadero, se evaluó experimentalmente la efectividad de los mejores aislados evaluados en la fase anterior.

#### 3.3.1. Metodología para el primer objetivo:

Evaluar aislados nativos de los hongos nematófagos *Trichoderma* spp., y *Pochonia* spp., con altos niveles de parasitismo sobre *M. incognita* (Kofoid & White) en condiciones *in vitro*.

##### 3.3.1.1. Ubicación de zonas de muestreo

La prospección de hongos nematófagos se realizó en cuatro zonas hortícolas productoras de tomate en la provincia de Loja, las mismas que son: Zona 1: (Obrapía, La Era, La Trinidad) Loja; zona 2: (El Tambo) Catamayo; zona 3: (El Mango) Zapotillo; zona 4: (Sacapalca) Gonzanamá.

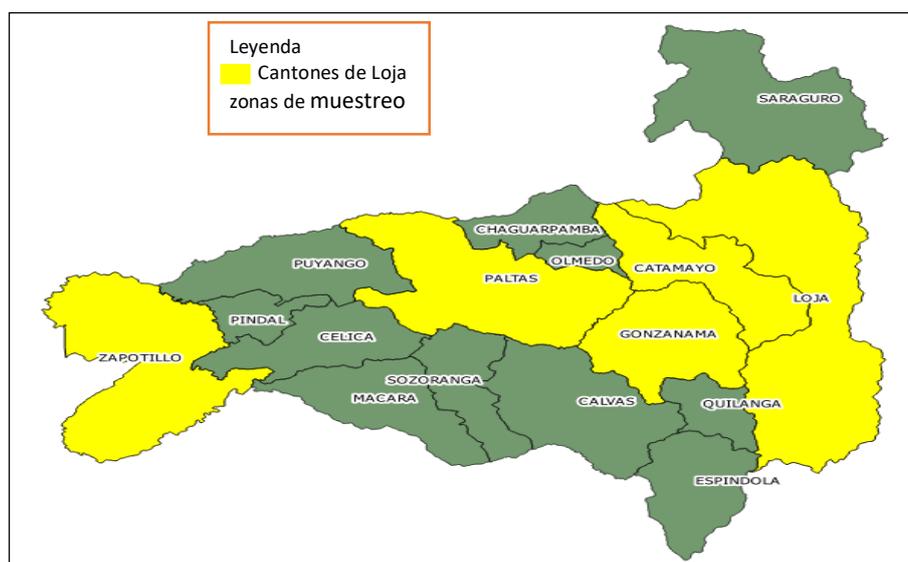


Figura 4. Zonas de muestro de la provincia de Loja

La recolección de muestras, se realizó en la fase terminal de cosecha en raíces agalladas y muestras de suelo de la rizosfera de la planta, se las colocó en fundas plásticas dentro de una funda de papel, a fin de evitar la deshidratación de raíces y secado del suelo, para ser llevadas al laboratorio de Sanidad Vegetal para su procesamiento.

### **3.3.1.2. Aislamiento de hongos parásitos de huevos.**

El procesamiento de muestras de raíces agalladas, se realizó con la metodología sugerida por Taylor y Sasser (1973), que consiste en el lavado y desinfección con hipoclorito de sodio al 1 %, por sumersión de 2 a 3 minutos, y enjuague con agua destilada estéril; luego se procedió a la extracción de masas de huevos bajo un estereomicroscopio y colocadas en un tubo eppendorf con 0.5 mL de agua agarizada al 0,005 % y se maceró con un émbolo metálico durante un minuto para la liberación de los huevos, hasta obtener una suspensión aproximada de 1 000 huevos/mL. Para el aislamiento se utilizó la metodología adaptada por El aislamiento de los hongos, se utilizó la metodología sugerida por Solano (2014), que consistió en tomar una alícuota de 0,15 mL para sembrar en cajas de Petri con medio de cultivo AAA (Agar 18 g, Agua 1 000 mL y Antibióticos: 50 mg sulfato de estreptomicina, 50 mg de tetraciclina y 50 mg cloranfenicol), regulado a pH 5,8, seguidamente las cajas fueron incubadas a 25°C ±1°C. Bajo el microscopio invertido, se realizaron observaciones de parasitismo a las 24 horas y 48 horas, y se señaló los huevos que presentan micelio de hongos, se realizó repiques a nuevos medios de cultivo con medio PDA para el desarrollo de colonias puras y posterior caracterización morfológica y cultural.

### **3.3.1.3. Aislamiento de hongos nematófagos en muestras de suelo**

Previamente, por cada plantación de tomate se recolectaron 20 submuestras de la zona rizosférica de plantas infestadas por *Meloidogyne incognita*; las muestras fueron homogenizadas en una sola muestra representativa, de esta se tomó 10 g de suelo en un vaso de precipitación y se aforo con 90 ml de agua estéril para formar una dilución madre 1:10, de la cual se realizaron diluciones seriadas de 1:100, 1:1000 y 1:10000 (Burges, 1960). De cada dilución se tomó una alícuota

de 1 ml con micropipeta y se procedió a la siembra en medio PDA contenido en cajas de Petri, las cuales fueron incubadas a  $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , hasta el apareamiento de colonias fungosas. La purificación de algunos aislamientos consistió en separar colonias con características diferenciales entre ellas y luego transferidas a cajas Petri con medio PDA, hasta el desarrollo de colonias puras, para su posterior fase de caracterización e identificación.

#### 3.3.1.4. Evaluación *in vitro*

La evaluación *in vitro* se la realizó con las metodologías adaptadas por Márquez y Solano (2017), que consiste en extraer masas de huevos de *Meloidogyne incognita* de tamaños similares y colocadas en un tubo eppendorf para desinfectarlas superficialmente con Hipoclorito de Sodio 1% por 20 segundos, 3 lavados con agua destilada estéril con tiempos de 1 min cada uno; se utilizó una masa por repetición (Siracusa) que contenía una población aproximada de 50 huevos. Luego se procedió a la preparación de las concentraciones de inóculos fungosos cultivados por 7 días en medio PDA contenido en tubos de ensayo, se arrastró el crecimiento micelial con 10 mL de agua destilada estéril más Tween 80 al 0,5 %, y se ajustaron suspensiones conidiales de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  esporas/mL. La cuantificación de esporas/mL se realizó en la cámara Neubauer y la concentración se calculó con la ecuación de French y Hebert (1982):

$$\text{Conidias x mL} = \sum 5cs \times 50000$$

**Donde:**

**Conidias/mL:** Concentración de inóculo (conidios/mL)

**$\sum 5cs$ :** Sumatoria de cinco cuadrados secundarios

**50000:** Constante para el conteo de esporas en 5 cuadrados secundarios

El bioensayo *in vitro* se realizó en condiciones de absoluta asepsia tanto del ambiente como de materiales esterilizados. Se trabajó independiente cada hongo (*Trichoderma* y *Pochonia*). Para esto se colocó 1,5 mL de las diluciones de los aislados en concentraciones de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  en cada una de las cuales se colocó 1 masa de huevo/ Siracusa de 60 mm con ayuda de agujas bacteriológicas, las siracusas fueron colocadas dentro de cajas Petri de 90 mm, rodeadas de dos torundas humedecidas con agua destilada estéril para simular una cámara húmeda evitando así la evaporación de las diluciones. Se incubó el ensayo a  $28^{\circ}\text{C}$  y se evaluó la efectividad de las cepas a partir de las 24 hasta

120 horas, se observó huevos parasitados con presencia de hifas; huevos no parasitados; J<sub>2</sub> parasitados; J<sub>2</sub> no parasitados.

El ensayo *in vitro* se ejecutó a en un Diseño Completamente Aleatorizado, con 34 tratamientos y 5 repeticiones para *Trichoderma* spp., y 22 tratamientos con 5 repeticiones para *Pochonia* spp.; conforme al siguiente cuadro:

**Cuadro 1. Tratamientos (aislados) de *Trichoderma* evaluados en bioensayo *in vitro*. Loja, Ecuador, 2018**

Tratamiento	Procedencia	Código	Concentración
1	La Era	LEML-TvirD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
2	La Era	LEML-TvirD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
3	La Era	LEML-TvirD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
4	La Trinidad	LTRML-TsppD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
5	La Trinidad	LTRML-TsppD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
6	La Trinidad	LTRML-TsppD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
7	Lab.Snd Veg	T4ThLED9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
8	Lab.Snd Veg	T4ThLED8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
9	Lab.Snd Veg	T4ThLED7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
10	EL Tambo 2	TB2CL-Tspp.D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
11	EL Tambo 2	TB2CL-Tspp.D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
12	EL Tambo 2	TB2CL-Tspp.D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
13	El Mango	EMZL-TvirD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
14	El Mango	EMZL-TvirD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
15	El Mango	EMZL-TvirD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
16	Lab.Snd Veg	T2TATR166D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
17	Lab.Snd Veg	T2TATR166D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
18	Lab.Snd Veg	T2TATR166D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
19	Lab.Snd Veg	T5TvirC27D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
20	Lab.Snd Veg	T5TvirC27D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
21	Lab.Snd Veg	T5TvirC27D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
22	Lab.Snd Veg	T3TKT19D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
23	Lab.Snd Veg	T3TKT19D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
24	Lab.Snd Veg	T3TKT19D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
25	Lab.Snd Veg	T1TIL15D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
26	Lab.Snd Veg	T1TIL15D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
27	Lab.Snd Veg	T1TIL15D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
28	Obrapia	OPL-Tvir D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
29	Obrapia	OPL-Tvir D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
30	Obrapia	OPL-Tvir D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
31	Sacapalca	SCPLGL-ThzD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
32	Sacapalca	SCPLGL-ThzD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
33	Sacapalca	SCPLGL-ThzD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Trichoderma</i>
34	TESTIGO	Tsg	Sin presencia del hongo

**Cuadro 2. Tratamientos (aislados) de *Pochonia* evaluados en bioensayo *in vitro*. Loja, Ecuador, 2018**

TTO	Procedencia	Código	Concentración
1	La Era	LEML-PchclmD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
2	La Era	LEML-PchclmD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
3	La Era	LEML-PchclmD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
4	Lab.Snd Veg	PCH001D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
5	Lab.Snd Veg	PCH001D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
6	Lab.Snd Veg	PCH001D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
7	Lab.Snd Veg	PCH002D9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
8	Lab.Snd Veg	PCH002D8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
9	Lab.Snd Veg	PCH002D7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
10	EL Tambo 2	TB2CL-PchclmD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
11	EL Tambo 2	TB2CL-PchclmD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
12	EL Tambo 2	TB2CL-PchclmD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
13	EL Tambo 1	TB1CL-PchctnlaD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
14	EL Tambo 1	TB1CL-PchctnlaD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
15	EL Tambo 1	TB1CL-PchctnlaD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
16	La Trinidad	LTrML-PchclmD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
17	La Trinidad	LTrML-PchclmD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
18	La Trinidad	LTrML-PchclmD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
19	Lab.Snd Veg	NZO2(S)VD9	1X10 <sup>9</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
20	Lab.Snd Veg	NZO2(S)VD8	1X10 <sup>8</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
21	Lab.Snd Veg	NZO2(S)VD7	1X10 <sup>7</sup> esporas de <i>Pochonia</i>
22	TESTIGO	Tstgo	Sin presencia del hongo

### 3.3.1.5. Identificación morfológica de los mejores aislados

La caracterización de los aislados (*Trichoderma* Y *Pochonia*), fue con base a sus características morfológicas macroscópicas y microscópica.

Para la identificación se realizó la caracterización macroscópica, esta se realizó en colonias de 5 a 6 días y consistió en determinar: color, forma, tamaño, elevación, bordes, pigmentación. La caracterización microscópica se realizó con la técnica de los microcultivos, los cuales se incubaron a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  por 48 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron las muestras al microscopio óptico. El valor micrométrico fue de 1  $\mu\text{m}$  con objetivo de 40X y de esta manera se determinó el tamaño y forma de las estructuras reproductivas. La Características macroscópicas y microscópicas fueron comparadas con las claves taxonómicas de Gams y Zare (2001); Kozakiewicz (2001); Luangsa *et al.* (2011).

### **3.3.2. Metodología para el segundo objetivo:**

Seleccionar aislados nativos de los hongos nematófagos *Trichoderma* spp., y *Pochonia* spp., con altos niveles de parasitismo sobre *M. incognita* (Kofoid & White) en condiciones de invernadero.

#### **3.3.2.1. Evaluación de aislados en invernadero.**

##### **3.3.2.1.1. Preparación de Semillero.**

Se utilizaron semillas de tomate *var.* Floradade Lam, sembradas en vasos plásticos para luego de 21 días después de la germinación se las trasplantó a fundas de polietileno perforadas de 8 x 12 cm con sustrato en una proporción 1:1:1 (suelo, humus y arena) esterilizado a vapor de agua a 120°C por dos horas.

##### **3.3.2.1.2. Masificación de los aislados.**

**1) obtención de pre inóculo:** previamente se repicó los hongos en botellas de cristal que contenía una lámina 0,5 cm de grosor de medio PDA con una cobertura aproximada de 100 cm<sup>2</sup>, sobre la cual se inoculó 2 mL de una suspensión conidial de cada aislado, luego incubadas a 28°C ±1°C por 7 días.

**2) Masificación en sustrato de arroz:** consistió en la masificación en sustrato arroz contenido en fundas de polietileno (polifán) de 12 x 16 cm, en las cuales se colocó 360 g de arroz partido (arrocillo), remojado previamente por 30 minutos, esterilizado a una temperatura 121°C ±1°C por 20 min. Los sustratos fueron inoculados mediante el arrastre de las colonias de la botella con 100 ml de agua, agitando con bolas de cristal estériles y 0,3 mL de Tween 80. Se inoculó 30 mL de hongo por funda de arroz, las mismas que se incubaron a 28°C ±1°C, hasta la colonización completa del arroz en 7 días.

**3) Secado y conservación.** Se procedió al secado del sustrato colonizado, en fundas de papel craft estériles en condiciones naturales de temperatura y fotoperiodos dentro del laboratorio, por un periodo de 10 días, las fundas se cambiaron diariamente y se reutilizaron luego de ser esterilizadas. El sustrato desecado al 14 % de contenido de humedad, se trasvasó a fundas de polietileno (polifán) para su conservación al ambiente hasta su utilización.

### **3.3.2.1.3. Preparación de las concentraciones de inóculos fungosos.**

Para determinar la concentración de inóculo de los hongos, se pesó 1g de arroz de cada aislado y se preparó una suspensión en 10 mL de agua destilada, para realizar la cuantificación en cámara de Neubauer. Una vez conocida la concentración por gramo de arroz, se calculó mediante fórmula, la cantidad de inóculo necesario para alcanzar la concentración deseada de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$ , esporas/planta. La concentración deseada se estimó mediante la fórmula siguiente:

**Concentración deseada =** 1 gramo x Concentración deseada / Conidias por g

**Donde:**

**Peso de sustrato:** 1g de sustrato

**Concentración deseada:**  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$

**Conidias/g:** Cantidad obtenida de la cuantificación.

### **3.3.2.1.4. Preparación del inóculo de nematodos**

La extracción de  $J_2$  se realizó con la metodología de Marquez y Solano (2017). Una vez lavadas y desinfectadas las raíces con hipoclorito de sodio al 1 % por 1 minuto, se picaron las raíces en fragmentos de 1 cm, luego se licuaron 10 gramos/plato calado y se tamizó; el filtrado se recogió del tamiz No. 400 en 20 mL de agua, del cual se tomaron 10 alícuotas de 2 mL para cuantificar y estimar una concentración de larvas  $J_2$ /planta.

### **3.3.2.1.5. Preparación y Montaje del bioensayo**

Se utilizó macetas plásticas perforadas de 3.0 kg de capacidad conteniendo un sustrato estéril 1:1:1 (tierra, arena, humus) se sembró las plantas y se coinoculó 3000 juveniles  $J_2$  / planta y después de 2 días se inoculó el sustrato en formulación sólida los hongos nematófagos, en concentraciones de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  esporas/planta distribuidos en los primeros 5 cm bajo el nivel superior de la maceta; se realizaron 2 aplicaciones, al inicio y 40 días después de la primera inoculación.

Durante el desarrollo de las plantas, se realizaron riegos permanentes 3 veces a la semana, se procedió a tutorar las plantas con pitas plásticas a los 20 días después del trasplante. La evaluación se realizó a los 60 días después de

trasplante y se determinó la altura de planta, biomasa foliar, biomasa radical, índice de agallamiento; población de  $J_2/100 \text{ cm}^3$  de sustrato;  $J_2/10 \text{ g}$  de raíces. El ensayo se desarrolló en un DCA, con 25 tratamientos y 10 repeticiones.

**Cuadro 3. Tratamientos evaluados en el ensayo en fase semicontrolada (invernadero). Loja, 2018**

<b>Tto</b>	<b>Código</b>	<b>Concentración</b>
1	LEML-TvirD10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Trichoderma</i>
2	LEML-TvirD9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Trichoderma</i>
3	LEML-TvirD8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Trichoderma</i>
4	EMZL-TvirD10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Trichoderma</i>
5	EMZL-TvirD9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Trichoderma</i>
6	EMZL-TvirD8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Trichoderma</i>
7	OPL-Tvir D10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Trichoderma</i>
8	OPL-Tvir D9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Trichoderma</i>
9	OPL-Tvir D8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Trichoderma</i>
10	SCPLGL-ThzD10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Trichoderma</i>
11	SCPLGL-ThzD9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Trichoderma</i>
12	SCPLGL-ThzD8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Trichoderma</i>
13	LEML-PchclmD10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Pochonia</i>
14	LEML-PchclmD9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Pochonia</i>
15	LEML-PchclmD8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Pochonia</i>
16	TB2CL-PchclmD10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Pochonia</i>
17	TB2CL-PchclmD9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Pochonia</i>
18	TB2CL-PchclmD8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Pochonia</i>
19	TB1CL-PchctnlaD10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Pochonia</i>
20	TB1CL-PchctnlaD9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Pochonia</i>
21	TB1CL-PchctnlaD8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Pochonia</i>
22	LTrML-PchclmD10	$1 \times 10^{10}$ esporas de <i>Pochonia</i>
23	LTrML-PchclmD9	$1 \times 10^9$ esporas de <i>Pochonia</i>
24	LTrML-PchclmD8	$1 \times 10^8$ esporas de <i>Pochonia</i>
25	TESTIGO	Sin presencia del hongo

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Evaluación de aislados nativos de *Trichoderma* spp. y *Pochonia* spp., por su parasitismo sobre *M. incognita* (Kofoid & White) en condiciones *in vitro*

#### 4.1.1. Prospección, aislamiento e identificación de hongos nematófagos.

En el cuadro 4 se presentan los diferentes sectores muestreados en los 4 cantones de la provincia de Loja, en un rango altitudinal de 165 a 2171 m.s.n.m., en los cuales se recolectó muestras de raíces y suelo de plantaciones de tomate en su fase final, de las cuales se obtuvieron aislados del género *Trichoderma* spp., y *Pochonia* spp., los cuales luego de ser caracterizados morfológicamente fueron identificados taxonómicamente a nivel de género y/o especie con las codificaciones para cada aislado, según se indican en el cuadro 4.

**Cuadro 4. Zonas de muestreo para la obtención de aislados fúngicos para control de *M. incognita*, Loja, 2018**

Procedencia	Sector muestreo	Tipo de suelo	Latitud UTM	Longitud UTM	Altitud msnm	Código	Aislamiento obtenido
Lab.Snd Veg.	La Era - Catamayo	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	1497 msnm	T4ThLE	<i>Trichoderma</i> spp.
Loja-Malacatos	La Era	arcilloso	9533485.41 S	693058.07 E	1497 msnm	LEML-Tvir	<i>Trichoderma viride</i>
						LEML-Pchclm	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
	La Trinidad	Franco-arcilloso	9533485.41 S	693058.07 E	1497 msnm	LTrML-Pchclm	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
						LTRML-T	<i>Trichoderma</i> spp.
Catamayo	El Tambo 2	arenoso	9559178.67 S	682420.01 E	1277 msnm	TB2Cl-Pchclm	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
						TB2CL-T	<i>Trichoderma</i> spp.
	EL Tambo 1	arenoso	9559178.67 S	682420.01 E	1277 msnm	TB1CL-Pchctnla	<i>Pochonia catenulata</i>
Zapotillo	El mango	arcilloso	9515133.36 S	583806.33 E	165 msnm	EMZL-Tvir	<i>Trichoderma viride</i>
Lab.Snd Veg	La Capilla-Catamayo	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	1271msnm	T2TATR166	<i>Trichoderma</i> spp.
	San Miguel Catamayo	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	1.270 msnm	T5TvirC27	<i>Trichoderma</i> spp.
	El Tambo	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	1277 msnm	T3TK T19	<i>Trichoderma</i> spp.
	La Capilla Catamayo	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	1271 msnm	T1TIL15	<i>Trichoderma</i> spp.
Gonzanamá	Sacapalca	Franco-arenoso	9532143.95 S	673670.31 E	2051 msnm	SCPLGL-Thz	<i>Trichoderma harzianum</i>
Loja	Obrapia	Franco	9556783.67 S	698588.74 E	2171 msnm	OPL-Tvir	<i>Trichoderma viride</i>
Lab.Snd Veg.	Taquil	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	2.230 msnm	PCH001	<i>Pochonia</i> spp.
	El Tambo Catamayo	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	1277msnm	PCH002	<i>Pochonia</i> spp.
	Las Orquideas	Medio de cultivo	9553839.91 S	6999497.9 E	920 msnm.	NZO2(S)V	<i>Pochonia</i> spp.

#### **4.1.2. Evaluación de los aislados nematófagos en la fase *in vitro***

En el cuadro 5, se presenta el análisis de varianza de los resultados de parasitismo en huevos y J<sub>2</sub> respectivamente, por parte del hongo nematófago *Trichoderma*. En el parasitismo sobre huevos 12 de los 34 tratamientos no muestran diferencias estadísticas entre sí, mostrando una media superior a 38, de manera general el 36.36% de los aislados demostraron porcentajes superiores a 70 % destacando, los tratamientos T1 y T31 con 87,6 % y 88,8 % respectivamente correspondiente a la mayor concentración. El testigo por su parte con una media de 0, no presentó parasitismo alguno.

En el parasitismo sobre J<sub>2</sub>, 26 de los 34 tratamientos son altamente significativos compartiendo una media superior a 40. De manera general los aislados alcanzaron porcentajes similares en relación al parasitismo sobre huevos, los tratamientos que alcanzaron un parasitismo mayor a 70% son los mismos que presentaron mayor parasitismo en huevos, destacándose tratamientos como el T28 y T29 con un 81,3% y 80%, respectivamente. Todos los tratamientos presentan porcentajes de parasitismo superior al 52% en ambas variables, sin embargo, el testigo (tratamiento con agua) no presentó parasitismo alguno, arrojando porcentajes de 0% con notable diferencia estadística en comparación a los demás tratamientos, encontrándose relación directa en las concentraciones y el nivel de parasitismo.

**Cuadro 5. Parasitismo por *Trichoderma* spp. en huevos de *M. incognita*, en condiciones *in vitro*. Loja. 2018.**

Tto	Código	$\bar{x}$ de hp	Agrupación	%hp	$\bar{x}$ de J <sub>2</sub> p	Agrupación	%J <sub>2</sub> p
1	LEML-TvirD9	43,8	AB	87,6	46,4	ABCD	77,3
2	LEML-TvirD8	36,2	CDEF	72,4	44,4	ABCD	74,0
3	LEML-TvirD7	35,6	CDEF	71,2	44	ABCD	73,3
4	LTRML-Tspp.D9	34,8	CDEFG	69,6	41,2	ABCD	68,7
5	LTRML-Tspp.D8	34,4	CDEFG	68,8	40,6	ABCD	67,7
6	LTRML-Tspp.D7	34	CDEFG	68	39,2	CD	65,3
7	T4ThLED9	34,6	CDEFG	69,2	41,2	ABCD	68,7
8	T4ThLED8	34,2	CDEFG	68,4	41,6	ABCD	69,3
9	T4ThLED7	33,8	CDEFG	67,6	39,8	BCD	66,3
10	TB2CL-Tspp.D9	33,8	CDEFG	67,6	41,2	ABCD	68,7
11	TB2CL-Tspp.D8	33,6	CDEFG	67,2	40,6	ABCD	67,7
12	TB2CL-Tspp.D7	33,4	CDEFG	66,8	40	BCD	66,7
13	EMZL-TvirD9	37,6	BCDE	75,2	44,4	ABCD	74,0
14	EMZL-TvirD8	36,2	CDEF	72,4	43,6	ABCD	72,7
15	EMZL-TvirD7	35	CDEFG	70	42,8	ABCD	71,3
16	T2TATR166D9	34,8	CDEFG	69,6	41,8	ABCD	69,7
17	T2TATR166D8	31,2	EFGH	62,4	41,2	ABCD	68,7
18	T2TATR166D7	30,6	FGH	61,2	40,6	ABCD	67,7
19	T5TvirC27D9	33,4	CDEFG	66,8	42	ABCD	70,0
20	T5TvirC27D8	28,4	GH	56,8	39	CD	65,0
21	T5TvirC27D7	26,2	H	52,4	38,2	D	63,7
22	T3TKT19D9	31,4	DEFGH	62,8	41,4	ABCD	69,0
23	T3TKT19D8	31	EFGH	62	41	ABCD	68,3
24	T3TKT19D7	31	EFGH	62	39,8	BCD	66,3
25	T1TIL15D9	34,8	CDEFG	69,6	41,8	ABCD	69,7
26	T1TIL15D8	34	CDEFG	68	40,8	ABCD	68,0
27	T1TIL15D7	33	CDEFG	66	38,6	CD	64,3
28	OPL-TvirD9	38,8	ABC	77,6	48,8	A	81,3
29	OPL-TvirD8	38,2	ABC	76,4	48	AB	80,0
30	OPL-TvirD7	38	ABCD	76	44,6	ABCD	74,3
31	SCPLGL-ThzD9	44,4	A	88,8	46,6	ABC	77,7
32	SCPLGL-ThzD8	39	ABC	78	43,2	ABCD	72,0
33	SCPLGL-ThzD7	36,6	CDEF	73,2	41,8	ABCD	69,7
34	Tsg	0	I	0	0	E	0,0

Medias con una letra común en cada columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según Tukey ( $p \leq 0.05$ )

En el cuadro 6 se presenta el análisis de varianza del parasitismo en huevos y J<sub>2</sub> para los tratamientos de los aislados del hongo nematófago *Pochonia Chlamydosporia*, los cuales muestran diferencias estadísticas entre tratamientos y en relación al testigo. En el parasitismo sobre huevos, 12 de los 22 tratamientos no presentaron diferencia estadística entre sí, destacando favorablemente con un parasitismo superior a 72 %. De manera general el 57% de los aislados demostraron porcentajes superiores a 70%, destacaron los tratamientos T13 y T16 con 90.8% y 89,6% respectivamente, en la concentración de 1x10<sup>9</sup> son los que más destacan y corresponden a los aislados Tambo 2 y La Trinidad. En el parasitismo sobre J<sub>2</sub>, todos los tratamientos alcanzaron porcentajes bajos en un rango de 14. 7% (T9) a 50.3 (T13), lo cual demuestra que este hongo es altamente selectivo en el parasitismo de huevos de nematodos agalladores, el comportamiento del testigo (tratamiento con agua), para ambas variables, mostró gran diferencia estadística al presentar porcentajes de 0% en el parasitismo de los estadios del nematodo.

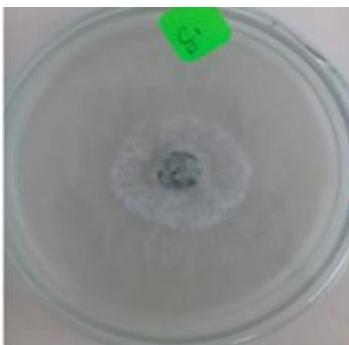
**Cuadro 6. Parasitismo por *Pochonia* spp. en huevos de *M. incognita*, en condiciones *in vitro*. Loja. 2018**

Tto	Código	$\bar{x}$ de hp	Agrupación	%hp	$\bar{x}$ de J <sub>2</sub> p	Agrupación	%J <sub>2</sub> p
1	LEML-PchclmD9	40,6	ABCD	81,2	24,4	ABCD	40,7
2	LEML-PchclmD8	37,6	CDEFG	75,2	22	ABCDEF	36,7
3	LEML-PchclmD7	36,2	DEFG	72,4	20,6	BCDEF	34,3
4	PCH001D9	33,8	DEFG	67,6	24	ABCD	40,0
5	PCH001D8	33,2	EFG	66,4	21,2	ABCDEF	35,3
6	PCH001D7	33	EFG	66	14,6	EFG	24,3
7	PCH002D9	34,8	DEFG	69,6	14,6	EFG	24,3
8	PCH002D8	34,8	DEFG	69,6	13,2	FG	22,0
9	PCH002D7	34,6	DEFG	69,2	8,8	GH	14,7
10	TB2CL-PchclmD9	40,4	ABCD	80,8	25	ABC	41,7
11	TB2CL-PchclmD8	39	ABCDE	78	21,8	ABCDEF	36,3
12	TB2CL-PchclmD7	38,4	BCDEF	76,8	20,4	BCDEF	34,0
13	TB1CL-PchctnlaD9	45,4	A	90,8	30,2	A	50,3
14	TB1CL-PchctnlaD8	40,4	ABCD	80,8	24,4	ABCD	40,7
15	TB1CL-PchctnlaD7	39,8	ABCDE	79,6	23	ABCDE	38,3
16	LTrML-PchclmD9	44,8	AB	89,6	28,8	AB	48,0
17	LTrML-PchclmD8	44,2	ABC	88,4	22,2	ABCDEF	37,0
18	LTrML-PchclmD7	40,4	ABCD	80,8	21,2	ABCDEF	35,3
19	NZO2(S)VD9	34,4	DEFG	68,8	19,6	CDEF	32,7
20	NZO2(S)VD8	31,8	FG	63,6	17,6	CDEFG	29,3
21	NZO2(S)VD7	30,8	G	61,6	15,6	DEFG	26,0
22	Tsgo	0	H	0	0	H	0,0

Medias con una letra común en cada columna no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ ) según Tukey ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.1.3. Caracterización morfológica (Macroscópica y Microscópica de los aislados con mayor capacidad parasítica

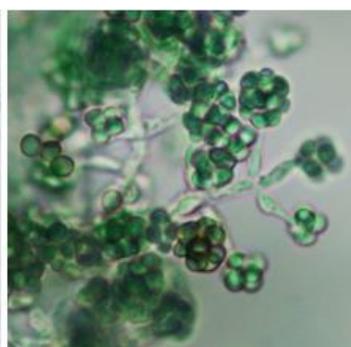
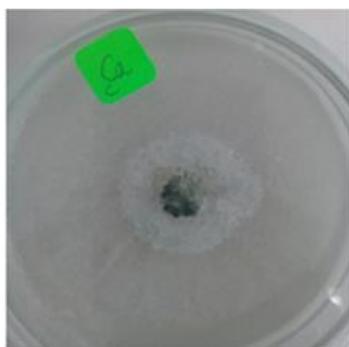
#### 4.1.4. Caracterización morfológica de los aislados de *Trichoderma*



Colonias de aspecto algodonoso, el micelio cubrió la superficie de la caja en 5 días a 28°C en Agar papadextrosa, de color blanco, desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación. Diferenciación

**Figura 5.** Aislado *LEML-Tvir*, (C1) de *Trichoderma* spp.

de anillos concéntricos, hifas hialinas, los conidióforos mostraron ramas laterales pareadas las mismas que forman un ángulo de 90° con respecto al eje de donde surgen, fiálides de forma alargada, algo anchas en el centro y con cuello alargado de color hialino, se observó fiálides individuales mientras que en otros casos se las encontró en grupos de 2 a 3. Los conidios tenían forma ovoidal y mayormente globosa, color verde claro y los bordes lisos se presentaron incrustados en las fiálides a manera de un racimo globoso de umbelas bien definidas y con un tamaño de 3,4 x4 µm.



El aislado logró cubrir la caja en 5 días a 28°C en Agar papadextrosa. Las colonias al inicio formaron pústulas algodonosas de un color blanco, posteriormente se compactaron y esporularon

**Figura 6.** Aislado *EMZL-Tvir* (C2) de *Trichoderma* spp.

tomando un color verde de textura granular. Los aislados no presentaron el olor característico a coco; sin embargo, al inverso de las colonias se puede observar visiblemente una coloración marrón-amarillenta. Conidióforos con ramas laterales que forman un ángulo de 90° con respecto al eje de donde surgen. Fiálides de forma alargada, algo anchas en el centro y con un cuello alargado de

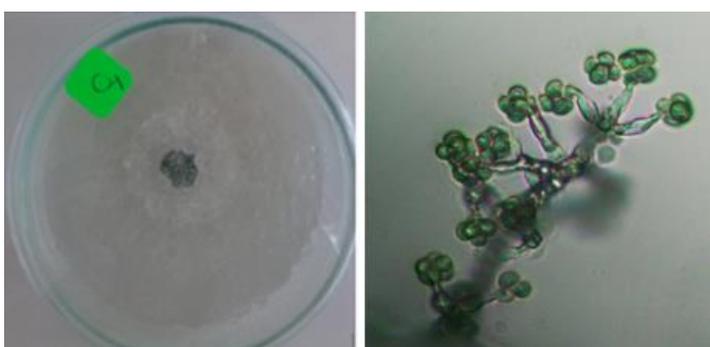
color hialino en grupos de 3. Los conidios de forma globosa de tamaño 3,3 x 4,1, con un color verde claro y los bordes lisos.



**Figura 7.** Aislado **OPL-Tvir** (C3) de *Trichoderma* spp.

Colonias con apariencia aterciopelada en sus etapas tempranas, el micelio presentó un color blanco, eventualmente fue desarrollando un color blanco verdoso hasta una tonalidad verde oliva.

Después de 6 días de incubación a 28°C las colonias presentaron un radio de 9 cm y cubriendo toda la superficie de la caja Petri, densas en el centro y se tornaron ondulatorias en los anillos concéntricos hasta llegar a los bordes. El tamaño de los conidióforos es de 62,5-69 x 3-4,7 µm de color verde, presentan diversas ramificaciones, se observó la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El sistema de ramificación tiene una apariencia piramidal. Fiálides largas y delgadas, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4 µm., verticilos terminales de hasta 4 conidios de un tamaño aproximado de 3x 3,7 µm, con forma subglobosos.



**Figura 8.** Aislado **SCPLGL-Thz** (C4) de *Trichoderma* spp.

Color del micelio blanco, desarrolla un color verde oscuro después de la esporulación. Presentó un tipo de crecimiento regular formando anillos concéntricos, el micelio logró cubrir la superficie de los

medios de cultivo en 5 días a 28°C en Agar papadextrosa. Presentaron hifas hialinas, conidióforos largos con ramificación, fiálides anchas por el centro y alargadas en la base agrupadas piramidalmente, conidios globosos de pared lisa de tamaño 3,3 x 4,1 y abundantes clamidosporas terminales.

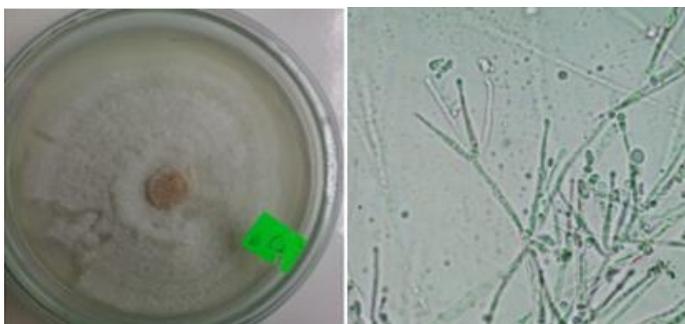
#### 4.1.5. Caracterización morfológica de los aislados de *Pochonia* spp.



**Figura 9. Aislamiento *LEML-Pchclm* (C1) de *Pochonia* spp.**

Las colonias de un color blanquecino ocre con aspecto algodonoso, con el mismo color en el reverso. Crecimiento irregular, llenado de caja alcanzado a los 8 días. A nivel

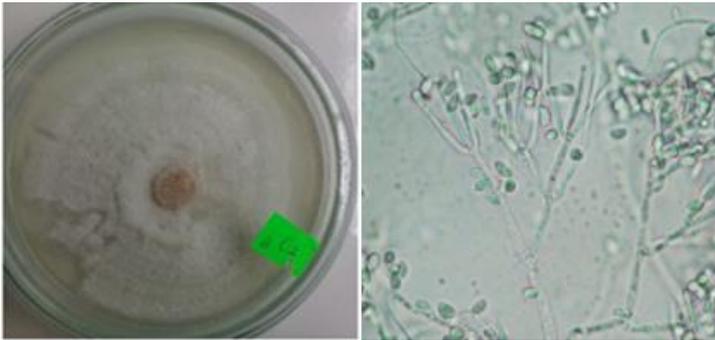
microscópico, conidióforos postrados y poco diferenciados a partir de hifas vegetativas, verticiladas. Las cepas presentan micelio septado, los conidios se producen en cabezuelas globosas, miden 6  $\mu$  de largo por 2,5  $\mu$  de ancho; se evidencio la presencia de clamidosporas con un tamaño que va de 17 a 18  $\mu$ m de diámetro.



**Figura 10. Aislado *TB2CI-Pchclm* (C2) de *Pochonia* spp.**

Las colonias cultivadas en agar son blancas tendientes a un color blanquecino ocre, amarillo y algodonoso, con el mismo color en el reverso. Presento un crecimiento regular con formación de anillos concéntricos de

aspecto algodonoso. Microscópicamente presenta fiálides simples verticiladas de 17-24  $\mu$ m de longitud. Conidios dispuestos en falsas cabezas en el extremo de las fiálides, predominantemente redondos y algunos elipsoidales, de tamaño 2,5-4  $\mu$ m x 2-2,5  $\mu$ m y una relación larga/ancho de 1 a 2,5. Presencia de clamidosporas con tamaño que va desde 15-23  $\mu$ m de longitud y 17-27  $\mu$ m de diámetro.



**Figura 11. Aislamiento TB1CL-Pchctnla (C3) de *Pochonia* spp.**

Las colonias son de color blanco, con micelio sumergido. En medio de cultivo presentan micelio levantado de color amarillento. El micelio maduro, llega a presentarse polvoso de color crema u ocre. Presenta conidióforos erectos, con ramificación verticilada, presentando una protuberancia en forma de mazo en la punta del conidióforo que sostiene una sola espóra; fiálides cilíndricas de 15 – 30  $\mu\text{m}$  de longitud en forma de espiral de 3 a 5  $\mu\text{m}$ .

Las colonias son de color blanco, con micelio sumergido. En medio de cultivo presentan micelio levantado de color amarillento. El micelio maduro, llega a presentarse polvoso de color crema u ocre. Presenta conidióforos erectos, con ramificación verticilada, presentando una protuberancia en forma de mazo en la punta del conidióforo que sostiene una sola espóra; fiálides cilíndricas de 15 – 30  $\mu\text{m}$  de longitud en forma de espiral de 3 a 5  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12. Aislamiento LTrML-Pchclm (C4) de *Pochonia* spp.**

Las colonias son de color blanco tendiente a ocre. En medio del cultivo presentan micelio levantado, de color marrón al reverso de la caja, formación de anillos diferenciados, aspecto general de la colonia achatado. El micelio maduro completamente cubiertos de clamidosporas, llega a presentarse polvoso de color crema. Las cepas poseen una tasa de crecimiento que va desde 0,50 mm/24. A nivel microscópico, los conidióforos son postrados, micelio septado, los conidios de forma elipsoidal miden 5  $\mu$  de largo por 2,5  $\mu$  de ancho, en forma de cadena; se evidenció la presencia de clamidosporas con un tamaño que va de 17 a 18  $\mu\text{m}$  de diámetro.

Las colonias son de color blanco tendiente a ocre. En medio del cultivo presentan micelio levantado, de color marrón al reverso de la caja, formación de anillos diferenciados, aspecto general de la colonia achatado. El micelio maduro completamente cubiertos de clamidosporas, llega a presentarse polvoso de color crema. Las cepas poseen una tasa de crecimiento que va desde 0,50 mm/24. A nivel microscópico, los conidióforos son postrados, micelio septado, los conidios de forma elipsoidal miden 5  $\mu$  de largo por 2,5  $\mu$  de ancho, en forma de cadena; se evidenció la presencia de clamidosporas con un tamaño que va de 17 a 18  $\mu\text{m}$  de diámetro.

#### **4.2. Evaluación de los aislados nematófagos por su acción parasítica sobre *M. incognita* en condiciones de invernadero**

En el cuadro 7, se presenta el análisis estadístico de los aislados de *Trichoderma* spp. y *Pochonia chlamydosporia*, para cada una de las variables analizadas independientemente, en las cuales se observan diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y en relación al testigo, lo cual evidencia la influencia de los aislados en el comportamiento de las plantas de los diferentes tratamientos.

En la variable Altura de planta, los tratamientos inoculados para los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. y *Pochonia chlamydosporia*, presentan un comportamiento similar expresado en la similitud de datos a excepción del testigo, así por ejemplo 11 de los 12 tratamientos inoculados con *Pochonia* no presentaron diferencia estadística, mostrando una estabilidad respecto a las dosis empleadas. Con respecto al efecto en la altura de planta 18 de los 25 tratamientos no presentan diferencia estadística entre sí, en los tratamientos inoculados con el género *Trichoderma* el rango de altura está entre 100 cm y 116.2 cm, destacando el tratamiento T6 con la máxima altura, mientras que para *P. chlamydosporia* el rango de altura va desde 100.6 cm a 116.7 cm, destacando el tratamiento T13 con la máxima altura, en contraste a esto, el testigo (sin inoculación fúngica) presentó el menor dato, alcanzando una altura de 79,2 cm de planta, se evidencia una relación directa entre los valores más altos de altura con las concentraciones más altas de los tratamientos, notándose que aquellos tratamientos inoculados con la concentración más baja  $1 \times 10^8$ ; T24 (100,6) ,T12 (100), T11 (101,9), T9 (102,7), T3 (101,6) T2 (101,7) , presentan una altura menor tendiente a un acercamiento al testigo.

En los datos expuestos en relación a la variable peso de masa foliar, ocho de los 25 tratamientos no presentan diferencia estadística, los cuales corresponden a aquellos que fueron inoculados con altas concentraciones  $1 \times 10^{10}$ , se destacan con valores altamente significativos, los tratamientos T4, T5, T12, T16, T19, T20,

T22, que registran pesos entre 121 g a 129 g, con respecto a los demás tratamientos los resultados presentan diferencia estadística entre sí y en comparación al testigo. El testigo por su lado, alcanzó un peso de 84,4 g siendo el dato más bajo, se observa también que algunos tratamientos presentan datos bajos, indistintamente de los niveles de concentración, notándose influencia del aislado.

En los valores para la variable peso de raíz, 16 de los 25 tratamientos no presentan marcada diferencia estadística entre sí, estos tratamientos responden a los inoculados con las concentraciones más bajas  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^8$  incluyendo el testigo que no presentó inoculación fúngica. En cuanto a la influencia sobre la variable, los tratamientos evaluados alcanzaron promedios entre 30,3 g y 56.6 g, destacando con alta significancia el Testigo 56,6 g (mayor IA) seguido de los tratamientos medianamente significativos T2 (37,6), T3 (40,9), T5(36,9), T6(42,4), T8 (37,4), T8(37,4), T9(39,5) T11(37,6), T12 (39,2), T17 (39,1), T18 (45,2), T21 (40,8), T23 (39,7), T24 (39,7), con valores entre 36.5 a 45.2. Dentro de estos se observa que los tratamientos con menor concentración de inóculo fúngico ( $1 \times 10^8$ ) presentan mayor peso de raíz mostrando un acercamiento al testigo T25 (56,6 g), mientras que los tratamientos inoculados con la mayor concentración de los dos hongos ( $1 \times 10^{10}$ ) presentan el peso de raíz más bajo (peso promedio y normal de raíz).

En la variable Índice de agallamiento, 8 de los 25 tratamientos no presentan diferencia estadística entre sí, mostrando los menores valores en el índice de agallamiento, se observó que aquellos tratamientos que presentan menor índice de agallamiento fueron tratados con las concentraciones altas de  $1 \times 10^{10}$ , destacándose los tratamientos T7, T20 y T19 con IA de 3.8, 4.3 y 4.4 respectivamente, los demás tratamientos alcanzaron IA entre 5.0 y 7.1 mientras que el testigo alcanzó un IA de 9, 4, raíces con alto índice de agallamiento, destacando negativamente. Esto nos muestra que existe una relación directa entre los tratamientos con dosis bajas ( $1 \times 10^8$ ) T3 (7), T5(7), T6(7,6), T17(7), T18 (7,1), T24 (7,1), y los Índices de Agallamiento elevados, presentando estos últimos niveles cercanos al testigo, por la disminución de inoculación.

En la variable población de  $J_2/10$  g de raíz, 5 tratamientos no presentan diferencia estadística entre sí con una J igual compartiendo entre ellos valores notablemente más bajos, los tratamientos presentan un rango entre 43.3  $J_2$  a 107.1  $J_2$ , destacan los aislados de *Trichoderma* T5, T7, T10, T13 y el aislado T16 de *Pochonia*, por presentar las menores poblaciones en los sistemas radicales en contraste con el testigo que presentó una población de 190,8  $J_2/10$  g raíces, siendo el dato más alto, comportamiento similar se observó en los tratamientos inoculados con concentración  $1 \times 10^8$  que presentaron cantidades altas de juveniles superiores a 70  $J_2$ .

En cuanto a la variable población de  $J_2/100$ cc de suelo, en el cuadro 7 se muestra que 6 de los 25 tratamientos no presentan diferencia estadística dentro de estos, el tratamiento más destacable con la menor población (47 $J_2$ ) fue T19, seguido de los tratamientos T16, T13, T20, T22, T4 que registran promedios poblacionales entre 48.9 a 56.3 Juveniles. Los 19 tratamientos restantes incluyendo el testigo se ubican en un rango de 57  $J_2$  a 201,7  $J_2$  por planta, destacando el testigo que registra el valor más alto (201.7  $J_2$ ) así tenemos que los tratamientos con concentración menor registran mayor cantidad de  $J_2$  por 100cc de suelo, evidenciando la influencia de la concentración fúngica y el porcentaje de juveniles.

**Cuadro 7. Evaluación de los aislados nematófagos sobre *M. incognita* en condiciones de invernadero. Loja, 2018.**

Tto	Código	$\bar{x}$ altura de plata (cm)	Agrupación	$\bar{x}$ peso de masa foliar (g)	Agrupación	$\bar{x}$ peso de raíz (g)	Agrupación	IA	Agrupación	J <sub>2</sub> x10 gr de raíz	Agrupación	J <sub>2</sub> x100c de suelo	Agrupación
T1	LEML-TvirD10	107,8	ABCDEF	118,6	CDEFG	34,9	CDEF	5,2	FGHIJ	66	GHIJ	92,4	CDE
T2	LEML-TvirD9	101,7	DEF	116,3	DEFGH	37,6	BCDEF	6,4	BCDEFG	86,1	CDEF	99,3	BCD
T3	LEML-TvirD8	101,6	DEF	109,8	HIJK	40,9	BCDE	7	BCD	90,7	BCDE	104,2	BC
T4	EMZL-TvirD10	114,6	AB	127	AB	35,2	CDEF	4,6	HIJ	73,7	DEFGHI	56,3	JKL
T5	EMZL-TvirD9	108	ABCDEF	123,5	ABCD	36,9	BCDEF	7	BCD	58,9	IJK	70,6	GHIJ
T6	EMZL-TvirD8	106,8	ABCDEF	115,3	EFGHI	42,4	BC	7,6	BC	90,2	BCDE	99	BCD
T7	OPL-Tvir D10	116,2	A	114,9	EFGHIJ	33,5	CDEF	3,8	J	43,3	K	78,6	EFGH
T8	OPL-Tvir D9	109,1	ABCDEF	113	FGHIJ	37,4	BCDEF	5	GHIJ	59,1	IJK	109,4	B
T9	OPL-Tvir D8	102,7	BCDEF	104,8	K	39,5	BCDEF	5,6	DEFGHI	64,9	HIJ	114	B
T10	SCPLGL-ThzD10	106,6	ABCDEF	118	DEFG	34,4	CDEF	5	GHIJ	56,2	IJK	70,2	GHIJ
T11	SCPLGL-ThzD9	101,9	CDEF	111,4	GHIJK	37,6	BCDEF	6,4	BCDEFG	78,1	CDEFGH	87,5	DEF
T12	SCPLGL-ThzD8	100	F	107,4	JK	39,2	BCDEF	6,9	BCDE	91,6	BCD	104,9	BC
T13	LEML-PchclmD10	116,7	A	129	A	30,3	F	5,3	EFGHIJ	43,2	K	51,1	KL
T14	LEML-PchclmD9	112,8	ABCD	117,7	DEFG	36,5	BCDEF	6,7	BCDEF	69,2	FGHI	64,3	HIJK
T15	LEML-PchclmD8	112,4	ABCDE	115,2	EFGHI	41,8	BCD	8	AB	83,7	CDEFG	81,8	EFG
T16	TB2CL-PchclmD10	113,3	ABCD	124	ABCD	33,7	CDEF	6,6	BCDEFG	50,3	JK	48,9	KL
T17	TB2CL-PchclmD9	110	ABCDEF	120,4	BCDEF	39,1	BCDEF	7	BCD	65,2	HIJ	57,9	IJKL
T18	TB2CL-PchclmD8	108,3	ABCDEF	117,1	DEFGH	45,2	B	7,1	BCD	72,5	EFGHI	107,8	BC
T19	TB1CL-PchctnlaD10	115,9	A	126,2	ABC	31,2	EF	4,4	IJ	77,4	CDEFGH	47	L
T20	TB1CL-PchctnlaD9	114,2	AB	121,9	ABCDE	35	CDEF	5,1	FGHIJ	67,5	GHIJ	55,2	JKL
T21	TB1CL-PchctnlaD8	108,9	ABCDEF	119	CDEFG	40,8	BCDE	6	CDEFGH	93,3	BC	72,1	FGHI
T22	LTrML-PchclmD10	113,7	ABC	126,8	AB	32	DEF	4,3	IJ	86,7	CDEF	55,8	JKL
T23	LTrML-PchclmD9	110,5	ABCDEF	118,7	CDEFG	35,3	BCDEF	5,5	DEFGHI	106,5	B	70,9	GHIJ
T24	LTrML-PchclmD8	100,6	EF	108,3	IJK	39,7	BCDEF	7,1	BCD	107,1	B	110,7	B
T25	TESTIGO	79,2	G	84,4	L	56,6	A	9,4	A	190,8	A	201,7	A

Medias con una letra común en cada columna no son significativamente diferentes según Tukey ( $p \leq 0.05$ ). El recuadro coloreado muestra para cada variable analizada los valores altamente significativos con una letra igual.

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Evaluación de los aislados de hongos nematófagos *Trichoderma* spp. y *Pochonia* spp., en condiciones *in vitro*.

#### 5.1.1. Prospección

La prospección realizada en la provincia de Loja que se presenta en el cuadro 4 permitió obtener 4 aislados pertenecientes al género *Trichoderma* y 4 aislados del género *Pochonia*, en muestras de los cantones Zapotillo, Loja, Catamayo y Gonzanamá, en un rango altitudinal de 165 a 2171 m.s.n.m. El género *Trichoderma* fue encontrado en La Era cantón Loja, Sacapalca cantón Gonzanamá y Obrapia cantón Loja, sectores con diferentes tipos de suelos, pisos altitudinales y clima; estos resultados son concordantes con Rodríguez (1990) citado por Martínez (2013) quien informó que *Trichoderma* se encuentran presente en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Samuels, 2010). Al respecto, Woo *et al.* (2006) menciona que se pueden obtener cepas de *Trichoderma* spp., en praderas, bosques, desiertos y en suelos de diferentes zonas climáticas; y, en un rango de pH desde 5,5 a 8,5 aunque los valores óptimos se encuentran entre 5,5-6,5, en suelos con óptimo de 60% de la capacidad de retención de humedad (Besoain, 2005).

Los aislados del género *Pochonia* spp., obtenidos de las mismas muestras de suelos y raíces en las cuatro zonas de la provincia de Loja, con condiciones edáficas y climáticas similares a las referidas para los aislados de *Trichoderma* en el cuadro 4. Esta especie está referida como un parásito facultativo que habita en forma natural en suelos supresivos (Kerry, 2004; Manzanilla-López, 2017). Los resultados son coincidentes con las investigaciones referidas por Hidalgo-Díaz (2000) quien realizó una prospección en suelos las dos principales regiones de Cuba, una seca y cálida al Este (con temperaturas de 28°C a 32°C y con 82 m s. n. m.) y la otra húmeda y fría al centro del país con temperaturas (con 21°C a 26°C y con 125 m s. n. m) e identificó *Pochonia chlamydosporia* var.

*Chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare; *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron & Onions) Zare y Gams; y *Pochonia suchlasporium*. Otros estudios realizados por Hidalgo-Diaz (2013) afirman que la mayor frecuencia de aislamientos de *P. chlamydosporia* se encuentran en hábitats poco perturbados y ricos en materia orgánica. En Ecuador se reportan resultados de aislados de *P. chlamydosporia* en sistemas agrícolas de la provincia de Loja y Zamora Chinchipe (Solano *et al.*, 2014; Castillo y Medina, 2014; Duarte, 2015).

### **5.1.2. Evaluación *in vitro* de los aislados de *Trichoderma* spp.**

Los resultados del bioensayo para la evaluación de la efectividad parasítica de los aislados de *Trichoderma* sobre huevos y larvas de *M. incognita* en condiciones *in vitro* (cuadro 5) mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos. El parasitismo en huevos demostró elevados porcentajes de efectividad superiores a 70 %, los más destacables fueron T1 y T31 con 87,6 % y 88,8 % respectivamente, mientras que el testigo no presentó parasitismo. Los resultados confirman la efectividad biorreguladora de *Trichoderma* contra nematodos del género *Meloidogyne* por medio de sus mecanismos físicos y químicos mediante hifas y enzimas (Talavera *et. al*, 2014). *Trichoderma* parasita al fitopatógeno mediante enrollamiento, ganchos y cuerpo de tipo apresorio, que penetran la pared celular por acción hidrolítica de las enzimas quitinasas y glucanasas (Zeilinger y Omann, 2007). Este hongo produce enzimas capaces de degradar la cutícula de los insectos constituida de quitina, teniendo en cuenta que la quitina también está presente en la cutícula de los huevos de nematodos (El huevo de *Meloidogyne* presenta una capa vitelina externa, una capa media de quitina y una capa interna de glicolípidos) y también en menor cantidad en J<sub>2</sub> (Bokhari, 2009; Jin 2005); Además, los estudios realizados por Sharon *et al* (2007, demuestran que las enzimas extracelulares tales como quitinasas y proteasas con actividad antifúngica participan en la interacción de *M. javanica* y *Trichoderma* spp. ( Jin 2005; Bokhari, 2009).

El parasitismo de los aislados sobre sobre J<sub>2</sub> (cuadro 5) presentó porcentajes similares en relación al parasitismo sobre huevos, los tratamientos más destacables que alcanzaron un parasitismo mayor a 70 % son los mismos que presentaron mayor parasitismo en huevos, que corresponden a las

concentraciones más altas  $1 \times 10^9$ , destacando el T28 y T29 con un 81,3 % y 80 %, respectivamente, ambos tratamientos pertenecientes a la cepa proveniente de Sacapalca y en concentraciones de  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^8$ . Estos resultados se deben a la gran capacidad de las especies nematófagos del género *Trichoderma* para producir antibióticos volátiles y no volátiles (Howell, 2003). Al respecto, Pérez *et al.*, (2006) afirman que *Trichoderma* spp., es un biorregulador efectivo contra nematodos del género *Meloidogyne* por acción de sus enzimas e hifas. Además, Las cepas de *Trichoderma* se diferencian entre sí por los niveles de expresión de las enzimas hidrolíticas, lo cual determina sus características antagónicas (Reyes *et al.*, 2002; Howell, 2003; Zeilinger, 2007). Por otra parte, hay evidencias que algunas cepas de *T. harzianum* Rifai, pueden afectar a los nematodos formadores de agallas de dos modos: parasitismo directo sobre  $J_2$  y por la producción de metabolitos tóxicos (Spiegel *et al.*, 2005; Sharon *et al.*, 2011; Martínez *et al.* 2013).

A manera de conclusión, los resultados del estudio concuerdan con lo planteado por otros autores (Sharon, 2007; Hernández, 2014), quienes informan que *Trichoderma* spp., posee la habilidad de parasitar diferentes estadios del ciclo de vida de *Meloidogyne*, al interactuar con  $J_2$ , hembras y huevos e interfiriendo en el proceso de reproducción; además, el efecto de las enzimas y metabolitos de *Trichoderma* sobre nematodos pueden ocurrir en el suelo, en el interior de las raíces o sobre la superficie de esta (Castillo-Algarate, 2014).

### **5.1.3. Evaluación *in vitro* de los aislados de *Pochonia* spp.**

Los resultados del bioensayo para la evaluación de la efectividad parasítica de los aislados de *Pochonia* sobre huevos y larvas de *M. incognita* en condiciones *in vitro* (cuadro 6) mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos. La mayor parte de los tratamientos evidenciaron porcentajes de efectividad superiores a 70%, los mejores son T13 y T16 con 90.8% y 89,6% respectivamente con la concentración de  $1 \times 10^9$ , mientras que el parasitismo sobre  $J_2$  de los mismos aislados de *P. chlamydosporia* alcanzaron porcentajes bajos en todos los tratamientos en un rango de 14. 7% (T9) a 50.3 (T13). Al respecto, se han realizado varios estudios relacionados con el parasitismo de *Pochonia* spp., sobre nematodos formadores de quistes (López-Llorca y

Claugher, 1990; López-Llorca y Robertson, 1992) y sobre especies de nematodos agalladores de la raíz (Manzanilla-López *et al.*, 2017). Los resultados obtenidos confirman el potencial de *P. chlamydosporia* como agente de control biológico en huevos de *Meloidogyne* spp., mediante varios mecanismos de acción parasítica tales como a) hifas las que en contacto con el huevo forman una red de anastomosis, b) a través de enzimas secretadas *in situ* por el hongo que debilitan la cáscara del huevo antes de que penetren las hifas vegetativas, c) por medio de un apresorio seguido de una hifa de penetración que perfora la cáscara de huevo y forma un bulbo de infección (López-Llorca y Robertson 1992; Kumar *et al.*, 2012; Manzanilla-López *et al.*, 2017); d) a través de enzimas extracelulares que facilitan el parasitismo de los huevos de nematodo y no depende únicamente de la formación del apresorio. Además, se informa que la colonización de *Pochonia chlamydosporia* sobre huevos le permite obtener nutrientes, especialmente los azúcares disponibles en el huevo como fuente de carbono, la trehalosa por ejemplo, está disponible en la cáscara del huevo y en menor cantidad en los juveniles, que tiene como función la protección de nematodos contra la desecación, en condiciones de anhidrobiosis garantiza la latencia juvenil (Wharton, 2011).

Las razones expuestas explican la selectividad de *Pochonia* para parasitar huevos de *Meloidogyne* spp., y en menor cantidad en los juveniles J<sub>2</sub>; así, por ejemplo, filtrados fúngicos de *P. chlamydosporia* provocaron una mortalidad de J<sub>2</sub> del 13% aproximadamente en *M. javanica* (Ayatollahy *et al.*, 2008); mientras que otro estudio con el filtrado de *P. chlamydosporia* causó una mortalidad del 60% en *M. javanica* J<sub>2</sub> después de 48 h de exposición (Shamim *et al.*, 2012). Esta variabilidad parasítica sobre estados juveniles J<sub>2</sub>, puede ser atribuida a las diferencias de efectividad intraespecíficas de los aislados y las concentraciones de esporas utilizadas, en todo caso los porcentajes de parasitismo en J<sub>2</sub> siempre son inferiores al parasitismo sobre huevos.

#### **5.1.4. Caracterización morfológica y determinación taxonómica**

Con respecto a la caracterización morfológica de las mejores cepas se logró determinar que cuatro aislados corresponden al género *Trichoderma*, y cuatro aislados al género *Pochonia* características concuerdan con las claves taxonómicas referenciadas (Gams y Zare, 2001; Luangsa *et al.*, 2011). Debido a

que las características morfológicas macroscópicas y microscópicas son variables, no permiten discriminar entre especies con seguridad.

Para la identificación morfológica tanto macroscópica como microscópica, la descripción resultante de los aislados evaluados del género *Trichoderma* coinciden con las descripciones generales hechas por Harman (2001) y Samuels (2006) quienes describen al género *Trichoderma* con conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, de rápido desarrollo en medios sintéticos. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales que, son unicelulares, pero pueden unirse entre dos o más. Estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas.

En cuanto a la morfología macroscópica las cepas presentan poca variación entre ellas, Aunque las cepas no son de la misma localidad presentaron pigmentación similar, tal es el caso de C1 Y C2 y C4. Las cepas c1, c2 y c4 presentaron de 2 a 3 anillos más marcados, concéntricos bien definidos, con una coloración blanca (micelio) bien distintiva y verdes (conidios). Estos aislados mostraron la formación típica de anillos concéntricos, cubrió totalmente la caja a los 5 días de observación, lo cual concuerda con descripciones realizadas por otros autores sobre este hongo (Chaverri *et al.*, 2003; Jaklitsch, 2015). A los cinco días tomó una tonalidad verde oscura, de aspecto granular abundante, registro concordante con lo enunciado por Acurio (2016) *Trichoderma viride* esporulo tomando un color verde de textura granular, con conidióforos ramificados visibles alrededor de la pústula. Los aislados no presentaron el olor característico a coco; sin embargo, al inverso de las colonias se puede observar visiblemente una coloración marrón - amarillenta. La cepa C3 presentó pigmentación más tenue y opaca en tono blancos, las colonias tuvieron apariencia aterciopelada en sus etapas tempranas, el micelio presentó un color blanco sin embargo eventualmente fue desarrollando un color blanco verdoso hasta verde oliva, la colonia no presentó gran elevación en comparación a las C1 C2 C4, tuvo un aspecto aplanado. Después de 5 días de incubación a 28°C las colonias presentaron un radio de 9 cm y cubriendo toda la superficie de la caja Petri y fueron densas en el centro y se tornaron ondulatorias en los anillos.

Todas las características mencionadas anteriormente fueron comparadas con las descripciones realizadas por Gams y Bissett,(1998), así como también por las descritas por (Samuels *et al.*, 1998, 2006), mismas que concuerdan y corresponden a la especie de *Trichoderma harzianum*, así mismo estudios describen que las colonias de *T. harzianum* (Rifai), crecen y maduran rápidamente a los cinco días de incubación en medio de cultivo agar de dextrosa y papa (PDA) a 25°C. (Pandey y Tewari, 1990 ; Samuels, 2006)

La observación microscópica muestra en la C1, C2 C4, hifas hialinas, conidióforos largos con ramificación, fiálides anchas por el centro y alargadas en la base agrupadas piramidalmente, conidios globosos de pared lisa con un tamaño 3,3 a 4,1 y abundantes clamidosporas terminales, características que revelan un acercamiento a *Hypocrea perteneciente al anamorfo de T.viride* según (Chaverri y Samuels, 2002; Druzhinina y Kubicek, 2005). Todo lo anteriormente descrito fue comparado con las claves de identificación taxonómicas tanto de (Samuels *et al.*, 1996) como de (Gams y Bissett, 1998) y concuerdan con la especie *Trichoderma viride*.

En la Figura 7 cepa C3 presentó conidios ligeramente ovoides, dispuestas en roseta en grupos de 4 a 6, clamidosporas abundantes y globosas, hifas hialinas alargadas perpendiculares conidióforos ramificados de color verde, presentan diversas ramificaciones perpendiculares, en algunos casos se observa la formación de ramas laterales en grupos de dos a tres, ubicadas en un ángulo amplio. El tamaño de sus conidios va de 2,7-3,4 µm de diámetro, sus fiálides presentan un tamaño que va desde 6 X3 µm. la mayoría generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes) con presencia de clamidosporas. Esta descripción se asemeja la dada por Bissett (1991) y Hoog (2000) que describe a *Trichoderma Harzianum* con un sistema de ramificación que tiene una apariencia piramidal. Las fiálides son largas y delgadas, solitarias a lo largo del eje, asimétricas, con un tamaño de 6,3-15,6 x 2,7-3,4 µm., con verticilos terminales de hasta 4 conidios de un tamaño aproximado de 3,8-4 x 3,1-3,7 µm, con forma citriforme y subglobosos. Sus Clamidosporas son intercalares y formadas por el micelio sumergido, subglobosos, de pared dentada, color verde suave y un tamaño de 12,5-10 µm. como resultado entre *T. harzianum* y *T. viride*

concluimos que es el arreglo de conidios, ya que *T. harzianum* presenta cabezas conidiales y paredes poco más lisas y conidios de mucho menor tamaño que *T. viride*.

Para los aislados de *Pochonia* spp., en la caracterización macroscópica, las colonias fueron similares, presentaron formación de anillos diferenciados a excepción de la cepa 3 su crecimiento se dio de manera irregular. Las cepas alcanzaron una altura de 2 mm, la coloración de todas las cepas fue blanquecina con tonos ocre y amarillentos, al reverso de la caja se observó una tonalidad central amarillo-marrón su crecimiento es relativamente lento que va de 0.5 mm cada 24 horas. Observaciones coincidentes con lo descrito por Hidalgo (2013) las colonias de *Pochonia chlamydosporia*, en agar son de color blanco o blanquecino a amarillo ocre y algodonoso. Es un hongo de crecimiento relativamente lento que alcanza hasta 0,3 cm por día según la incubación temperatura ambiente.

Microscópicamente presenta fiálides simples verticiladas de 17-24  $\mu\text{m}$  de longitud, 2-2,5  $\mu\text{m}$  en la base y en el extremo de 0,5  $\mu\text{m}$ . en cuanto a la C1, C2, C3 presentaron conidios dispuestos en falsas cabezas en el extremo de las fiálides, predominantemente redondos y elipsoidales de tamaño 3-4  $\mu\text{m}$  x 2-2,5  $\mu\text{m}$ . Presencia de clamidosporas con tamaño que va desde 15-23  $\mu\text{m}$  de longitud y 17-27  $\mu\text{m}$  de diámetro estas descripciones coincidieron con la realizada por Hidalgo-Díaz (2000) para aislamientos cubanos *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia*. La C4, en contraste a esto, presentó conidios dispuestos en cadenas de forma globosos y subglobosos (Zare *et al.*, (2001), indicaron que los conidios en *P. chlamydosporia* var. *catenulata* son globosos a subglobosos y dispuestos en cadenas; mientras que, los de la var. *chlamydosporia*, son más elipsoidales y dispuestos en falsas cabezas. No obstante, estos autores consideraron que la disposición de conidios en cadenas o falsas cabezas, no tienen el peso suficiente para la separación en especies diferentes y las mantienen como variedades. (Hidalgo,2013)

Así tenemos que, las características morfológicas pueden variar entre un aislado y otro. Por tal razón, la ubicación taxonómica de las especies resulta difícil cuando se emplean solo aspectos morfológicos y en la actualidad se usa las

herramientas moleculares para la identificación correcta de las especies a nivel de género (Chaverri y Samuels, 2003; Stocco, 2014).

## **5.2. Selección de aislados nematófagos *Trichoderma* spp., y *Pochonia* spp., sobre *M. incognita* (Kofoid & White) en condiciones de invernadero**

Los resultados del cuadro 7, muestran diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y en relación al testigo, lo cual evidencia la influencia de los aislados en el comportamiento de las plantas de los diferentes tratamientos.

**ALTURA DE PLANTA.** La variable Altura de planta, para los diferentes aislados de *Trichoderma* spp. y *Pochonia chlamydosporia*, presenta un comportamiento similar expresado en la similitud de datos, así por ejemplo para *Trichoderma* spp. el rango de altura está entre 100 cm y 116.2 cm, destacando el tratamiento T6 con la máxima altura, mientras que para *P. chlamydosporia* el rango de altura va desde 100.6 cm a 116.7 cm, destacando el tratamiento T13 con la máxima altura, sin embargo, el testigo que no presento inoculación alcanzó una altura de 79,2 cm de planta; se evidencia una relación directa entre los mayores valores de altura con las concentraciones más altas de los tratamientos. Estos resultados obtenidos se sustentan con lo referido por Windham *et al.*, (1986), quienes afirman que *Trichoderma* produce un factor regulador de crecimiento sobre plantas de tomate, tabaco y rábano. Por su parte, Sharon (2007) sugiere que la promoción del desarrollo se debe a que *Trichoderma* tiene la capacidad de solubilizar el manganeso sin importar el pH del medio ni la disponibilidad del mismo. Estos autores señalan que este microelemento es requerido para varias funciones fisiológicas, tales como la fotosíntesis, el metabolismo del nitrógeno y la síntesis de los compuestos aromáticos como precursores de aminoácidos y hormonas, de fenoles y de lignina; resaltando que el Manganeso juega un papel importante en el crecimiento y la resistencia a enfermedades de las plantas.

La acción similar de *Pochonia* sobre esta misma variable, se sustenta con lo referido por (Monteiro, 2013), quien sostiene que este hongo protege a la planta contra la acción del nematodo en la rizosfera y tiene la capacidad de colonizar las raíces. Además, el hongo promueve el crecimiento de las plantas al aumentar la absorción de nutrientes, por ejemplo *P. chlamydosporia* aumenta hasta en un

24.5% la absorción de fósforo por la planta por su capacidad para solubilizar este nutriente, lo cual puede llevar a una cascada de beneficios para la planta, por ejemplo, mejora el crecimiento y reduce el tiempo de floración y producción (Zavala-Gonzalez *et al.*, 2015). Otros estudios relacionados, demuestran que se produjo un aumento del crecimiento con una sola aplicación de un aislado nativo de *P. chlamydosporia* en la concentración de  $5 \times 10^3$  clamidosporas/g suelo) para reducir el número de *R. reniformis* en raíces de algodón y suelo bajo condiciones de invernadero (Wang *et al.*, 2005). Sin embargo, se produjo un efecto negativo en el crecimiento de la planta de papa cuando el hongo y *M. incognita* se inocularon simultáneamente (Manzanilla-López *et al.*, 2011).

**PESO DE MASA FOLIAR.** En esta variable agronómica los resultados expuestos (cuadro 7) presentan diferencia estadística entre tratamientos y en comparación al testigo cuyo peso alcanzado fue de 84,4 g. Todos los aislados se ubican en un rango de 108 g a 129 g por planta, se destacan con valores altamente significativos, los tratamientos T4, T5, T12, T16, T19, T20, T22, que registran pesos entre 121 g a 129 g, con la concentración más alta de  $1 \times 10^{10}$ , los más destacados son T4 (*Trichoderma*) y T13 (*Pochonia*). Los resultados coincidieron con los obtenidos por (Preethi *et al.*, 2016) quienes informaron que en los tratamientos donde se aplicó *T. harzianum* se produjeron incrementos en la masa fresca y seca total de las plantas al comparar el agente biológico con el control. En cuanto a *P. chlamydosporia* promueve el crecimiento de las plantas al aumentar la absorción de nutrientes. Por ejemplo, *P. chlamydosporia*, mejora el crecimiento y reduce el tiempo de floración, para que la planta se vuelva productiva, por ende, el crecimiento vegetal provoca un mayor peso de masa foliar (Zavala-Gonzalez *et al.*, 2015; Manzanilla- López, 2017).

**PESO DE RAIZ.** Los datos para la variable peso de raíz (cuadro 7) se demuestra que los aislados incidieron en el desarrollo del sistema radical con diferencias significativas entre los tratamientos y en comparación al testigo. Todos los aislados evaluados alcanzaron promedios entre 30,3 g y 56.6 g, destacando con alta significancia el Testigo T25 que obtuvo un peso de raíz de (56,6 g), y se observa que los tratamientos inoculados con la mayor concentración presentan el peso de raíz más bajo, lo cual se explica porque a mayor concentración de

esporas existe mayor porcentaje de control tanto de huevos como de larvas que incide en una disminución del nivel de agallamiento y volumen de tejidos; mientras que los tratamientos con menor concentración de inóculo fúngico presentan el mayor peso de raíz, debido al incremento de masa y volumen de tejidos (hiperplasias) provocados por los nematodos formadores de agallas. Estos resultados se afirman sobre lo enunciado por Taylor y Sasser (1978), quienes refieren que inicialmente las raíces infectadas con *Meloidogyne*, presentan mayor peso debido a la presencia de agallas y nudosidades, posteriormente, las raíces comienzan su proceso de descomposición, deshidratación y se inhibe el crecimiento de nuevas raíces, reduciéndose su peso al estar mayormente parasitadas. Al respecto, estudios realizados por Karszen y Moens (2006) demuestran que las agallas están formadas por el conjunto de células gigantes como consecuencia de una hipertrofia e hiperplasia celular, los vasos de la xilema se bloquean e inducen la multiplicación de nuevas células corticales aumentadas en tamaño y número, produciéndose la agalla. El tamaño de la agalla está relacionado con la planta hospedante, número de juveniles J<sub>2</sub> y la especie; además, la invasión a las raíces ocurre con los estados juveniles, la migración intercelular y alimentación de células gigantes (Caillaud *et al.*, 2008; Marín, 2012).

**ÍNDICE DE AGALLAMIENTO.** En la variable Índice de agallamiento, se observó que los tratamientos presentan menor índice de agallamiento con las concentraciones altas de  $1 \times 10^{10}$ , con diferencias estadísticas significativas entre tratamientos y en relación al testigo, sobresalen con la misma significancia los tratamientos T7, T20 y T19 con IA de 3.8, 4.3 y 4.4 respectivamente, destacando de entre ellos con el menor IA el T7 correspondiente a *Trichoderma*, concentración  $1 \times 10^{10}$  con una reducción de 42,2% con relación al testigo, los demás tratamientos se ubican en un rango de 4.3 a 7.6 con promedio de 6.0. Los resultados relativamente elevados de IA, podrían ser explicados de manera general, por la elevada población de inóculo del nematodo (3000 J<sub>2</sub>/planta), al reducido número de aplicaciones y a la frecuencia de aplicación de los inóculos fúngicos (al momento del trasplante y 41 días después del trasplante), lo cual probablemente permitió a la población de nematodos sobrevivientes de la primera aplicación un segundo ciclo reproductivo e incremento poblacional. Los

aislados con mayor efectividad con seguridad poseen una gran capacidad parasítica y acción endofítica en el sistema radicular y están dentro de los intervalos informados en diversos trabajos para estas especies de hongos (Hashem, 2011; Vigiano, 2014). Estudios similares realizados con *T. harzianum*, (Santana *et al.*, 2016) lograron reducir el índice de agallamiento en 53,5%. En cuanto a los aislados de *P. chlamydosporia*, estos redujeron el índice de agallamiento hasta en un 54,3% con aislado más Pch-001.

**POBLACION DE J<sub>2</sub> X10 g DE RAICES.** En la variable población de J<sub>2</sub>/10 g de raíz, los tratamientos presentan un rango entre 43.3 J<sub>2</sub> a 107.1 J<sub>2</sub>, los tratamientos con mayor significancia estadística fueron T5, T7, T10, T13, T16 por presentar las menores poblaciones en los sistemas radicales en contraste con el testigo que presentó una población de 190,8 J<sub>2</sub>/ 10 g raíces. Estos resultados se deben según (Jiram *et al.*, 2018) a que los hongos producen compuestos nematicidas o nematostáticos que ayudan a regular densidades de nematodos en el suelo, además el hongo se alimenta de los exudados de las raíces, las raíces son protegidas por el hongo y al mismo tiempo reducen o eliminan las fuentes de alimento para las J<sub>2</sub> de *Meloidogyne*, impidiendo el ingreso del nematodo a la raíz, variando este tipo de protección según la especie de *Trichoderma* (Howell, 2003).

Sobre este mismo tema, Baños *et al.*, (2010) obtuvo una reducción significativa del grado de infestación de *Meloidogyne* spp., con reducciones de 2.0 y 1.94 grados a los 80 días después del trasplante, usando *T. viride* y *T. harzianum*; trabajos similares utilizando fórmulas comerciales de dos cepas de *T. virens* (Jiram *et al.*, 2018) obtuvieron efectos supresores que oscilaron de 87 a 89.14% en la disminución de huevos por un gramo de raíz, lo cual incide en una disminución directa de J<sub>2</sub> y el IA. Solano *et al.*, (2014) en trabajos realizados para control biológico del nematodo *M. incognita* con aislados de *Trichoderma* y *Pochonia*, obtuvieron una reducción entre 45,8% para PI-002 y 65,6% para Pch005. De igual manera, el trabajo realizado por Camacho *et al.*, (2007) permitió demostrar que, el hongo provee el control de la población del nematodo al parasitar los huevos y reducir significativamente la multiplicación de las generaciones subsecuentes del nematodo, con registros de cero eclosiones debido a la presencia de *P. chlamydosporia* entre los restos de la matriz

gelatinosa adherida a los huevos, el cual posiblemente colonizó a los huevos desde etapas tempranas del desarrollo embrionario.

**POBLACIÓN DE J<sub>2</sub>/100CC DE SUELO.** En cuanto a la variable población de J<sub>2</sub>/100cc de suelo, los resultados presentan diferencia estadística entre tratamientos y en comparación al testigo. Todos los aislados se ubican en un rango de 47J<sub>2</sub> a 109,4 J<sub>2</sub> por planta, el tratamiento de mayor significancia estadística con la menor población (47J<sub>2</sub>) fue T19 con concentración  $1 \times 10^{10}$ , el testigo, por su parte registra el valor más alto (201.7 J<sub>2</sub>). Los resultados obtenidos se afianzan en trabajos similares (Howell, 2003) que sostienen que la acción nematófaga de los *Trichoderma* se basa principalmente en parasitar los huevos y así reducir significativamente la multiplicación de las generaciones subsecuentes del nematodos; estudios relacionados con *P. Chlamydosporia* confirman que, cuando este hongo se libera en el suelo, está expuesto a los factores abióticos fluctuantes en el campo produciendo una eficacia a largo plazo (Mananilla-Lopez,2017). Un estudio ha demostrado que cuando el hongo se aplica a un suelo estéril días antes del cultivo de tomate y del nematodo, hay un mejor control (Olinda, 2014). La explicación detrás de esto es que el hongo tiene más tiempo para colonizar el suelo y parasitar el nematodo en ausencia del huésped (Manzanilla-López, 2017). Diferentes investigaciones sobre las poblaciones de J<sub>2</sub> en suelo, confirman el beneficio que produce la reducción de J<sub>2</sub> a nivel de campo: Salazar *et al.*, 2013 sostiene que Una Pi mayor a los 620 nematodos/100 g de suelo redujeron el rendimiento a menos de 1,02 kg de frutos por planta, lo que ocasiona pérdidas económicas.

A modo de discusión final, se piensa que el potencial enzimático de *Trichoderma* spp. y *Pochonia* spp. para detener el proceso infeccioso de los patógenos es mucho mayor de lo que se describe, pues sólo el hongo *Trichoderma* secreta más de 70 metabolitos, entre ellos sustancias estimuladoras del crecimiento y desarrollo de las plantas (Howell, 2003). De la misma manera, *P. chlamydosporia* es un hongo específico de huevos, pero en condiciones de campo no es dependiente de manera vital de los huevos de nematodos para su nutrición, ya que se puede asociar a diversos sustratos como quitina, celulosa, oosporas fúngicas y huevos de babosas, así como es capaz de vivir y proliferar en las raíces de las plantas (López-Llorca *et al.*, 2002; Manzanilla-López, 2017).

## 6. CONCLUSIONES

- La fase de prospección permitió obtener cuatro aislados del género *Trichoderma* spp. (*LEML-Tvir*, *EMZL-Tvir*, *OPL-Tvir* correspondientes a *Trichoderma viride* y una *SCPLGL-Thz* correspondiente a *Trichoderma harzianum*) y cuatro aislados del género *Pochonia* spp. (*TB2Cl-Pchclm*, *TB2Cl-Pchclm*, *LTrML-Pchclm*, correspondiente a *P. chlamydosporia* var. *chlamydosporia* y *TB1CL-Pchctnla* correspondiente a *P. chlamydosporia* var. *catenulata*) interactuando en los sistemas radicales agallados y en suelo rizosférico de plantaciones de tomate en zonas productoras de la provincia de Loja.
- Las evaluaciones *in vitro* permitieron seleccionar cuatro aislados autóctonos de *Trichoderma* spp., (*LEML-Tvir*, *EMZL-Tvir*, *OPL-Tvir*, *SCPLGL-Thz*) con acción parasítica sobre huevos de *M. incognita* entre 70% a 88,8% y sobre juveniles J<sub>2</sub> con porcentajes similares en un rango relativamente menor que va de 70% a 81,3%, con la mayor concentración de esporas.
- Las evaluaciones *in vitro* permitieron seleccionar cuatro aislados autóctonos de *Pochonia* spp., (*LEML-Pchclm*, *TB2Cl-Pchclm*, *TB1CL-Pchctnla*, *LTrML-Pchclm*) con acción parasítica específica sobre huevos de *M. incognita* en un rango de 70% a 90.8% con la mayor concentración de esporas, lo cual demuestra la alta selectividad parasítica del hongo sobre huevos de nematodos agalladores.
- Las evaluaciones en condiciones de invernadero, permitieron seleccionar por su acción biorreguladora de *M. incognita* y su incidencia en el desarrollo agronómico de las plantas, tres aislados del hongo *Trichoderma* (*EMZL-Tvir*, *OPL-Tvir*, *SCPLGL-Thz* códigos de aislados) y cuatro aislados de *Pochonia chlamydosporia* (*TB2Cl-Pchclm*, *TB1CL-Pchctnla*, *LTrML-Pchclm*) con la mayor concentración de esporas.

## 7. RECOMENDACIONES

- Evaluar en condiciones de campo los aislados que presentaron niveles altos de parasitismo en los ensayos *in vitro* e invernadero, con el fin de seleccionar cepas altamente eficientes en el control del nematodo agallador *M. incognita*.
- Realizar estudios de caracterización bioquímica y molecular para complementar la determinación taxonómica a nivel de especies de los aislados de los dos géneros de hongos nematófago evaluados.
- Establecer protocolos para la conservación *in vitro* de los aislados obtenidos en la fase de prospección de este trabajo.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Abad P., Favery B., Rosso M. N. y Castagnone-Sereno P., 2003. Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. *Molecular Plant Pathology* 4, 217-224
2. Acevedo Paiz. V; Silva, S.D; Carneiro, M; López R; Carneiro M. S; Hidalgo-Díaz L. 2015. Evaluación de *Bauveria bassiana* y *Trichoderma harzianum* sobre nematodos parásitos de melón. Zacapa. Tesis Ingeniero Agrónomo. Universidad Rafael Landívar. Zacapa, México.
3. Acurio Vásconez Ramiro Daniel y España Imbaquingo, Cinthia Karina.(2016) AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE *Trichoderma* spp.COMO PROMOTOR DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PASTURAS DE RAYGRASS (*Lolium perenne*) Y TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens*). Revista La Granja/ Volumen No. 25
4. Affokpon, A.; Coyne, D. L.; Htay, C.C.; Agbad, R.D.; Lawouin, L.; Coosemans, J. 2011. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry* 43(3): 600-608.
5. Agrios, G. 2005. *Plant Pathology*. Published Elsevier. 5 ed. United States of America. 734-749 p.
6. Agrios, G. 2010. *Plant Pathology*. Published Elsevier. 5 ed. United States of America. 734-749 p.
7. Alzate Daniel Vergara \*, Óscar Adrián Guzmán Piedrahita\*\*, Jairo Leguizamón Caycedo\*\*\*. (2012). EFECTO *In vitro* DE *Purpureocillium lilacinum* (THOM) LUANGSAARD et al. Y *Pochonia chlamydosporia* (GODDARD) ZARE Y GAMS SOBRE EL NEMATODO BARRENADOR *Radopholus similis* (COBB) THORNE. Universidad de Caldas. Colombia
8. Arévalo, J. 2012. Avances en la caracterización de la cepa IMI SD 187 de *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyscho ex Barron y Onions) Zare y Gams y mejoras productivas del bionemático KlamiC. Tesis grado científico Doctor en Ciencias Agrícolas. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, Universidad Agraria de la Habana, Cuba
9. Arévalo, J., Silvall, S., CarneiroIII, M. D., LopesIII, R., CarneiroIII, R. M., TiganolIII, M. S., & Hidalgo-DíazI, L. (2012). *Pochonia chlamydosporia*

- (Goddard) Zare y Gams como potencial agente de control biológico de *Meloidogyne enterolobii* (Yang y Eisenback) en cultivos hortícolas. Protección Vegetal.
10. Argerich, C. and Troilo, L. Eds. 2011. Diagnóstico socioeconómico del sector hortícola argentino. Aspectos generales del cultivo de tomate In: Manual de Buenas Prácticas Agrícolas en la cadena del tomate. FAO. Bs. As., Argentina.
  11. Arias, Y.; González, I.; Rodríguez, M.; Rosales, C.; Suárez, Z. 2009. Aspectos generales de la interacción tomate *Solanum lycopersicum*-*Meloidogyne incognita*. Rev. Prot Veg. 24(1):1-13.
  12. Asociado a la rizosfera y al rizoplasma de plantas cultivadas y silvestres. Diario de Pakistán de Botánica, 44 , 1041-1046.
  13. Ayatollahy, E., Fatemy, S., y Etebarian, HR (2008). Potencial para el control biológico de la heterodera. *Schachtii* por *Pochonia chlamydosporia* var. *Chlamydosporia* en remolacha azucarera. Biocontrol ciencia y Tecnología, 18 , 157-167.
  14. BAÑOS, Y., CONCEPCIÓN, A., LAZO, R. C., GONZÁLEZ, I., & MOREJÓN, L. (2010). Efecto de enmiendas orgánicas y *Trichoderma* spp. en el manejo de *Meloidogyne* spp. Revista Brasileira de Agroecología.
  15. Batista, A. C., & Fonseca, O. M. (1965). *Pochonia humicola* n. gen. e n. sp., uma curiosa entidade fungica dos solos do Nordeste do Brasil. Publicações do Instituto de Micologia, Universidade do Recife, 462, 1–11.
  16. Becker, J. O.; Van Alfen, N.K. 2014. Plant Health Management: Crop Protection with Nematicides. Encyclopedia of Agriculture and Food Systems. Academic Press, Oxford. pp. 400-407.
  17. Bergognoux, V. 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. Biotechnology Advances 32(1): 170–189.
  18. Bernal A, Andréu CM, Moya MM, González O. Utilización de *Trichoderma* spp., como alternativa ecológica para el control de *Fusarium oxysporum* Schlecht f.sp *cubense* (e.f. Smith) Snyd & Hans. Phytopathol. 2000; 12:16-9.
  19. Besoain X. Control biológico de *Pyrenochaeta lycopersici* y *Phytophthora nicotianae* en tomates bajo invernadero. 2005. Disponible en:

- [http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias\\_agronomicas/monte\\_alegre\\_j/13.html](http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/monte_alegre_j/13.html)
20. Bisset, J. (1991) A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. Can. J. Bot. 69: 2373-2417.
  21. Bokhari F. Efficacy of some *Trichoderma* species in the control of *Rotylenchulus reniformis* and *Meloidogyne javanica*. Rev. Arch Phytopathol Plant Prot. 2009; 42(4): 361 – 369.
  22. Bradley, C.A., Black, W., Kearns, R. and Wood P. (1992) Role of production technology in mycoinsecticides development. In: Frontiers Industrial Mycology (Leatham, G.F., Ed): 160-73, Chapman and Hall, London
  23. Bridge, J. y Page, S.L.J. 1980. Estimation of root-knot nematodes infestation levels on roots using a rating chart. Tropical Pest Management 26: 296-298.
  24. Bridge, J., Starr, J. (2007). Plant nematodes of agricultural importance. Academic Press. EE.UU. 152pp. buenas prácticas agrícolas (BPA) en la producción de tomate bajo condiciones protegidas (en línea).
  25. Burgess. S. 1960. Illustrated genera of imperfect fungi. (3a Ed.). Minneapolis: Publishing Company.
  26. Butt, T.M. and Copping, L. (2000) Fungal biological control agents. Pesticide Outlook 11: 186-191
  27. CAB International. 2007. Crop Protection Compendium. CAB International, Wallingford, UK
  28. Caillaud, M.; Dubreuil, G.; Quentin, M.; Perfus-Barbeoch, L.; Lecomte, P.; de Almeida, J.; Abad, P.; Rosso, M.; Favery, B. 2008. Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. Journal of Plant Physiology 165(1): 104-113.
  29. Camacho Rosalinda Flores<sup>1</sup>, Manzanilla-López Rosa Helena<sup>2</sup>, Prado-Vera<sup>3</sup> Ignacio y Martínez-Garza Ángel. (2007) Control de *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne y Allen con *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Gams y Zare. Rev. mex. fitopatol vol.25 no.1
  30. Castillo, M y Medina, J. (2014). Control biológico del nematodo agallador del tomate de mesa *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) chitwood, 1949 mediante aislamientos de hongos nematófagos nativos.

Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Loja, Ecuador

31. Castillo, O. d., Collantes, C. C., & Krugg, J. W. (2014). Efecto de dos especies nativas de *Trichoderma* sobre huevos y juveniles de *Meloidogyne* sp. en condiciones de laboratorio. Scielo, 9.
32. Castro, L.; Flores, L.; Uribe, L. 2011. Efecto del Vermicompost y Quitina sobre control de *Meloidogyne incognita* en tomate en invernadero. Agron. Costarricense 35(2): 124-128.
33. CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre.
34. Chaverri P and Samuels G. 2002. *Hypocrea lixii*, the teleomorph of *Trichoderma harzianum*. Mycological Progress 1(3):283-286. <http://dx.doi:0.1007/s11557-006-0025-8>
35. Chaverri P, Castlebury L, Samuels G, Geiser D. Multilocus phylogenetic structure within the *Trichoderma harzianum* / *Hypocrea lixii* complex. Molecular Phylogenetics and Evolution. 2003;27(2):302-313.
36. Clyde, J. M. F. (1993). The cyst nematode pathogen *Verticillium chlamydosporium*. PhD Thesis, The University of Leeds, Department of Pure and Applied Biology
37. Cooke, R.C; Godfrey, B. A key to the nematode-destroying fungi. Transactions British Mycological Society 47(1): 61-74. cultivo. La Habana, Cuba. 2006.
38. Delgado, M. 2010. Nematicidas de naturaleza biológica, química y botánica en el control del nematodo *Meloidogyne incognita* en rosas cultivadas bajo invernadero en el cantón Quito. Ediciones Universidad Técnica del Norte. Ibarra, Ecuador. 101 p.
39. Dodd S, Lieckfeldt E, Samuels G. *Hypocrea atroviridis* sp. nov. the teleomorph of *Trichoderma atroviride*. Mycologia. 2003; 95: 27-40.
40. Druzhinina S. and Kubicek P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? Journal of Zhejiang University Science. 6(2):100-112. <http://dx.doi:10.1631/jzus.2005>.
41. Duarte, Milton (2015). CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO AGALLADOR DE LAS RAÍCES DE LA NARANJILLA *Meloidogyne* spp.. MEDIANTE AISLAMIENTOS NATIVOS DE HONGOS NEMATÓFAGOS

Tesis para obtener el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional de Loja, Ecuador

42. Durman S, Menéndez A, Godeas A. Evaluación de *Trichoderma* spp., como antagonista de *Rhizoctonia solani* "in vitro" y como biocontrolador del damping off de plantas de tomate en invernadero. Revista Argentina de Microbiología. 2003;31(1):13-18.
43. FAO. 2014. FAOSTAT Statistical Database 2014. Food and Agricultural Organization of the United Nations, Rome.
44. Fernández – Larrea, O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 2001;62:96-100.
45. Flores, R., Atkins, S. D., Manzanilla, R. H., Prado, I. C., & Martínez, Á. (2008). Characterization of mexican isolates of *Pochonia chlamydosporia* var. *chlamydosporia* (Goddard) Gams and Zare for biological control of *Nacobbus aberrans* (Thorne) Thorne and Allen. Scielo.
46. French, E. R.; Hebert, T. T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, CR, IICA. 175-179  
[p.ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf](ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1374s/a1374s02.pdf)
47. Gams, W. & J. Bissett (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3-34. - In C. P. Kubieek and G. E. Harman (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis Ltd., London, U.K
48. Gams, W.; Zare, R. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. III. Generic classification. *Nova Hedwigia* 72: 47-55.
49. Gheysen, G.; Jones, J. 2006. Nematode biology and plant responses. Molecular aspects of plant nematode interactions. En: Perry, R.; Moens, M. (Eds). "Plant Nematology" Part II. CAB International, Wallingford, UK. pp. 234-252
50. Gómez, L.; Rodríguez, M.G.; Enrique, R. 2009. Efectividad de *Lactuca sativa* como planta trampa de *Meloidogyne* spp., en la producción protegida. *Rev. Protección Veg.* 24(3):173-176.
51. González, I.; Infante, D.; Peteira, B.; Martínez, B.; Arias, Y.; González, N.; Miranda, I. 2010. Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp., promisorios como agentes de control biológico. I. Expresión de actividad quitinasa. *Rev. Protección Veg.* 25(1): 58-63

52. González-Chávez, M.; Shagarodsky, T.; Barrios, O.; y Fraga, N. 2003. Comportamiento varietal del tomate ante el 'tizón temprano' en condiciones de campo. *Rev. Protección Veg.* 18(1):38 - 41.
53. Harman G, Howell C, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review Microbiology.* 2004;2:43-56.
54. Harman G. Myths and dogmas of control. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease.* 2000;84(4):377-393.
55. Harman G. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology.* 2006;96(2):190-194.
56. Harman G. *Trichoderma harzianum*, *T. viridis*, *T. koningii*, *T. hamatum* (Deuteromycetes: Moniliales). 2003. (Consultado: 2 feb 2007). Disponible en: <http://www.ibun.unal.edu.co/r2r7e.html>.
57. Harman G. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system). 2001. Disponible en: <http://www.Biocontrol.entomology.cornell.edu/pathogens/Trichoderma.html>
58. Hashem M, Abo-Elyousr K. Management of the rootknot nematode *Meloidogyne incognita* on tomato with combinations of different biocontrol organisms. *Crop Prot.* 2011;30(3):285-292.
59. Hernández-Ochandía D. Potencialidades de cepas nativas de *Trichoderma asperellum* Samuels para el manejo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Rev Protección Veg.* 2014;29(2):153.
60. Hidalgo-Díaz, L.; Bourne, J.M.; Kerry, B.R. y Rodríguez, M.G. (2000): Nematophagous *Verticillium* spp., in soils infested with *Meloidogyne* spp.. in Cuba: isolated and screening. *Int. J. Pest Manag.* 46: 277-284.
61. Hidalgo-Díaz, Leopoldo y G. Ceiro-Wilson . (2013): Interaction between *Pochonia chlamydosporia* var. *catenulata* (Kamyschko ex Barron y Onions) Zare and Gams AND *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood in tomato in the presence of NaCl. *Rev. Protección Veg.* vol.32 no.1

62. Hjeljord L, Tronsmo A. *Trichoderma* and Gliocladium in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volumen 2. p.131-151. Taylor & Francis. 1998.
63. Hoog, G.S.; Guarro, J.; Gene, J. and Figueras, M.J. 2000, atlas de hongos clínicos, 2 a ed. Ed. CBS Utrece y the Netherland 2: 1-1126
64. Howell C. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Diseases*. 2003;87(1):4-10.
65. Hoyos-Carvajal L, Chaparro P, Abramsky M, Chet I, Orduz S. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp., contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agron Colomb*. 2008;26(3):451-458.
66. Hunt, D.J.; Handoo, Z.A. 2009. Taxonomy, Identification and Principal Species. En: Perry, R.N.; Moens, M.; Starr, J.L. (Eds.). "Root-knot Nematodes" CAB International, Wallingford, U.K. pp. 55-97.
67. Insuasty Christian Eraso<sup>1</sup>, Jairo Acosta Rodríguez<sup>2</sup>, Claudia Salazar González<sup>3</sup>, Carlos Betancourth García. (2014) Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp., para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agorpecuaria*, vol. 15, núm. 2,
68. Jaklitsch, W. M. y Voglmayr, H. (2015). Bio-diversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*, 96, 1–87
69. Jamshidnejad V.; Sahebani, N.; Etebarian H. 2013. Potential biocontrol activity of *Arthrotrrys oligospora* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne javanica* on tomato in greenhouse and laboratory studies. *Archives of Plant Pathology and Plant Protection*. Department of Plant Pathology, University College of Abureihan, Tehran, Iran.
70. Jaramillo, J.; V. Rodríguez; M. Guzmán; M. Zapata; T. Rengifo. 2007. Manual técnico:
71. Jenkins, E.N., Haviefo, G., Langewald, J., Cherry, A. y Lomer, C. (1998) Development of mass production technology for aerial conidia for use as mycpesticides. *Biocontrol News and Information* 19 (1): 2131.

72. Jin R, Suh J, Park R, Kim Y, Krishnan H, Kim K. Effect of chitin compost and broth on biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev Nematol*, 2005; 7: 125 – 132.
73. Jiram Ivan Cetz Chi\*, Jairo Cristóbal Alejo\*, José María Tún Suárez\*, Fernando Antonio Peraza Luna\*\*, Juan Candelero de la Cruz. (2018) Especies nativas de *Trichoderma* spp., y su actividad antagónica contra *Meloidogyne incognita* en *Solanum lycopersicum* L. *Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, 26(73), 5-12.
74. Jones, J. J., Jones. R., Stall & T. Zitter. 2001. "Plagas y enfermedades del tomate", The American Phytopathological Society, Traducido por M. Jiménez y Revisado por R. Jiménez, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp: 25-30.
75. Kaewchai, S; Soyong, K; Hyde, KD. 2009. Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity* 38: 25-50.
76. Karssen, G.; Moens, M. 2006. Taxonomy and Principal Genera of Root-Knot Nematodes. En: Perry, R.; Moens, M. (Eds). "Plant Nematology" Part I. CAB International, Wallingford, UK. Pp. 60-90.
77. Kenneth, R. 2008. *Westcott's Plant Disease Handbook*. USA. 7 ed. Springer. 399-404 p.
78. Kerry, B.R. e Hidalgo-Díaz, L. (2004): Application of *Pochonia chlamydosporia* in the integrated control of root-knot nematode on organically grown vegetable crops in Cuba. *IOBC Bull.* 27(1):123-126.
79. Kirk, P. M., Cannon, P. F., Minter, D. W., et al. (2008). *Dictionary of the fungi* (10th ed.). Wallingford: CAB International.
80. Kozakiewicz, Z. 2001. *Aspergillus*. In: *Foodborne Disease Handbook*. Volume 3: Plant Toxicants. 2nd edition. Y.H. Hui, R.A. Smith and D.G. Spoerke, Jr., ed. Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 471-501.
81. Küçük Ç, Kivanç M. *In vitro* Antifungal Activity of Strains of *Trichoderma harzianum*. *Turk J Biol.* 2004;28:111-115.
82. Kumar V, Singh AU, Jain RK. Comparative efficacy of bioagents as seed treatment for management of *Meloidogyne incognita* infecting okra. *Nematol Medit.* 2012;40:209-211.
83. Larralde-Corona C, Santiago M, Sifuentes A, Rodríguez I, Shirai K, Narváez J. Control potential and polyphasic characterization of novel

- native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;80:167-177.
84. Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., Carbonell-Caballero, J., et al. (2014). Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology*, 65, 69–80.
  85. López, C.; Carrión, G.; Núñez, A. 2014. Isolation of fungi associated with *Criconemoides* sp. and their potential use in the biological control of ectoparasitic and semiendoparasitic nematodes in sugar cane. *Australian Journal of Crop Science* 8(3): 389-396.
  86. López-Llorca L. V. 2002. Fungal egg-parasites of plant-parasitic nematodes from spanish soils. *Revista Iberoamericana de Micología*. Dpto. de Ciencias Ambientales y Recursos Naturales, Universidad de Alicante. España.
  87. López-Llorca LV, Bordallo JJ, Salinas J, Monfort ML, López-Serna ML. Use of light and scanning electron microscopy to examine colonization of barley rhizosphere by the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium*. *Micron.* 2002;33:61-67.
  88. Lopez-Llorca, L. V., & Claugher, D. (1990). Appressoria of the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium*. *Micron and Microscopica Acta*, 21, 125–130.
  89. Lopez-Llorca, L. V., & Robertson, W. M. (1992a). Immunocytochemical localization of a 32-kDa protease from the nematophagous fungus *Verticillium suchlasporium* in infected nematode eggs. *Experimental Mycology*, 16, 261–267.
  90. Luangsa-Ard J, Houbraken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, et al. *Purpureocillium*, un nuevo género para el *Paecilomyces lilacinus* de importancia médica. *FEMS Microbiol Lett.* 2011; 321 (2): 141-9
  91. Luangsa-Ard J, Houbraken J, van Doorn T, Hong SB, Borman AM, Hywel-Jones NL, et al. *Purpureocillium*, un nuevo género para el *Paecilomyces lilacinus* de importancia médica. *FEMS Microbiol Lett.* 2011; 321 (2): 141-9.

92. MAG. (2016) Boletín Situacional - Tomate ríon. Ministerio de Agricultura.
93. Manzanilla, R., & Lopez, L. (2017). Perspectives in Sustainable Nematode Management Through *Pochonia chlamydosporia* Applications for Root and Rhizosphere Health. Springer International Publishing AG.
94. Manzanilla-López, R. H., Esteves, I., Powers, S. J., et al. (2011). Effects of crop plants on abundance of *Pochonia chlamydosporia* and other fungal parasites of root-knot and potato cyst nematodes. *Annals of Applied Biology*, 159, 118–129.
- Larriba, E., Jaime, M. D. L. A., Carbonell-Caballero, J., et al. (2014). Sequencing and functional analysis of the genome of a nematode egg-parasitic fungus, *Pochonia chlamydosporia*. *Fungal Genetics and Biology*, 65, 69–80.
95. Marín, M.T. 2012. Eficacia de diferentes productos en el control de *Meloidogyne* en cultivo de tomate. Tesis de Doctorado. Departamento de Producción Vegetal, Escuela Superior de Ingeniería, Universidad de Almería, España, 136 p.
96. Márquez, M; Solano, T. 2017. Proyecto Generación de alternativas agroecológicas para el manejo de nematodos agalladores *Meloidogyne* spp., en cultivo de tomate en la provincia de Loja.
97. Martínez B, Infante D, Reyes Y. *Trichoderma* spp., y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev Protección Veg.* 2013;28(1):1-9.
98. Martínez B, Reyes Y, Infante D, González E, Baños H, Cruz A. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp., candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. *Rev Protección Veg.* 2008;23(2):118-125.
99. Medina, C. M. G. 2018. Control Biológico de Nematodos Fitoparásitos con el Hongo *Pochonia chlamydosporia*. Serie Fitosanidad, Núm. 109. Artículos Técnicos de INTAGRI. México. 2 p
100. Mehta, C.M.; Palni, U.; Franke, I.H.; Sharma, A.K. 2014. Compost: Its role, mechanism and impact on reducing soil-borne plant diseases. *Waste Management* 34(3): 607–622.

101. Mendoza, G. A., Wilson, J. H., & Colina, J. C. (2013). *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma viride* effect on *Meloidogyne* sp.eggs under laboratory conditions . REBIOLEST, 7.
102. Moens, M.; Perry, R.N.; Starr, J.L. 2009. *Meloidogyne* Species- a Diverse Group of novel and Important Plant Parasites. En: Perry, R.N; Moens, M.; Starr, J.L. (Eds.) "Root-knot Nematodes". CAB International, Wallingford, U.K. pp. 1-17.
103. Monte E. Understanding *Trichoderma*: Between biotechnology and microbial ecology. Int Microbiol. 2001;4:1-4.
104. Monteiro TSA. (2013). Controle biológico do nematoide das galhas, *Meloidogyne javanica*, Promoção de crescimento vegetal con los fungos *Pochonia chlamydosporia* e *Duddingtonia flagrans*. Tesis de maestría, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brasil.
105. Morton CO, Hirsch PR, Kerry B. Infection of plant-parasitic nematodes by nematophagous fungi - a review of application of molecular biology to understand infection processes and to improve biological control. Nematology. 2004;6:161-170
106. Mukhtar, T.; Hussain, M.A.; Kayani, M.Z. 2013a. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. Phytopathologia Mediterranea 52(1): 66–76.
107. Nasu EGC. (2013). Tratamento de sementes de soja e algodão com *Pochonia chlamydosporia* no controle de *Meloidogyne incognita* e histopatologia da inteiração tritrófica. Doctoral thesis, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil.
108. Nico I, Monaco I, Del Bello G, Alippi H. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas al suelo sobre la capacidad patogénica de *Rhizoctonia solani*: II Micoflora asociada y antagonismo *in vitro* de los aislados más frecuentes. RIA. 2005;34(Pt II)(1):29-44.
109. Nyczepir, A.P.; Thomas, S.H. 2009. Current and Future Management Strategies in Intensive Crop Production Systems. En: Perry, R.N; Moens, M.; Starr, J.L. (Eds.) "Root-knot Nematodes" CAB International, Wallingford, U.K. pp 412-443.

110. Oca, N. M., Arévalo, J., Acosta, N., & Peteira, B. (2005). ESTABILIDAD DE LA CEPA IMI SD 187 DE *Pochonia chlamydosporia* var. Protección Vegetal.
111. Olinda, C.-A., Collantes-Arana, C., Cox-Trigoso, G., & Wilson-Krugg, J. (2014). Effect of two native species of *Trichoderma* on eggs and juveniles of. Index, 9.
112. Pandey, M. and R. P. Tewari. 1990. Antagonism of *Pleurotus sajor-caju* by some weed fungi. Mushroom Journal for the Tropics 10 (2): 52-58.
113. Pérez J et. al. *Trichoderma*: alternativa para el control biológico de nemátodos en el marco de una agricultura sostenible. Rev. Fitosanidad. 2006; 10 (2): 165
114. Pérez N. Manejo Ecológico de plagas. CEDAR: La Habana. Cuba. 2004. 296 pp.
115. Preethi DM, Bommalinga S, Pavithra RS, Ravichandra NG, Reddy BMR, Syeda S. Evaluation of various bio-agents for their efficacy against *Meloidogyne incognita* on growth and development of tuberose (*Polianthes tuberosa* L.). Global Journal of Bio-science and Biotechnology. 2016;5(1):125-127.
116. Revelo, J., Piedadmag, J y Hernandez, M. (2007). Eficiencia de nematicidas biológicos en el control de *Meloidogyne incognita* en tomate de mesa (*Lycopersicon esculentum* Mill) bajo invernadero en Socapamba Imbabura. Proyecto de grado previa a la obtención del Título de tercer nivel. Universidad Técnica del Norte.
117. Reyes R, Barranco B, García G, Jiménez G. Actividad in vivo de *Trichoderma harzianum* sobre *Sclerotium rolfsii* en plántulas de tomate. Rev. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología .Costa Rica 2002; 45-48.
118. Rifai M A. A revision of the genus *Trichoderma*. Res 9. Rifai M A. A revision of the genus *Trichoderma*. Res Mycol. 1969; 116:1-56. Mycol. 1969; 116:1-56.
119. Rodríguez, A. M., Tamayo, S. S., & Estrada, D. E. (2014). Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología.

120. Rodríguez. I. Efecto antagónico de ocho aislamientos de *Trichoderma* contra *Fusarium moniliforme* (Booth) y *Fusarium subglutinans* (Booth). Trabajo de Diploma en opción al título de Ingeniero Agrónomo Universidad Agraria de La Habana, 1990.
121. Salazar-Antón, W; Guzmán-Hernández, TJ. 2013. Nematodos fitoparásitos asociados al tomate en la zona occidental de Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana* 24(1):27-36.
122. Samuels G, Dodd S, Lu B, Petrini O, Schroers H, Druzhinina I. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*. 2006;56:67-133.
123. Samuels G. J., Adnan I., Marie C. B., Sophie De R., Orlando P. 2010. *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. *Mycologia*.102(4). 944-966. <http://dx.doi:10.3852/09-243>
124. Samuels GJ. *Trichoderma*: a review of biology and systematic of the genus. *Mycol Res*. 1996;100(8):923- 935.
125. Samuels, G.J.; Petrini, O.; Kuhls, K.; Lieckfeldt, E.; Kubicek, C.P. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Studies in Mycology* 41, 54 pp
126. Samuels, G.J; Chaverri, P.; Farr, D.F.; McCray, E.B. 2010. *Trichoderma* Systematic. Disponible en: [http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/Trichoderma Index.cfm](http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/Trichoderma%20Index.cfm)
127. Santana Bañosl Yoerlandy \*, Concepciónl Armando del Busto, Rodríguez Hernándezll Mayra G., RodríguezFrank L. I, Maqueira Hernández Dagoberto. (2016). Interacción de *Trichoderma harzianum* Rifai y *Azadirachta indica* A. Juss. sobre una población de *Meloidogyne* spp., en plántulas de *Solanum lycopersicum* L. *Rev. Protección Veg.* vol.31 no.2
128. Sanz L, Montero M, Redondo J, Llobell A, Monte E. Expression of an b-1,3-glucanase during mycoparasitic interaction of *Trichoderma asperellum*. *FEBS Journal*. 2005;272:493-499.
129. Seifert, K. A., Morgan-Jones, G., Gams, W., et al. (2011). The genera of Hyphomycetes. Utrecht: Sempere F, Santamarina MP. In vitro biocontrol analysis of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler under different environmental conditions. *Mycopathol*. 2007; 163:83-

130. Shamim, QA, Vicar, S., Ara, J., et al. (2012). Potencial nematocida de filtrados de cultivo de hongos del suelo.
131. Sharon E, Chet I, Viterbo A. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *Eur J Plant Pathology*. 2007;118:247-258.
132. Sharon E, Chet I, Spiegel Y. *Trichoderma* as a biological control agent. In: Davies K, Spiegel Y, editors. *Biological control of plant parasitic nematodes: Building Coherence between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms Progress in Biological Control 11*, DOI 10.1007/978-1-4020-9648-8\_8, Springer Science-Business Media B.V. K. Davies and Y. Spiegel (eds.). Pp. 183-201. 2011.
133. Sharon, E.; Chet, I.; Viterbo, A.; Bar-Eyal, M.; Nagan, H.; Samuels, G.J.; Spiegel, Y. 2007. Parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* and role of the gelatinous matrix. *European Journal of Plant Pathology* 118: 247-258.
134. Shores M, Harman G, Mastouri F. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. *Annu Rev Phytopathol*. 2010;48:21-43.
135. Sikora, R.; Pocasangre, L.; Felde, A.; Niere, B.; Vu, T.; Dababat, A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control* 46(1): 15-23.
136. SINAGAP. (2013). Producción. Obtenido de Uso del Suelo: <http://sinagap.agricultura.gob.ec/reporte-porprovincias>
137. Singh, A.; Sharma, B.K.; Singh, H.B.; Upadhyay, R.S. 2014. *Trichoderma: A Silent Worker of Plant Rhizosphere*. En: Gupta, V.K.; Schmoll, M.; Herrera, A.; Upadhyay, R.S.; Druzhinina, I.; Tuohy, M. (Eds.) "Biotechnology and Biology of *Trichoderma*". Elsevier, Amsterdam, pp. 533-542.
138. Singh, S.; Pandey, R.K.; Goswami, B.K. 2013. Bio-control activity of *Purpureocillium lilacinum* strains in managing root-knot disease of tomato caused by *Meloidogyne incognita*. *Biocontrol Science and Technology* 23(12): 1469-1489.

139. Solano, T. (2017). Generación de alternativas agroecológicas para el manejo de nematodos agalladores *Meloidogyne* spp. en cultivo de tomate en la provincia de Loja. Loja.
140. Solano, T. 2014. Alternativas para el manejo de *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en Loja, Ecuador. Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universidad Araria de la Habana, Cuba.
141. Spiegel Y, Sharon E, Chet I. Mechanisms and improved biocontrol of the root-knot nematodes by *Trichoderma* spp., *Acta Hort.* (ISHS). 2005;698:225-228.
142. Stocco, Marina Celeste. (2014) Control biológico de *Mycosphaerella* graminicola, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. Universidad Nacional de La Plata.
143. Talavera, M; Salmerón, T; Flor-Peregrín, E; Vela-Delgado, MD; Chirsa-Ríos, M; Fernández, MM; Verdejo-Lucas, S]. – Granada. Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera,. (2014). Manejo integrado de nemátodos fitoparásitos en cultivos hortícolas. / [ 1-22 p. Formato digital (e-book) - (Protección de cultivos)
144. Taylor, A. L.; J. N. Sasser: *Biology, Identification and Control of RootKnot Nematodes Meloidogyne* spp.), Graphics, North Carolina State University, EE. UU., 1978, 111 pp.
145. Taylor, A., Sasser, J. (1973). *Biología, Identificación y Control de los Nematodos deNó*
146. Timper, P. 2011. Utilization of biological control for managing plant-parasitic nematodes. En: Davies, K.; Spiegel, Y. (Eds) "Biological Control of Plant-Parasitic Nematodes: Building Coherence Between Microbial Ecology and Molecular Mechanisms, *Progress in Biological Control* 11. Springer Dordrecht Heidelberg, London New York, pp. 259-289.
147. Triviño, G.C., 2010. Reducción del uso de químicos en el control de los nematodos *Meloidogyne* spp., *Rotylenchulus reniformis* y *Pratylenchus* spp., con extractos vegetales y antagonistas nativos en hortalizas en el litoral ecuatoriano. SENACYT. Disponible en:

- <http://becas.senacyt.gov.ec/proyectos/ficha.php?cod=17>. (Consultado: 30 de abril de 2014).
148. Tucker, S. L., & Talbot, N. J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 385–417.
  149. Vargas R; Wang A; Obregón M; Araya M. 2015, Efecto de *Trichoderma* spp., *Paecilomyces lilacinus* y la inyección de nematocida en el pseudotallo en el combate de *Radopholus similis* y la producción de banano. *Revista Agronomía Costarricense*. San José
  150. Viggiano J, Freitas LG, Lopes EA. Use of *Pochonia chlamydosporia* to control *Meloidogyne javanica* in cucumber. *Biol Control*. 2014;69(1):72-77. 10.Larriba E, Jaime M, Carbonell J, Conesa A, Dopazo
  151. Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti L, Lorito M, Sivasithamparam K. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiolog*. 2006;43:143-148.
  152. Volcy, Ch. 1998. *Diversidad y parasitismo en plantas: Tomo 2*. Primera edición. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. 182 p.
  153. Wang Kening, Robert D. Riggs, and Crippen Devany. (2005) Isolation, Selection, and Efficacy of *Pochonia chlamydosporia* for Control of *Rotylenchulus reniformis* on Cotton. Plant Sciences, Department of Plant Pathology, University of Arkansas. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0890>
  154. Wharton, D. A. (2011). Cold tolerance. In R. N. Perry & D. A. Wharton (Eds.), *Molecular and physiological basis of nematode survival* (pp. 182–204). Wallingford: CAB International.
  155. Winham MT, Elod Y, Baker R. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 1986;76:518-521.
  156. Woo L, Scala F, Ruocco M, Lorito M. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*. 2006;96:181-185.
  157. Yang, Z.; Yu, Z.; Lei, L.; Xia, Z.; Shao, L.; Zhang, K.; Li, G. 2012. Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp. *Journal of Asia-Pacific Entomology* 15(4): 647-650.

158. Zare R, Gams W, Culham A (2000) A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. I. Phylogenetic studies using ITS sequences. *NovaHedwigia* 71:465–480
159. Zare, R., Gams, W., & Evans, H. C. (2001). A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. *Nova Hedwigia*, 73, 51
160. Zavala-González, E. A., Escudero, N., López-Moya, F., y otros. (2015). Algunos aislamientos de *Pochonia chlamydosporia* promueve el crecimiento de la raíz y reduce el tiempo de floración de tomate., 166 , 472–483.
161. Zeilinger S, Omann M. *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Rev. Gene Regul Syst Bio.* 2007; 1: 227 – 234.

## 9. ANEXOS

Anexo 1. Escala de evaluación de índice de agallas para el nematodo agallador (Escala de Bridge y Page, 1980).



**0. Sin nódulos**



**1. Nódulos escasos y pequeños, difíciles de encontrar**



**2. Solo nódulos pequeños. Raíces principales sanas**



**3. Algún nódulo grande. Raíces principales sanas**



**4. Predominan los nódulos grandes. Raíces principales sanas**



**5. 50% de raíces infectadas. Algunas raíces principales noduladas**



**6. Raíces principales claramente noduladas**



**7. Mayoría de raíces principales noduladas**



**8. Todas las raíces principales noduladas. Pocas raíces secundarias sanas**



**9. Todas las raíces muy noduladas. Planta muriendo**



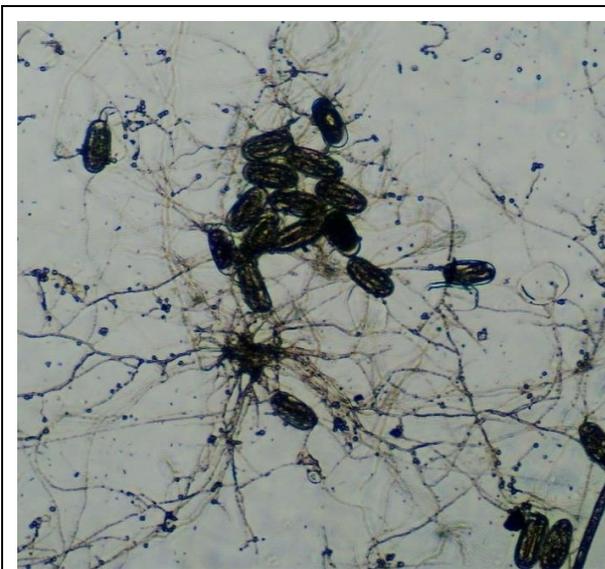
**10. Todas las raíces noduladas. Sin sistema radicular. Planta generalmente muerta**

**Anexo 2.** Prospección en los sectores productores de la provincia de Loja.



**Figura 13.** Selección de muestras de raíz y suelo de tomate

**Anexo 3.** Observación del parasitismo de *Trichoderma* spp.

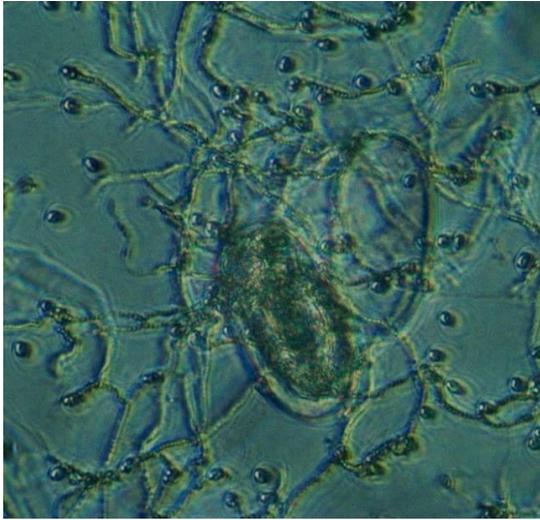


**Figura 14. A)** Parasitismo de los aislados de *Trichoderma* spp., sobre huevos de *Meloidogyne incognita*.

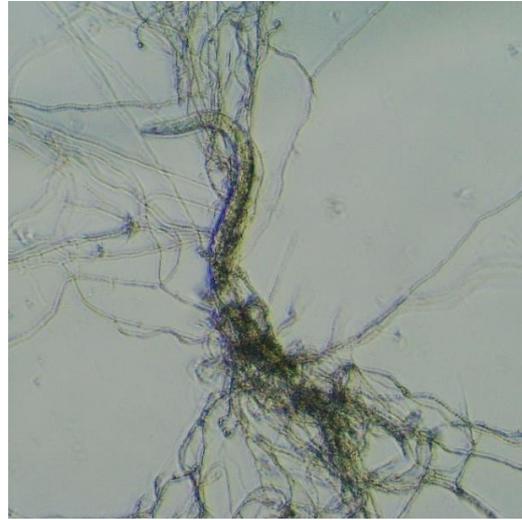


**Figura 15. B)** Parasitismo de los aislados de *Trichoderma* spp., sobre juveniles J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*

**Anexo 4. Observación del parasitismo por parte de *Pochonia* spp.**

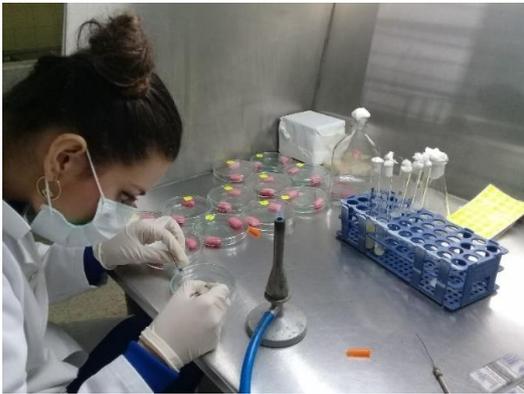


**Figura 16. A) Parasitismo de los aislados de *Pochonia* spp., sobre huevos de *Meloidogyne incognita*.**



**Figura 17. B) Parasitismo de los aislados de *Pochonia* spp., sobre juveniles J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*.**

**Anexo 5. Montaje del bioensayo en condiciones *In vitro*, Loja 2018**



**Figura 18. A) Colocación de la masa de huevo y la dilución fúngica en siracusa.**



**Figura 19. B) Evaluación de la capacidad parasítica de los aislados.**

**Anexo 6. Proceso de la masificación de los aislados, Loja. 2018**



**Figura 20. A) Siembra de aislamientos en botella**



**Figura 21. B) Secado de aislamientos fúngicos en arroz partido estéril**

**Anexo 7. Preparación de bioensayo en condiciones de invernadero, Loja 2018.**



**Figura 22. A) Esterilización de sustrato**



**Figura 23. B) Preparación de semillero**



**Figura 24. C) Preparación del inóculo de los aislados Biocontroladores**



**Figura 25. D) Preparación del inóculo del nematodo *Meloidogyne***



**Figura 26. E) Proceso de tutoraje a las plantas de tomate**



**Figura 27. F) Inoculación de los aislados al sustrato de la planta**

**Anexo 8. Evaluación de las variables del bioensayo en condiciones de invernadero. Loja. 2018.**



**Figura 28. A) Evaluación de la variable peso de maza foliar.**



**Figura 29. B) Evaluación del índice de agallamiento.**

**Anexo 9. Parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita*, por aislados nativos del hongo nematófago *Trichoderma* spp., en condiciones *in vitro*, Loja. 2018**

PARASITISMO EN HUEVOS DE LOS AISLADOS DE TRICHODERMA A LAS 120 HR (INOCULO DE HUEVOS 50)							
TTO	CODIGO	REPETICIONES					%HP
		1	2	3	4	5	
1	LEML-TvirD9	45	48	46	47	33	87,6
2	LEML-TvirD8	40	38	36	33	34	72,4
3	LEML-TvirD7	35	36	37	33	37	71,2
4	LTRML-TsppD9	33	37	35	30	39	69,6
5	LTRML-TsppD8	33	33	34	35	37	68,8
6	LTRML-TsppD7	37	33	34	33	33	68
7	T4ThLED9	35	35	33	33	37	69,2
8	T4ThLED8	35	34	34	35	33	68,4
9	T4ThLED7	32	37	34	33	33	67,6
10	TB2CL-TsppD9	36	33	33	33	34	67,6
11	TB2CL-TsppD8	33	31	34	34	36	67,2
12	TB2CL-TsppD7	35	32	32	33	35	66,8
13	EMZL-TvirD9	32	30	40	46	40	75,2
14	EMZL-TvirD8	38	35	38	35	35	72,4
15	EMZL-TvirD7	36	34	37	33	35	70
16	T2TATR166D9	33	35	35	36	35	69,6
17	T2TATR166D8	27	32	33	33	31	62,4
18	T2TATR166D7	30	29	33	30	31	61,2
19	T5TvirC27D9	33	36	33	32	33	66,8
20	T5TvirC27D8	31	34	30	20	27	56,8
21	T5TvirC27D7	27	26	28	27	23	52,4
22	T3TKT19D9	31	31	32	34	29	62,8
23	T3TKT19D8	35	29	30	29	32	62
24	T3TKT19D7	31	34	30	30	30	62
25	T1TIL15D9	37	33	34	34	36	69,6
26	T1TIL15D8	33	40	30	32	35	68
27	T1TIL15D7	28	33	34	37	33	66
28	OPL-TvirD9	39	38	38	40	39	77,6
29	OPL-TvirD8	39	38	36	39	39	76,4
30	OPL-TvirD7	39	38	37	39	37	76
31	SCPLGL-ThzD9	49	46	44	40	43	88,8
32	SCPLGL-ThzD8	39	38	40	43	35	78
33	SCPLGL-ThzD7	39	40	40	32	32	73,2
34	Tsg	0	0	0	0	0	0

**Anexo 10. Parasitismo en J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*, por aislados nativos del hongo nematófago *Trichoderma* spp., en condiciones *in vitro*, Loja. 2018**

PARASITISMO EN HUEVOS DE LOS AISLADOS DE TRICHODERM J2 A LAS 120 HR (INOCULO INICIAL DE 40 J2)							
TTO	CODIGO	REPETICIONES					%HP
		1	2	3	4	5	
1	LEML-TvirD9	43	47	49	44	49	77
2	LEML-TvirD8	43	43	44	45	47	74
3	LEML-TvirD7	47	43	44	43	43	73
4	LTRML-TsppD9	41	40	43	39	43	69
5	LTRML-TsppD8	40	42	41	40	40	68
6	LTRML-TsppD7	45	34	41	38	38	65
7	T4ThLED9	40	40	43	41	42	69
8	T4ThLED8	40	44	45	40	39	69
9	T4ThLED7	35	36	43	43	42	66
10	TB2CL-TsppD9	42	40	40	40	44	69
11	TB2CL-TsppD8	39	37	37	44	46	68
12	TB2CL-TsppD7	45	38	36	43	38	67
13	EMZL-TvirD9	42	40	44	46	50	74
14	EMZL-TvirD8	48	45	48	45	32	73
15	EMZL-TvirD7	46	39	47	37	45	71
16	T2TATR166D9	43	45	40	36	45	70
17	T2TATR166D8	37	42	43	43	41	69
18	T2TATR166D7	40	39	43	40	41	68
19	T5TvirC27D9	39	44	42	42	43	70
20	T5TvirC27D8	41	44	43	30	37	65
21	T5TvirC27D7	45	36	40	37	33	64
22	T3TKT19D9	41	41	42	44	39	69
23	T3TKT19D8	45	39	40	39	42	68
24	T3TKT19D7	41	44	38	36	40	66
25	T1TIL15D9	38	41	44	44	42	70
26	T1TIL15D8	43	42	40	42	37	68
27	T1TIL15D7	38	39	36	37	43	64
28	OPL-TvirD9	49	48	48	50	49	81
29	OPL-TvirD8	49	48	47	49	47	80
30	OPL-TvirD7	49	39	37	49	49	74
31	SCPLGL-ThzD9	49	50	50	42	42	78
32	SCPLGL-ThzD8	49	39	40	43	45	72
33	SCPLGL-ThzD7	49	46	34	40	40	70
34	Tsg	0	0	0	0	0	0

**Anexo 11. Parasitismo de huevos de *Meloidogyne incognita*, por aislados nativos del hongo nematófago *Pochonia* spp., en condiciones *in vitro*, Loja. 2018**

PARASITISMO EN HUEVOS DE LOS AISLADOS DE POCHONIA A LAS 120 HR (INOCULO DE HUEVOS 50)							
TTO	CODIGO	REPETICIONES					%HP
		1	2	3	4	5	
1	LEML-PchclmD9	42	40	39	42	40	81,2
2	LEML-PchclmD8	39	38	40	37	34	75,2
3	LEML-PchclmD7	35	36	34	38	38	72,4
4	PCH001D9	30	30	37	39	33	67,6
5	PCH001D8	30	33	34	36	33	66,4
6	PCH001D7	30	34	37	32	32	66
7	PCH002D9	35	35	35	34	35	69,6
8	PCH002D8	33	36	30	38	37	69,6
9	PCH002D7	37	33	37	30	36	69,2
10	TB2CL-PchclmD9	45	43	43	31	40	80,8
11	TB2CL-PchclmD8	36	39	42	39	39	78
12	TB2CL-PchclmD7	37	36	36	43	40	76,8
13	TB1CL-PchctnlaD9	48	43	44	45	47	90,8
14	TB1CL-PchctnlaD8	41	39	40	42	40	80,8
15	TB1CL-PchctnlaD7	38	41	40	39	41	79,6
16	LTrML-PchclmD9	44	48	44	43	45	89,6
17	LTrML-PchclmD8	40	44	49	40	48	88,4
18	LTrML-PchclmD7	42	39	40	41	40	80,8
19	NZO2(S)VD9	38	33	33	37	31	68,8
20	NZO2(S)VD8	37	36	31	29	26	63,6
21	NZO2(S)VD7	28	37	36	24	29	61,6
22	Tsgo	0	0	0	0	0	0

**Anexo 12. Parasitismo en J<sub>2</sub> de *Meloidogyne incognita*, por aislados nativos del hongo nematófago *Pochonia* spp., en condiciones *in vitro*, Loja. 2018**

PARASITISMO EN HUEVOS DE LOS AISLADOS DE POCHONIA J2 A LAS 120 HR (INOCULO INICIAL DE 40 J2)							
TTO	CODIGO	REPETICIONES					%HP
		1	2	3	4	5	
1	LEML-PchclmD9	26	25	25	25	21	40,7
2	LEML-PchclmD8	20	22	26	20	22	36,7
3	LEML-PchclmD7	23	22	19	14	25	34,3
4	PCH001D9	23	23	26	22	26	40,0
5	PCH001D8	20	20	23	21	22	35,3
6	PCH001D7	15	14	13	16	15	24,3
7	PCH002D9	17	16	15	12	13	24,3
8	PCH002D8	16	14	11	15	10	22,0
9	PCH002D7	11	8	9	7	9	14,7
10	TB2CL-PchclmD9	36	26	22	21	20	41,7
11	TB2CL-PchclmD8	29	20	22	22	16	36,3
12	TB2CL-PchclmD7	21	16	23	22	20	34,0
13	TB1CL-PchctnlaD9	33	34	22	40	22	50,3
14	TB1CL-PchctnlaD8	24	26	26	26	20	40,7
15	TB1CL-PchctnlaD7	23	22	24	20	26	38,3
16	LTrML-PchclmD9	34	32	32	20	26	48,0
17	LTrML-PchclmD8	20	31	25	22	13	37,0
18	LTrML-PchclmD7	17	20	22	24	23	35,3
19	NZO2(S)VD9	17	23	18	19	21	32,7
20	NZO2(S)VD8	20	21	25	12	10	29,3
21	NZO2(S)VD7	14	15	17	14	18	26,0
22	Tsgo	0	0	0	0	0	0,0

### Anexo 13. Efecto de aislamientos, sobre la variable altura de planta en tomate, en invernadero. Loja. 2018.

EVALUACION DE LOS AISLADOS EN CONDICIONES DE INVERNADERO SOBRE LA VARIABLE ALTURA DE PLANTA (cm)												
TTO	CODIGO	REPETICIONES										%HP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T1	LEML-TvirD10	106	108	107	108	109	108	107	109	107	109	107,8
T2	LEML-TvirD9	101	103	102	102	101	102	102	100	102	102	101,7
T3	LEML-TvirD8	102	100	100	101	101	102	104	103	100	103	101,6
T4	EMZL-TvirD10	114	115	116	115	113	115	116	115	113	114	114,6
T5	EMZL-TvirD9	109	107	108	108	108	109	107	108	107	109	108
T6	EMZL-TvirD8	107	108	105	107	106	105	106	107	109	108	106,8
T7	OPL-Tvir D10	115	116	114	118	118	116	117	115	117	116	116,2
T8	OPL-Tvir D9	100	99	101	199	97	98	100	99	98	100	109,1
T9	OPL-Tvir D8	96	100	107	103	106	99	108	100	105	103	102,7
T10	SCPLGL-ThzD10	108	106	104	107	109	108	106	105	106	107	106,6
T11	SCPLGL-ThzD9	103	100	102	103	103	101	102	102	102	101	101,9
T12	SCPLGL-ThzD8	98	100	99	99	96	105	104	97	99	103	100
T13	LEML-PchclmD10	116	117	118	120	114	117	114	115	116	120	116,7
T14	LEML-PchclmD9	118	117	112	105	115	106	112	111	116	116	112,8
T15	LEML-PchclmD8	106	111	117	112	112	118	103	110	113	122	112,4
T16	TB2CL-PchclmD10	117	119	111	110	110	111	115	111	115	114	113,3
T17	TB2CL-PchclmD9	109	113	111	117	110	109	113	110	105	103	110
T18	TB2CL-PchclmD8	108	104	102	111	110	105	107	117	106	113	108,3
T19	TB1CL-PchctnlaD10	103	122	115	120	110	114	119	120	121	115	115,9
T20	TB1CL-PchctnlaD9	112	115	114	111	117	119	115	114	113	112	114,2
T21	TB1CL-PchctnlaD8	100	109	114	115	107	109	111	103	117	104	108,9
T22	LTrML-PchclmD10	117	108	117	108	118	110	114	112	115	118	113,7
T23	LTrML-PchclmD9	105	110	117	110	110	107	113	105	115	113	110,5
T24	LTrML-PchclmD8	91	103	104	105	107	114	97	98	95	92	100,6
T25	TESTIGO	80	82	80	72	77	88	87	75	76	75	79,2

**Anexo 14. Efecto de aislamientos, sobre la variable peso de área foliar en plantas de tomate, en invernadero. Loja. 2018.**

EVALUACION DE LOS AISLADOS EN CONDICIONES DE INVERNADERO SOBRE LA VARIABLE PESO DE BIOMAZA FOLIAR (g)												
TTO	CODIGO	REPETICIONES										%HP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T1	LEML-TvirD10	120	118	117	120	119	120	117	117	118	120	118,6
T2	LEML-TvirD9	116	114	117	115	116	117	117	119	115	117	116,3
T3	LEML-TvirD8	108	110	111	109	108	110	110	109	108	115	109,8
T4	EMZL-TvirD10	125	125	127	129	128	129	126	125	127	129	127
T5	EMZL-TvirD9	121	124	123	122	123	126	123	125	126	122	123,5
T6	EMZL-TvirD8	116	115	114	116	114	115	117	115	116	115	115,3
T7	OPL-Tvir D10	115	115	116	114	116	113	115	116	115	114	114,9
T8	OPL-Tvir D9	113	112	113	114	113	112	112	114	114	113	113
T9	OPL-Tvir D8	104	101	103	108	100	104	103	107	108	110	104,8
T10	SCPLGL-ThzD10	117	118	119	119	118	117	117	118	120	117	118
T11	SCPLGL-ThzD9	113	111	112	112	113	112	111	112	112	106	111,4
T12	SCPLGL-ThzD8	108	107	105	106	106	107	108	105	106	116	107,4
T13	LEML-PchclmD10	127	130	130	133	128	135	120	120	130	137	129
T14	LEML-PchclmD9	121	121	120	110	120	115	120	110	120	120	117,7
T15	LEML-PchclmD8	117	111	95	127	122	111	117	129	112	111	115,2
T16	TB2CL-PchclmD10	112	128	130	123	121	130	114	121	124	137	124
T17	TB2CL-PchclmD9	130	118	120	120	118	122	120	117	119	120	120,4
T18	TB2CL-PchclmD8	115	120	117	123	120	112	122	115	116	111	117,1
T19	TB1CL-PchctnlaD10	112	129	125	122	133	135	132	127	127	120	126,2
T20	TB1CL-PchctnlaD9	118	118	130	131	132	120	114	110	117	129	121,9
T21	TB1CL-PchctnlaD8	120	114	125	127	110	113	123	115	130	113	119
T22	LTrML-PchclmD10	111	139	125	130	123	124	130	130	132	124	126,8
T23	LTrML-PchclmD9	114	121	127	120	120	115	112	115	123	120	118,7
T24	LTrML-PchclmD8	105	108	106	106	114	123	103	105	105	108	108,3
T25	TESTIGO	82	85	85	80	88	87	82	86	80	89	84,4

**Anexo 15. Efecto de los aislamientos, sobre la variable peso de raíz en plantas de tomate, en invernadero. Loja. 2018.**

EVALUACION DE LOS AISLADOS EN CONDICIONES DE INVERNADERO SOBRE LA VARIABLE PESO DE RAIZ (g)												
TTO	CODIGO	REPETICIONES										%HP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T1	LEML-TvirD10	48	44	45	35	30	33	32	33	26	23	34,9
T2	LEML-TvirD9	32	43	42	31	32	38	34	39	43	42	37,6
T3	LEML-TvirD8	38	49	37	38	46	46	39	37	36	43	40,9
T4	EMZL-TvirD10	37	43	34	39	38	32	36	30	32	31	35,2
T5	EMZL-TvirD9	34	38	36	34	40	36	37	39	37	38	36,9
T6	EMZL-TvirD8	39	36	44	46	48	48	45	44	38	36	42,4
T7	OPL-Tvir D10	35	36	34	32	35	25	40	42	31	25	33,5
T8	OPL-Tvir D9	37	44	46	34	41	40	34	36	27	35	37,4
T9	OPL-Tvir D8	32	36	41	39	44	45	41	41	40	36	39,5
T10	SCPLGL-ThzD10	34	36	30	38	34	36	28	39	35	34	34,4
T11	SCPLGL-ThzD9	40	32	35	38	39	37	42	36	40	37	37,6
T12	SCPLGL-ThzD8	38	38	33	45	47	34	45	38	36	38	39,2
T13	LEML-PchclmD10	32	33	32	19	36	20	38	33	21	39	30,3
T14	LEML-PchclmD9	44	38	44	42	32	35	35	27	38	30	36,5
T15	LEML-PchclmD8	46	40	52	61	30	52	25	29	43	40	41,8
T16	TB2CL-PchclmD10	22	36	22	37	27	56	27	38	28	44	33,7
T17	TB2CL-PchclmD9	39	48	34	43	35	35	30	36	41	50	39,1
T18	TB2CL-PchclmD8	42	47	50	47	42	41	52	36	64	31	45,2
T19	TB1CL-PchctnlaD10	30	34	30	32	30	30	29	33	30	34	31,2
T20	TB1CL-PchctnlaD9	45	39	35	44	38	26	33	29	29	32	35
T21	TB1CL-PchctnlaD8	40	41	31	54	48	42	29	40	41	42	40,8
T22	LTrML-PchclmD10	29	30	30	30	32	34	27	25	36	47	32
T23	LTrML-PchclmD9	31	37	33	33	32	37	38	38	35	39	35,3
T24	LTrML-PchclmD8	34	40	30	46	34	44	43	42	46	38	39,7
T25	TESTIGO	62	56	60	56	57	59	55	51	58	52	56,6

**Anexo 16. Efecto de aislamientos, sobre la variable índice de agallamiento en raíces en plantas de tomate, en invernadero.  
Loja. 2018.**

EVALUACION DE LOS AISLADOS EN CONDICIONES DE INVERNADERO SOBRE LA VARIABLE INDICE DE AGALLAMEINTO (Escala de Bridge y Page)												
TTO	CODIGO	REPETICIONES										%HP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T1	LEML-TvirD10	6	5	5	5	4	6	6	4	5	6	5,2
T2	LEML-TvirD9	5	6	7	6	7	7	5	6	6	9	6,4
T3	LEML-TvirD8	7	7	6	6	7	8	8	7	7	7	7
T4	EMZL-TvirD10	4	4	4	5	5	5	5	4	5	5	4,6
T5	EMZL-TvirD9	7	7	8	7	6	7	8	6	6	8	7
T6	EMZL-TvirD8	7	8	8	8	7	8	8	7	7	8	7,6
T7	OPL-Tvir D10	4	4	4	6	6	4	2	2	2	4	3,8
T8	OPL-Tvir D9	4	6	5	4	5	5	6	5	5	5	5
T9	OPL-Tvir D8	6	4	5	5	4	5	6	7	7	7	5,6
T10	SCPLGL-ThzD10	5	5	6	5	4	6	5	5	5	4	5
T11	SCPLGL-ThzD9	4	6	7	5	7	7	7	7	7	7	6,4
T12	SCPLGL-ThzD8	7	8	7	6	7	6	7	7	7	7	6,9
T13	LEML-PchclmD10	6	5	4	4	5	7	4	6	5	7	5,3
T14	LEML-PchclmD9	7	6	7	6	7	7	8	6	7	6	6,7
T15	LEML-PchclmD8	7	8	7	8	8	9	8	9	8	8	8
T16	TB2CL-PchclmD10	6	7	7	8	7	6	6	5	8	6	6,6
T17	TB2CL-PchclmD9	8	7	6	8	6	8	7	8	5	7	7
T18	TB2CL-PchclmD8	6	8	7	8	7	6	8	7	7	7	7,1
T19	TB1CL-PchctnlaD10	4	5	6	3	6	4	4	4	4	4	4,4
T20	TB1CL-PchctnlaD9	5	7	4	5	4	6	6	4	6	4	5,1
T21	TB1CL-PchctnlaD8	8	6	4	8	7	7	5	7	4	5	6,1
T22	LTrML-PchclmD10	4	4	4	4	3	3	6	7	5	3	4,3
T23	LTrML-PchclmD9	8	7	4	7	6	7	4	4	4	4	5,5
T24	LTrML-PchclmD8	6	8	8	5	8	4	8	8	8	8	7,1
T25	TESTIGO	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	9,8

**Anexo 17. Efecto de aislamientos, sobre la variable población de raíces en 10 gr de raíces en plantas de tomate, en invernadero. Loja. 2018.**

EVALUACION DE LOS AISLADOS EN CONDICIONES DE INVERNADERO SOBRE LA VARIABLE POBLACION DE J2 EN 10 g DE RAÍZ												
TTO	CODIGO	REPETICIONES										%HP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T1	LEML-TvirD10	61	66	65	62	62	66	63	66	62	87	66
T2	LEML-TvirD9	91	80	85	84	86	87	86	85	88	89	86,1
T3	LEML-TvirD8	60	93	93	94	100	98	104	95	73	97	90,7
T4	EMZL-TvirD10	79	73	82	85	79	77	50	89	53	70	73,7
T5	EMZL-TvirD9	70	7	70	0	80	91	9	80	95	87	58,9
T6	EMZL-TvirD8	68	90	94	98	81	93	90	100	98	90	90,2
T7	OPL-Tvir D10	44	44	44	50	40	45	43	42	40	41	43,3
T8	OPL-Tvir D9	60	65	64	60	67	60	53	61	52	49	59,1
T9	OPL-Tvir D8	73	60	65	62	64	64	66	62	64	69	64,9
T10	SCPLGL-ThzD10	52	56	62	49	61	53	67	52	50	60	56,2
T11	SCPLGL-ThzD9	81	73	70	81	84	78	70	75	90	79	78,1
T12	SCPLGL-ThzD8	95	92	81	93	91	95	92	94	100	83	91,6
T13	LEML-PchclmD10	42	47	46	41	40	43	40	42	45	46	43,2
T14	LEML-PchclmD9	74	72	76	70	65	71	72	64	68	60	69,2
T15	LEML-PchclmD8	79	70	94	96	82	97	98	70	91	60	83,7
T16	TB2CL-PchclmD10	41	43	49	40	44	39	40	45	80	82	50,3
T17	TB2CL-PchclmD9	68	66	62	63	60	71	70	65	67	60	65,2
T18	TB2CL-PchclmD8	62	75	70	70	70	73	78	77	72	78	72,5
T19	TB1CL-PchctnlaD10	81	76	75	88	69	75	82	73	79	76	77,4
T20	TB1CL-PchctnlaD9	61	59	60	73	60	69	72	80	96	45	67,5
T21	TB1CL-PchctnlaD8	97	93	92	87	95	95	98	95	90	91	93,3
T22	LTrML-PchclmD10	89	91	80	97	83	80	89	81	80	97	86,7
T23	LTrML-PchclmD9	99	103	105	107	104	101	103	108	129	106	106,5
T24	LTrML-PchclmD8	117	101	102	106	103	102	109	105	103	123	107,1
T25	TESTIGO	197	194	183	196	185	177	190	199	194	193	190,8

**Anexo 18. Efecto de aislamientos, sobre la variable población de nematodos en 100 c<sup>3</sup> de suelo en plantas de tomate, en invernadero. Loja. 2018**

EVALUACION DE LOS AISLADOS EN CONDICIONES DE INVERNADERO SOBRE LA VARIABLE POBLACION DE J2 EN 100 cc DE SUELO												
TTO	CODIGO	REPETICIONES										%HP
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
T1	LEML-TvirD10	90	91	98	89	88	98	92	93	91	94	92,4
T2	LEML-TvirD9	102	100	101	98	101	92	95	101	100	103	99,3
T3	LEML-TvirD8	102	106	103	105	108	104	100	104	109	101	104,2
T4	EMZL-TvirD10	61	60	43	56	55	52	68	50	62	56	56,3
T5	EMZL-TvirD9	63	65	66	72	70	72	71	81	72	74	70,6
T6	EMZL-TvirD8	88	102	102	97	98	103	102	100	102	96	99
T7	OPL-Tvir D10	73	72	89	78	75	74	82	79	79	85	78,6
T8	OPL-Tvir D9	114	94	109	108	116	101	120	105	111	116	109,4
T9	OPL-Tvir D8	110	118	110	139	116	118	102	103	101	123	114
T10	SCPLGL-ThzD10	56	82	79	83	68	66	61	78	67	62	70,2
T11	SCPLGL-ThzD9	86	81	67	84	99	84	91	99	101	83	87,5
T12	SCPLGL-ThzD8	103	99	100	102	110	100	109	112	108	106	104,9
T13	LEML-PchclmD10	59	52	41	43	45	47	62	53	57	52	51,1
T14	LEML-PchclmD9	82	84	86	61	70	58	69	58	34	41	64,3
T15	LEML-PchclmD8	73	80	77	81	87	98	81	79	82	80	81,8
T16	TB2CL-PchclmD10	48	55	52	48	51	54	44	57	41	39	48,9
T17	TB2CL-PchclmD9	54	51	53	61	58	57	63	50	73	59	57,9
T18	TB2CL-PchclmD8	100	102	114	102	101	121	108	109	91	130	107,8
T19	TB1CL-PchctnlaD10	49	49	43	34	47	55	42	51	52	48	47
T20	TB1CL-PchctnlaD9	51	43	57	54	61	67	45	59	52	63	55,2
T21	TB1CL-PchctnlaD8	79	77	83	83	63	63	63	72	68	70	72,1
T22	LTrML-PchclmD10	60	52	60	54	43	63	67	42	62	55	55,8
T23	LTrML-PchclmD9	32	58	32	88	87	90	86	80	88	68	70,9
T24	LTrML-PchclmD8	102	102	111	105	123	112	119	101	119	113	110,7
T25	TESTIGO	203	219	212	165	197	195	217	212	197	200	201,7

## Anexo 19. Formulario de prospección en el campo

"GENERACION DE ALTERNATIVAS AGROECOLÓGICAS PARA EL MANEJO DE NEMATODOS  
AGALLADORES MELOIDOGYNE SPP EN CULTIVO DE TOMATE, EN LA PROVINCIA DE LOJA"

### FORMULARIO PARA INFORMACIÓN DE CAMPO

1. INFORMACION GENERAL DEL CULTIVO:
  - 1.1. Nombre agricultor: Ney Lamas Vinas Fecha: 10/09/2017 Teléfono: .....
  - 1.2. Ubicación política: Provincia: Loja Cantón: Zapallar Parroquia: Licochea Sector: El Uno de Pilares
  - 1.3. Información georeferencial: altitud (msnm): 166 Longitud: 78° 19' 33" O Latitud: 4° 23' 11" S
  - 1.4. Información cultivo: edad (días): 180 variedad: Dominique Híbrido: .....
  - superficie (m<sup>2</sup>): 100 n° plantas: ..... densidades de siembra (m<sup>2</sup>): 1m
  - tipología de cultivo: solo: ..... mixto:  invernadero: ..... Jardín: ..... Vivero: ..... Otros: .....
2. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA:
  - 2.1. Descripción de síntomas foliares  
Clorosis ( ) ; amarillamiento ( ) ; marchitez (); raquitismo ( ) ; enanismo ( )
  - 2.2. Descripción de síntomas/signos en raíces: Agallamiento, pudrición
  - 2.3. Fase en que aparecen primeros síntomas: crecimiento: ..... floración: ..... fructificación:
  - 2.4. Se presentó en cultivos anteriores: no ( ) ; Si mismo cultivo () , Si en otros cultivo ( )
3. DISTRIBUCIÓN DE LA ENFERMEDAD EN EL CULTIVO  
General: ..... localizada:  cerca de carretera: ..... borde superior: ... borde inferior: ..... borde laterales: .....  
áreas secas: ... áreas húmedas:  áreas sombrías: ... áreas soleadas: ... corrientes de aire: .....
4. SUELO  
Textura: Arenoso: ..... Limoso: ..... Arcilloso:   
Pendiente: Alta: ..... Plana:  Baja: .....  
Drenaje: Bueno: ..... Moderado:  Pobre: .....  
Humedad: Excesiva: ..... Moderada:  Deficiente: .....
5. CLIMA:  
HR%: Excesiva: ..... Media: ..... Baja:   
Vientos: Normal:  Fuertes: ..... Deficientes: .....  
Lluvias: Frecuentes: ..... Escasa: ..... No llueve:   
Temperatura: Media: 24°C Baja: 22°C Alta:  28°C
6. TECNOLOGÍAS DE MANEJO DEL CULTIVO:  
Preparación del suelo: Tractor  
Preparación del vivero: 1 mes antes de la siembra  
Siembra directa: .....  
Densidades de siembra: 1.0 m x 0.5 metro  
Fertilización: NPK  
Riego: Moderado
7. FORMAS DE CONTROL