



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA DE RECURSOS**  
**NATURALES Y RENOVABLES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TÍTULO**

**“CEPAS DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona) EN EL SUR DEL ECUADOR”.**

Tesis previa a la obtención del  
Título de Ingeniera Agrónomo.

**AUTORA**

Verónica Elizabeth Villa Jaramillo

**DIRECTOR**

Ing. Ángel Rolando Robles Carrión. Mg. Sc.

**LOJA-ECUADOR**

**2015**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES**  
**RENOVABLES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**Ingeniero Agrónomo**

Ángel Rolando Robles Carrión Mg. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS**

**CERTIFICA:**

Que el trabajo de investigación de tesis: "CEPAS DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona) EN EL SUR DEL ECUADOR". de la autoría de la Señorita Verónica Elizabeth Villa Jaramillo, Egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica, ha sido desarrollada bajo mi dirección, acorde con las actividades establecidas en el cronograma de ejecución del proyecto aprobado y sujetándose a la rigurosidad científica y las normas de redacción técnica.

Por lo expuesto autorizo a la Autora indicada, la presentación del documento de tesis respectivo para que continúe con los trámites legales de graduación.

Loja, 27 de noviembre de 2015

Ing. Ángel Rolando Robles Carrión Mg. Sc.  
**DIRECTOR DE TESIS**



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**  
**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES**  
**CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA**

**TESIS:**

**CEPAS DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL BABACO  
(*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) EN EL SUR DEL ECUADOR”.**

Presentada al tribunal de grado como requisito previo a la obtención del Título  
de:

**INGENIERA AGRÓNOMO**

Dra. Zoila Zaruma Hidalgo.

**PRESIDENTA DEL TRIBUNAL**

Ing. Bolívar Cueva Cueva

**VOCAL DEL TRIBUNAL**

Ing. Iván Granda Mora.

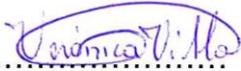
**VOCAL DEL TRIBUNAL.**

## AUTORIA

Yo, Verónica Elizabeth Villa Jaramillo, declaro ser autor del presente trabajo de tesis y eximo expresamente a la Universidad Nacional de Loja y a sus representantes jurídicos, de 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.

Autora: Verónica Elizabeth Villa Jaramillo

Firma: 

Cedula: 1105578601.

Fecha: 10/12/2015

**CARTA DE AUTORIZACION POR PARTE DE LA AUTORA PARA LA  
CONSULTA, REPRODUCCION PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACION  
ELECTRONICA DEL TEXTO COMPLETO.**

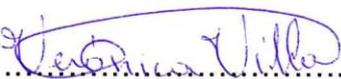
Yo, Verónica Elizabeth Villa Jaramillo, declaro ser autor de la tesis titulada "CEPAS DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona) EN EL SUR DEL ECUADOR", como requisito para optar al grado de: INGENIERA AGRÓNOMA, autorizo Al Sistema Bibliotecario 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 plagio o copia de la tesis que realice un tercero.

Para constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja, a los 10 días del mes de diciembre del 2015, firma la autora.

**Firma:**

.....

**Autora:**

Verónica Elizabeth Villa Jaramillo

**Número de Cédula:**

1105578601

**Dirección:**

Loja, Av. Pio Jaramillo y Galileo Galilei.

**Correo electrónico:**

veritovija1803hotmail.com

**Celular:**

0982629418

**DATOS COMPLEMENTARIOS**

**Director de Tesis:**

Ing. Ángel Rolando Robles Carrión. Mg. Sc.

**Tribunal:**

Dra. Zoila Zaruma Hidalgo

PRESIDENTA

Ing. Bolívar Cueva Cueva

VOCAL

Ing. Iván Granda Mora

VOCAL

## **AGRADECIMIENTO**

Al finalizar este trabajo de investigación quiero dejar constancia de mi sincero agradecimiento a las siguientes instituciones y personas que intervinieron en el desarrollo y elaboración, sin la cual no hubiese sido posible sin su valiosa colaboración.

Gracias a la Universidad Nacional de Loja, al Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables, a la Carrera de Ingeniería Agronómica y principalmente a sus docentes, por haber impartido sus conocimientos a lo largo de toda mi formación profesional.

Al Ing. Ángel Robles Carrión M Sc. por su dirección y asesoramiento, por haberme brindado su apoyo, amistad y confianza, quien con su experiencia me guio en el desarrollo de la fase de laboratorio, análisis de la información, dirección y revisión de final de la Tesis concluida.

Agradezco al tribunal de grado integrado por la Dra. Zoila Zaruma, el Ing. Bolívar Cueva Cueva y el Ing. Iván Granda Mora, por las sugerencias que permitieron enriquecer el contenido de esta investigación.

Agradezco al Centro de Biotecnología e investigadores que se desempeñan en esta institución en especial al Dr. Roldan Torres y a la Dra. Loidy Zamora por su apoyo en el desarrollo de la investigación.

Al equipo técnico del laboratorio de Suelos del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la UNL, conformado por el Director Ing. Omar Ojeda, y sus técnicos, Ing. Diana Iñiguez e Ing. Fabián Macas, quienes me brindaron su apoyo en análisis físicos y químico de suelos del cantón Loja.

Finalmente, expresó un infinito y profundo agradecimiento a mi familia y amig@s por convertirse en un pilar fundamental en mi formación y por haberme brindado su amistad, cariño y consejos.

**LA AUTORA**

## **DEDICATORIA**

Con todo el cariño y gratitud a Dios por darme la vida, salud y fortaleza, a mis padres Rafael y Victoria por su apoyo, ayuda y comprensión en todos los momentos de mi vida dándome aliento y fortaleza para seguir luchando día tras días. A mis hermanos María, Rafael y Rosa Antonia (+); a mis abuelos, tíos, tías, primos y por apoyarme siempre en todo momento y quienes me impulsaron a seguir luchando y alcanzar mis objetivos y metas.

**VERÓNICA ELIZABETH**

## ÍNDICE GENERAL

	ÍNDICE	PÁGINA
PORTADA.....		i
CERTIFICACIÓN .....		ii
APROBACIÓN .....		iii
AUTORIA.....		iv
CARTA DE AUTORIZACION.....		v
AGRADECIMIENTO .....		vi
DEDICATORIA.....		vii
ÍNDICE GENERAL.....		viii
ÍNDICE DE CUADROS.....		xii
ÍNDICE DE FIGURAS .....		xiii
ÍNDICE DE APENDICES .....		xv
RESUMEN .....		xvii
ABSTRACT .....		xix
I. INTRODUCCIÓN.....		1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....		3
2.1. Origen, Evolución y Distribución Geográfica del Babaco ( <i>Vasconcellea heilbornii</i> var. <i>pentagona</i> ). .....		3
2.2. Características Generales del Babaco .....		3
2.3. Condiciones Edafoclimáticas .....		5
2.4. El Cultivo del Babaco en el Ecuador .....		5
2.5. Propagación del Babaco .....		6
2.6. Principales Enfermedades del Babaco.....		6
2.6.1. Enfermedades Fúngicas.....		7
2.6.2. Enfermedades bacterianas .....		10
2.6.3. Enfermedades Causadas por Virus.....		12

2.6.4.	Enfermedades Causadas por Nematodos.....	13
2.7.	El Suelo y sus Componentes Microbianos .....	14
2.8.	La Rizósfera de la Planta .....	14
2.8.1.	División de la Rizósfera de la Planta .....	14
2.8.2.	Microorganismos Antagonistas de la Rizósfera de los Cultivos.....	15
2.9.	<i>Trichoderma</i> spp., como Agente de Control Biológico de la MVB .....	16
2.9.1.	Genero <i>Trichoderma</i> spp.....	16
2.9.2.	Caracterización Morfológica.....	17
2.9.3.	Condiciones favorables para <i>Trichoderma</i> spp. ....	18
2.9.4.	Mecanismos de Acción. ....	19
2.9.4.1.	Antibiosis.....	20
2.9.4.2.	Competencia .....	20
2.9.4.3.	Micoparasitismo .....	21
2.9.5.	Estudios realizados.....	21
2.9.5.1.	Aislamiento e identificación de los hongos antagonistas .....	21
2.9.5.2.	Pruebas de antagonismo .....	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
3.1.	Ubicación General.....	24
3.2.	Ubicación Político – Geográfica .....	24
3.2.1.	Laboratorio de Biotecnología .....	24
3.2.2.	Georeferenciación de los cantones estudiados.....	24
3.2.2.1.	Cantón Loja.....	24
3.2.2.2.	Cantón Saraguro.....	24
3.2.3.	Clima y ecología.....	25
3.3.	Materiales.....	26

3.3.1.	Materiales de campo .....	26
3.3.2.	Materiales de escritorio .....	26
3.3.3.	Material de laboratorio .....	26
3.3.4.	Reactivos.....	26
3.3.5.	Materiales biológicos .....	27
3.4.	Metodología .....	27
3.4.1.	Metodología del primer objetivo “Determinar factores abióticos de la rizósfera del Babaco” .....	27
3.4.1.1.	Colecta de muestras para el análisis físico-químico de los suelos en plantaciones de Babaco.....	27
3.4.1.2.	Datos Climáticos .....	28
3.4.2.	Metodología para el segundo objetivo “Realizar pruebas de antagonismo in vitro con <i>Trichoderma</i> spp como agente de biocontrol de la MVB”.....	28
3.4.2.1.	Pruebas de antagonismo .....	28
3.4.3.	Metodología del tercer objetivo “Caracterizar morfológicamente las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp aisladas de la rizósfera del Babaco” .....	30
3.4.3.1.	Sitios de muestreos.....	30
3.4.3.2.	Aislamiento y caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> spp. ....	30
IV.	RESULTADOS .....	34
4.1.	Determinar factores abióticos de la rizósfera del Babaco .....	34
4.1.1.	Determinación de las propiedades físicas del suelo asocias a la MVB.....	34
4.1.2.	Determinación de las propiedades químicas del suelo asocias a la MVB.....	34
4.1.3.	Datos Climáticos .....	35

4.2.	Realizar pruebas de antagonismo in vitro con <i>Trichoderma</i> spp como agente de biocontrol de la MVB.....	36
4.2.1.	Pruebas de antagonismo.....	36
4.3.	Caracterizar morfológicamente las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp aisladas de la rizósfera del Babaco.....	40
4.3.1.	Sitios de muestreos .....	40
4.3.2.	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.....	41
4.3.3.	Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp. ....	41
V.	DISCUSIÓN.....	44
5.1.	Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo asocias a la MVB.....	44
5.1.1.	Propiedades físicas asociadas a la MVB.....	44
5.1.2.	Propiedades químicas asociadas a la MVB .....	45
5.1.3.	Datos Climáticos .....	46
5.2.	Realizar pruebas de antagonismo in vitro con <i>Trichoderma</i> spp como agente de biocontrol de la MVB.....	47
5.2.1.	Pruebas de antagonismo.....	47
5.3.	Caracterizar morfológicamente las diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> spp aisladas de la rizósfera del Babaco.....	48
5.3.1.	Aislamiento e Identificación morfológica de <i>Trichoderma</i> spp.....	48
VI.	CONCLUSIONES.....	50
VII.	RECOMENDACIONES.....	51
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.....	52
IX.	APÉNDICE .....	64

## ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE	PÁGINA
Cuadro 1. Aislados de <i>Fusarium</i> spp., identificados morfológica y molecularmente.....	27
Cuadro 2. Determinación de las propiedades físicas del suelo asociadas a la MVB, de la provincia de Loja, cantón Loja, parroquia Chuquiribamba, sector El Carmelo; cantón Saraguro, sector Cochapamba.....	34
Cuadro 3. Determinación de las propiedades químicas del suelo asociadas a la MVB, de la provincia de Loja, cantón Loja, parroquia Chuquiribamba, sector El Carmelo; cantón Saraguro, sector Cochapamba.....	34
Cuadro 4. Origen de los diferentes aislados de <i>Trichoderma</i> spp., en la provincia de Loja, Ecuador.....	40
Cuadro 5. Características morfológicas y culturales de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp., recolectadas de suelos rizosféricos del Babaco en la provincia de Loja, Ecuador.....	42
Cuadro 6. Características morfométricas de diferentes cepas de <i>Trichoderma</i> (Cueva, 2007).....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE	PÁGINA
Figura 1. Morfología externa de <i>Trichoderma</i> spp.....	18
Figura 2. Mapa del cantón Loja y de Saraguro (CINFA, 2012).....	25
Figura 3. Procedimiento para realizar cultivos duales. ....	29
Figura 4. . Evaluación de enfrentamiento dual <i>Trichoderma- Fusarium</i> . ....	29
Figura 5. Recolección de muestras de suelos del cantón Loja y Saraguro .....	30
Figura 6. Aislamiento y purificación de <i>Trichoderma</i> , a) diluciones; b) aislamiento, c) crecimiento de colonias de hongos en medio TSB. ....	31
Figura 7. Elaboración de micro-cultivos, a) materiales en la cámara de flujo laminar, b) micro cultivo, c) sellado se micro cultivos, d) incubación.....	32
Figura 8. Conteo de conidios; a) <i>Trichoderma</i> en medio líquido, b) cernido de micelio, c) medio líquido con conidios de <i>Trichoderma</i> , c) Conteo de conidios de <i>Trichoderma</i> en la cámara de Neubauer.....	33
Figura 9. Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre de 2013.....	35
Figura 10. Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre de 2014.....	36

Figura 11. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (AML2), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 192 horas de evaluación.....	37
Figura 12. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (AML1), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 144 horas de evaluación.....	38
Figura 13. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (CHA1), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 192 horas de evaluación.....	39
Figura 14. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (QUI1), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 144 horas de evaluación.....	40
Figura 15. Características de la colonia de los 12 aislados de <i>Trichoderma</i> spp .....	41
Figura 16. Morfología microscópica de los aislados de <i>Trichoderma</i> spp. a) Conidias ovoides, b) globosas; observado en un aumento de 40x.....	42

## ÍNDICE DE APENDICES

ÍNDICE	PÁGINA
Apéndice 1. Determinación de la Densidad Aparente del suelo .....	64
Apéndice 2. Determinación de Capacidad de Campo, Punto de Marchitez, Permanente, Agua Aprovechable.....	66
Apéndice 3. Determinación del pH .....	70
Apéndice 4. Determinación de materia orgánica (método de Walkley-Black). .....	71
Apéndice 5. Capacidad de Intercambio Catiónico (método del Formaldehído).....	74
Apéndice 6. Determinación de Textura del suelo (método de Buyucus o Método del Hidrómetro).....	76
Apéndice 7. Conductividad eléctrica	80
Apéndice 8. Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre del 2013.....	81
Apéndice 9. Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre del 2014.....	81
Apéndice 10. Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (AML2), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 192 horas de evaluación.....	82
Apéndice 11. Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (AML1), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 144 horas de evaluación.....	82

Apéndice 12. Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (CHA1), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 192 horas de evaluación.....	83
Apéndice 13. Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de <i>Fusarium</i> (QUI2), con <i>Trichoderma</i> (ECM6), durante 144 horas de evaluación.....	83
Apéndice 14. <i>Colecta</i> de suelos en los catones Loja y Saraguro.....	84
Apéndice 15. Diluciones seriadas para el aislamiento de <i>Trichoderma</i> en medio sólido TSB.....	84
Apéndice 16. Purificación de cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> .....	85
Apéndice 17. Elaboración de micro cultivos para la caracterización morfológica de <i>Trichoderma</i> .....	85
Apéndice 18. Siembra de micelio e incubación de tubos con <i>Trichoderma</i> spp en medio líquido.....	85
Apéndice 19. Pruebas de antagonismo in vitro con <i>Trichoderma</i> spp como agente de biocontrol de la MVB. ....	86

**CEPAS DE *Trichoderma* spp. AISLADAS DE LA RIZÓSFERA  
DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) EN EL  
SUR DEL ECUADOR”**

## RESUMEN

Se realizó muestreos en suelos con plantaciones de Babaco en la provincia de Loja, para obtener aislados de *Trichoderma* nativos, con el fin de hacer la caracterización morfológica y conocer su efectividad biológica como antagonista de *Fusarium* spp., causante de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB). Los muestreos se realizaron en los cantones de Loja y Saraguro, se recolectaron muestras de suelo rizosférico del Babaco, para determinar los factores abióticos en el desarrollo de la MVB y determinar la presencia de *Trichoderma*. Seguidamente se realizó el aislamiento de *Trichoderma* de las muestras de suelo por medio de diluciones seriadas y con Medio TSB (Sulfato de magnesio, fosfato di potásico, nitrato de amonio, cloruro de potasio, glucosa, rosa de bengala, cloranfenicol, bacto agar, metalacxyl.). Posteriormente, se realizaron las pruebas de antagonismo *in vitro* con *Trichoderma* spp como agente de biocontrol de la MVB, se utilizó la técnica de cultivo Dual para lo cual se consideraron cuatro cepas de *Fusarium* y una cepa de *Trichoderma* con mejores características morfo-culturales. Se realizaron evaluaciones hasta que el tratamiento control lleno la caja de Petri. Se obtuvieron 12 muestras de suelos, 5 provenientes del sector Cochapamba y 7 del sector el Carmelo; mismas que presentan suelos franco arenosos y arcillos, pH que van desde ligeramente ácidos a ácidos, con contenidos de materia orgánica de mediano a alto, presencia de suelos salinos y no salinos, y, con niveles óptimos de nutrientes para el desarrollo del cultivo y controlador biológico; de las muestras recolectadas, mediante la caracterización morfológica se obtuvieron 12 cepas de *Trichoderma*, teniendo a una de ellas como la mejor muestra la cepa ECM6, por su alto contenido de conidios y capacidad antagonista, misma que se hizo cuatro tratamientos con cepas de *Fusarium* obteniendo como mejor tratamiento la AML1-ECM6 por tener un porcentaje de inhibición de crecimiento menor 20,12%; que servirá como un controlador biológico para controlar la Marchitez Vascular del Babaco y mejorar su producción en calidad y cantidad.

Palabras claves: Antagonismo, Cultivo *in vitro*, *Trichoderma*, *Fusarium*. Biocontrol.

## ABSTRACT

Soil sampling was performed on Babaco plantations in the province of Loja in order to obtain native *Trichoderma* isolates to conduct a morphological characterization and discern their biological effectiveness as an antagonist of *Fusarium* spp., which is a prime cause of the Vascular Wilt disease in Babaco (VWB). Sampling was conducted in the cantons of Loja and Saraguro. Rhizosphere soil samples were collected from the Babaco to determine abiotic factors in the development of the VWB and establish the presence of *Trichoderma*. Afterwards, the isolation of *Trichoderma* from the soil samples was conducted using serial dilutions and a TSB medium (Magnesium sulfate, potassium phosphate, ammonium nitrate, potassium chloride, glucose, rose bengal, chloramphenicol, bacto agar and metalaxyl.). Afterwards, *in vitro* screening of the antagonistic effect was carried out using *Trichoderma* spp as a biocontrol agent of the VWB using a dual cultivation technique for which four strains of *Fusarium* and one strain of *Trichoderma* with better morpho-cultural characteristics. Evaluations were performed until the control treatment full box of Petri dishes. Resulted in the obtaining of 12 samples of soils from 5 sector Cochapamba and Carmel sector 7; same presenting Frank sandy soils and think, pH ranging from slightly acid to acid, with medium to high organic matter content, the presence of non-saline and saline soils, and with optimal levels of nutrients for the development of the cultivation and biological controller; morphological characterization was obtained from samples collected, through were 12 strains of *Trichoderma*, overcoming as best sample strain ECM6, for its high content of conidia and antagonist, same capacity that became four treatments with strains of *Fusarium* obtaining as better treatment the AML1-ECM6 to have a percentage of inhibition of lower growth 20,12%; to help control the Vascular wilt of Babaco and improve its production quality and quantity.

**Key words:** Antagonism, In vitro culture, *Trichoderma*, *Fusarium*. Biocontrol.

## I. INTRODUCCIÓN

El Ecuador es un país megadiverso, que cuenta con diferentes microclimas favorables para la producción de cultivos, que son para la exportación al mercado internacional. Dentro de estos productos se encuentra el cultivo de Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*), esta especie es un híbrido endémico del Ecuador; resultado del cruce entre *Carica pubescens* (Chamburo) y *Carica stipulata* (Toronche). Este cultivo tiene una gran demanda para el comercio nacional e internacional, por ser una fruta con elevado contenido de vitamina C, y por poseer una enzima (papaína) que ayuda a la digestión de los alimentos (Bravo, 2005; Uzcátegui, 2007).

Las principales zonas de cultivo de Babaco se encuentran bajo invernadero y a campo abierto, a nivel nacional están en: las provincias de Imbabura (Atuntaqui, Perucho); Tungurahua (Patate y Baños); Pichincha (Tumbaco); Azuay (Gualaceo, Santa Isabel) y Loja (Saraguro, Chuquiribamba y Loja). Tungurahua y Loja constituyen las provincias más representativas en la producción de Babaco en todo el Ecuador (Ampuero, 2004).

Sin embargo, estos cultivos se ven afectados por algunas enfermedades del Babaco; una de estas enfermedades identificadas es la “Marchitez Vascular del Babaco” (MVB) o “Fusariosis, causada por *Fusarium oxysporum*, este es un hongo fito- parásito, que se caracteriza por su gran capacidad de sobrevivencia en el suelo; la infección se inicia a nivel vascular desde el tallo hasta el ápice, luego se propaga por todo el terreno, inhabilitando la siembra de Babaco en un tiempo mediato. Actualmente esta enfermedad es el principal limitante en la producción de este cultivo en el Ecuador, por llegar a distribuirse en todo el país, alcanzando una incidencia de hasta el 100% (Cueva, 2007).

Para dar una posible solución a este problema se está utilizando microorganismos antagonistas de patógenos, como una estrategia promisoriosa para ayudar en la producción del cultivo (Torres *et al.*, 2008). Entre los antagonistas microbianos más estudiados para combatir la “Marchitez Vascular del Babaco” (MVB) o “Fusariosis, se encuentra el género *Trichoderma* (Infante *et al.*, 2009). Sus distintas especies son particularmente efectivas como antagonistas del crecimiento de otros hongos, muchos de ellos patógenos de

plantas como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium* spp. y *Pythium* spp., entre otros (Zeilinger y Omann, 2007; y, Donoso *et al.*, 2008).

En esta investigación se pretende mediante la caracterización morfológica de las cepas nativas de *Trichoderma* aisladas de la rizósfera del Babaco, encontrar géneros antagonistas para la Marchitez Vascular del Babaco (MVB); y, de este modo diseñar una estrategia de biocontrol eficiente, dando una alternativa a los agricultores, a través de la proporción de un controlador biológico, para asegurar que la cosecha esperada sea de cantidad y calidad exportable.

Los objetivos de esta investigación fueron:

- Conocer la diversidad de los microorganismos asociados a la rizósfera del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona), en el Sur del Ecuador
- Determinar factores abióticos de la rizósfera del Babaco
- Realizar pruebas de antagonismo in vitro con *Trichoderma* spp como agente de biocontrol de la MVB.
- Caracterizar morfológica de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp en la rizósfera del Babaco.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Origen, Evolución y Distribución Geográfica del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*).

El Ecuador es un país conocido por su riqueza biológica. Debido a una amplia variabilidad de climas desde el polar hasta el tropical, además posee diferentes zonas ecológicas, que van desde desierto hasta selva tropical, desde el punto de vista de diversidad biológica, nuestro país se encuentra entre los países con más biodiversidad por unidad de superficie en el mundo (Kyndt, 2005).

La amplia biodiversidad en cultivos agrícolas incluyendo a sus ancestros, encontrados en forma silvestre en el Ecuador, hace que nuestro país ofrezca posibilidades únicas para el cultivo de especies no tradicionales como el Babaco cultivo de amplia aceptación en el mercado internacional (Kyndt, 2005; Uzcátegui, 2007).

De acuerdo a clasificación más reciente realizada por Badillo (1997, 2001), afirma que la especie del género *V. heilbornii*, es un híbrido natural partenocárpico (que no posee semillas) y es el resultado de la hibridación interespecífica de las especies *V. stipulata* (Toronche) y *V. pubescen* (Chamburo), cuyo centro de origen radica en los valles interandinos de la provincia de Loja (Scheldeman, 2002).

### 2.2. Características Generales del Babaco

El Babaco es un arbusto herbáceo pequeño que puede alcanzar los 4 m de altura y que por ser un cultivo andino, su organografía, ha sido muy poca estudiada. Es así, que el Babaco posee las siguientes características botánicas:

**Raíz.** Cuando la planta proviene de estacas, presenta raíces unitarias de color café claro (Asturizaga *et al.*, 2006). Tiene una consistencia muy delicada (se quiebran con facilidad), exudan látex cuando se rompen. Después del trasplante, demora en desarrollarse el sistema radical, pero finalmente se forman raíces principales gruesas de consistencia carnosa, que generalmente no alcanzan mucha profundidad (1m o menos), las raíces secundarias alcanzan de 50 - 60 cm de longitud, también son de consistencia carnosa, de color crema amarillento

oscuro; las raíces terciarias y de mayor grado de ramificación son un poco más blancas, delicadas, quebradizas y tienen gran capacidad de retención de agua. En general todo el sistema radicular del Babaco es muy sensible a las enfermedades y al encharcamiento del suelo (Fabara et, al 1985)

**Tallo.** Posee un tallo erecto no leñoso y cilíndrico de color verde cuando es joven y marrón-grisáceo cuando la planta es adulta, además en el tallo presenta cicatrices foliares típicas similares al de otras caricáceas, raramente presenta ramificaciones pero brotes a menudo aparecen alrededor de la base (Asturizaga *et al.*, 2006; Jácome, 2011).

**Hojas.** Las hojas son grandes, en estado adulto pueden llegar a medir hasta los 60 – 80 cm; son de color verde, limbo lobulado con cinco lóbulos (palmolobulares), el haz es verde oscuro mientras que el envés es verde claro; poseen nervaduras bien marcadas muy sensibles. Además poseen un largo peciolo que puede medir 30 cm (AIAIC, 2003; Asturizaga *et al.*, 2006; Jácome, 2011).

**Flores.** Las flores se forman sobre el tronco recientemente desarrollado durante la fase de crecimiento de la planta, todas son femeninas y usualmente solitarias sobre el final de un largo tallo péndulo que se desarrolla en cada axila foliar (Asturizaga *et al.*, 2006). Los pétalos son de color blanco-amarillento-verdoso y sópalos verde-oscuros (Jácome, 2011).

**Frutos.** Los frutos son bayas elipsoidales de color amarillo cuando ha llegado a la maduración completa, no necesitan polinización para desarrollarse, son partenocárpicas y no presenta semillas, es alargado de sección pentagonal, de unos 30 cm de largo y de 6 a 12 cm de diámetro (Asturizaga *et al.*, 2006). Cada fruto puede llegar a pesar entre 300 g y 2 kg, cada planta puede llegar a producir has 50 kg por metro cuadrado. Su pulpa es blanca, muy jugosa, ligeramente ácida cuando madura y baja en azúcar (Jácome, 2011).

Los frutos del Babaco son muy sabrosos, con un sabor y aroma diferente al de la papaya común (Uzcátegui, 2007). Este sabor distintivo ha sido descrito por tener matices de sabor a naranja, frutilla, piña y papaya. El Babaco es principalmente usado en el Ecuador en la preparación de jugo, almibares y es

extensamente usado en cocina para preparar dulces, salsas y una variedad de postres (Ampuero, 2004).

### **2.3. Condiciones Edafoclimáticas**

Las condiciones edafoclimáticas: la altitud ideal para su óptima producción es de 1800 a 2400 msnm (Fabara *et al.*, 1985). La temperatura ideal para el desarrollo y fructificación del Babaco es 15 – 20° C, por lo que no tolera temperaturas muy extremas ya sean inferiores a 14 o superiores a 27° C (Caguana, 2003; Jácome, 2011). La precipitación promedio anual ideal para el cultivo oscila en un rango de 600 a 1500 mm/año (Fabara *et al.*, 1985; Jácome, 2011). El porcentaje de humedad relativa esta alrededor del 60 al 80% y un porcentaje de luminosidad de 4.5 a 5 horas por día (Caguana, 2003; Jácome, 2011).

El tipo de suelo ideal para el Babaco, varían de: franco, franco-arcillo-limoso y franco-arcillo-arenoso y con una capa arable de 0.80 cm y con bastante materia orgánica (3%), con un pH ideal de 7.1 (puede soportar de 5.8 a 8.2 pH); a fin de facilitar su aireación, su drenaje y evitar el ataque de enfermedades radiculares. (Fabara *et al.*, 1985; Caguana, 2003).

### **2.4. El Cultivo del Babaco en el Ecuador**

El cultivo es tradicional en todas las provincias de la serranía ecuatoriana, existiendo zonas de producción comercial en Patate y Baños en la provincia de Tungurahua y en los valles Loja, Pichincha, Imbabura y Carchi. El Babaco produce de 25 a 45 frutos/planta /año, lo que con una densidad de 2500 plantas por hectárea produce entre 50 y 80 toneladas por año (Jacomé 2011).

El Babaco en la actualidad se cultiva en regiones de la sierra ecuatoriana en las provincias de Imbabura, Pichincha, Tungurahua, Chimborazo, Bolívar, Azuay y Loja a altitudes de 1500 a 3000 msnm y una temperatura que varía de 13 a 22°C, estos lugares constituyen las provincias más representativas en la producción de esta fruta (Ampuero, 2004). Scheldeman (2002), afirma que la altitud ideal para la producción del Babaco está entre 1800 a 2400 msnm, además asevera que el principal factor para este cultivo son las bajas temperaturas conocidas como heladas. La producción de esta fruta ha crecido favorablemente y según datos

reportados por INIAP, se ha calculado que la superficie sembrada de Babaco puede llegar de 150 a 200 ha, representados en su mayoría por cultivos bajo invernadero (Núñez, 2008).

## **2.5. Propagación del Babaco**

El Babaco al no poseer semillas, su propagación se la hace solamente por vía asexual o vegetativa. Los métodos de propagación más usados son: por estacas y por injertación. El primero consiste en emplear estacas de plantas maduras de 20 a 25 cm, con diámetro de 4 a 6 cm (Caguana, 2003; Jácome, 2011). Deben tener un corte diagonal (bisel) en la parte superior para evitar que el agua de riego o lluvia se acumule y un corte transversal en la parte inferior para tener una mayor superficie de enraizamiento (Caguana, 2003). Luego de realizar los cortes es aconsejable agregar una hormona de crecimiento o agua azucarada (Caguana, 2003; Jácome, 2011). Este material debe permanecer durante 8 días bajo sombra, tiempo se cicatrizan las heridas, seguidamente, las estacas se desinfectan con un fungicida para evitar el ataque de hongos *Ascomycetes* y *Basidiomycetes*, se procede a la siembra en bolsas con un sustrato que permita la aireación (Caguana, 2003).

El segundo método de propagación más usado en el Babaco, es por injertación. El tipo de injerto más usual es de púa terminal o asa terminal, esta técnica que consiste en podar el patrón a una altura de 10 cm, generalmente se usa especies de *V. cundimarcensis* y *V. stipulata*. Seguidamente se realiza una hendidura diametral longitudinal en la que se injerta al Babaco, con un brote tierno del mismo diámetro que el patrón. Después, se cubre con una cinta plástica especial de buena elasticidad, esto se realiza con el objetivo de favorecer la unión con el patrón y evitar la entrada de microorganismos fitopatógenos. Finalmente, se cubre el material injertado con una bolsa plástica para mantener la temperatura y acelerar la brotación (Fabara *et al.*, 1985; Caguana, 2003).

## **2.6. Principales Enfermedades del Babaco**

Las enfermedades de las plantas pueden ser ocasionadas por cualquier microorganismo fitopatógeno, ya sean hongos, bacterias, virus, nematodos y actinomicetos (Agrios, 2005). Esta son el resultado de la interacción dinámica de

tres factores: el microorganismo fitopatógeno presente en el patosistema, al cual le corresponde la dinámica ecológica de los suelos en cuanto a la diversidad y a la regulación poblacional. La condición del hospedante susceptible, teniendo en cuenta sus etapas fenológica y metabólica y por último el medioambiente especialmente referido a las condiciones edafoclimáticas en las cuales establecemos los cultivos (Guzmán-Piedrahita *et al.*, 2009; Robles, 2011).

### **2.6.1. Enfermedades Fúngicas**

Los hongos son microorganismos filamentosos simples. No tienen clorofila y dependen de una planta hospedera para obtener su alimento. Algunas especies y géneros presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos globalmente. Los hongos ocasionan severos daños en los agroecosistemas del mundo y son los responsables de una baja producción y calidad de alimentos para el consumo humano (Guzmán-Piedrahita *et al.*, 2009). Es así que las enfermedades de origen fúngico son responsables de las mayores pérdidas reportadas en diferentes cultivos, entre ellos el Babaco (AIAIC, 2003; Ampuero, 2004). A continuación se detallan las principales enfermedades fúngicas en el Babaco, las cuales se relacionan con una marcada reducción de las producciones de este cultivo:

**Cenicilla** (*Oidium sp.*). Este patógeno penetra la epidermis de las hojas insertando su haustorio dentro del mesófilo esponjoso que se especializa en la absorción de nutrientes. La enfermedad se inicia por la presencia de aclareos o manchas irregulares de forma difusa y traslúcida, las mismas que provocan clorosis o amurallamiento del tejido. Con el desarrollo de los cleistotecios y condiciones ambientales favorables, la severidad de la enfermedad puede alcanzar hasta el 100% de infección en la planta (Coyago *et al.*, 2010). Las manchas empiezan a extenderse y se cubren con un polvillo blanco que son el resultado de las fructificaciones del hongo y pueden afectar el haz y en envés (Agrios, 2005). Además, de las hojas, esta enfermedad puede atacar los peciolos y los pedúnculos florales.

**Lancha temprana** (*Alternaria sp.*). Presentan síntomas en forma de manchas necróticas de forma redondeadas se encuentran en el interior del limbo de la hoja

y son alargadas si se encuentran en el borde, las manchas afectan en el haz y envés de las hojas, las manchas en el haz de color café claro con abundantes y finos anillos concéntricos, bordes ondulados y sin presencia de halo clorótico (Coyago *et al.*, 2010; Cotacachi, 2013)

En el envés las manchas son idénticas a las del haz, pero su color es café oscuro; el tamaño de las manchas puede variar de 3 a 5 cm de diámetro. Generalmente las manchas se unen cuando el ataque es severo y se observa grandes lesiones con tejido necrótico y quebradizo (Cotacachi, 2013)

**Antracnosis** (*Mycosphaerella* sp.). Esta enfermedad constituye una limitante de la vida útil de los frutos del Babaco, es causada principalmente por *Mycosphaerella* sp., aunque es posible encontrar otras especies de antracnosis causando enfermedades en un mismo cultivo (Caguana, 2003).

La antracnosis, un habitante muy común en los cultivos y con frecuencia presenta síntomas muy variados en forma de manchas necróticas irregulares de apariencia quebradiza, de color blanquecino en la parte central (Caguana, 2003; Coyago *et al.*, 2010). Cuando los frutos del Babaco son infectados, los síntomas aparecen cuando maduran, pequeñas cantidades de látex son exudados del fruto. Al inicio se observan lesiones circulares, hundidas, blandas y limitadas con bordes café claro y traslucidos que se desarrollan en la superficie del fruto. Conforme avanza la enfermedad, las lesiones aumentan de tamaño, algunas de ellas se unen entre sí destruyendo grandes áreas del fruto y alrededor de la lesión la epidermis se endurece y cambia a una coloración negruzca (Agrios, 2005).

**La Enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB).** Llamada también *traqueomicosis* o *traqueobacteriosis*: se la define como un complejo de trastornos vasculares que causan un estado general de la planta que casi siempre termina con la muerte de la misma. Además, las enfermedades vasculares se producen por la invasión del fitoparásito en el sistema vascular de las plantas (xilema y floema), los cuales provocan necrosis de las células que conforman los tejidos conductores; la necrosis es originada por la acción directa del fitoparásito o por las toxinas que este libera. Algunas veces la marchitez

ocasiona la obstrucción de los vasos cribosos del xilema, lo que impide la normal circulación de agua y nutrientes (Agrios, 2005)

Los primeros síntomas que aparecen en las plantas debido a los marchitamientos vasculares son: Las afectaciones en el sistema vascular de la planta, en la cual se puede observar la pérdida de turgencia en la célula, seguido de clorosis, decaimiento general de la planta y finalmente la muerte. Según la naturaleza del fitoparásito se consideran dos tipos de marchitez vascular en plantas: la traqueobacteriosis, causadas por bacterias y la traqueomicosis, por hongos (Agrios, 2005). Como ejemplo de cada una de ellas podemos citar la traqueobacteriosis del maíz, conocida como marchitez bacteriana o enfermedad de Stewart y la traqueomicosis del Babaco, conocida como: La Marchitez Vascular del Babaco (MVB).

Bajo estos antecedentes, la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), se origina en los años de 1990 con el auge en la producción y exportación del Babaco hacia mercados internacionales. En el año de 1996 se observaron la presencia de una enfermedad que atacaba al sistema radicular del Babaco en invernaderos de la sierra centro del país; esta enfermedad produjo la reducción del cultivo en un 100 %. Acabo de corto tiempo esta enfermedad se diseminó a lo largo y ancho del país debido principalmente: al intercambio del material vegetativo entre las diversas zonas productoras del país, al desconocimiento total del microorganismo que ocasionaba la MVB, a la falta de estrategias de control de dicha enfermedad y a la forma de propagación del Babaco (por estacas e injertos) (Ochoa y Fonseca, 2000; Tobar, 2008).

En el año 1999 la MVB pasó de ser una enfermedad en aisladas zonas productoras de Babaco a ser una epifitía de grandes dimensiones que ocasionaba la destrucción total de las plantaciones en todo el Ecuador. Es así que investigadores del INIAP (instituto de Investigaciones Agropecuarias), comenzaron a indagar sobre las condiciones en que se desarrollaba la enfermedad de la MVB y a descubrir el microorganismo causante de la enfermedad (Ochoa y Fonseca, 2000).

En el año 2000, los investigadores del INIAP, Ochoa y Fonseca, lograron aislar y caracterizar morfológicamente el microorganismo causante de la MVB, designándole el nombre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*, los mismos investigadores en el año 2004 cambian el nombre del microorganismo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasconcellae*, debido a que los taxónomos reorganizaron el nombre del Babaco que anteriormente se llamaba *Carica heilbornii* var. *pentagona* en *Vasconcella heilbornii* var. *pentagona* (Badillo, 2001; O'Brien, 2005; Argotti *et al.*, 2010).

El agente causal de la MVB, son hongos pertenecientes al género *Fusarium*, este es un grupo de hongos filamentosos cosmopolitas ampliamente distribuidos, naturalmente se lo encuentra en el suelo y en ocasiones puede estar asociado a las pudriciones de raíces y tallos en muchas plantas cultivadas (Leslie and Summerell, 2006). Muchas especies del género *Fusarium* son saprofitas en algunas fases de su crecimiento y patógenas de cultivos en otras fases (Alexopoulos y Mims, 1996). Un gran número de especies han sido descritas dentro del género *Fusarium* por diversos autores, sin embargo 70 especies son consideradas por Leslie & Summerell (2006).

Los mecanismos de infección de *Fusarium* empiezan cuando los tubos germinales de las esporas, la germinación de las clamidosporas presentes en restos de cosechas anteriores o el micelio existente en el suelo penetran por la raíz o por alguna herida al nivel de las raíces de las plantas, extendiéndose dentro de la corteza de la raíz, a la endodermis y llegando a los vasos xilémicos, a través de ellos asciendo por toda la planta, el micelio se multiplica y produce sus primeras estructuras reproductivas (microconidios), los que causan la obstrucción de los vasos, dando como resultado una alteración en el volumen del agua disponible para las hojas y el funcionamiento de toda la planta, esto trae consigo el cierre de los estomas, las hojas se marchitan y finalmente la planta muere (Agrios, 2005).

### **2.6.2. Enfermedades bacterianas**

Las bacterias son microorganismos simples que consisten de células procariotas individuales unicelulares, microscópicas y no producen esporas. No pueden

producir su energía y dependen de un hospedero para obtenerla y realizar sus funciones vitales. Las enfermedades de las plantas asociadas a las bacterias pueden causar una reducción significativa en la producción del cultivo, problemas reproductivos y hasta la muerte de la planta. La infección suele desarrollarse en las hojas, ya que sus paredes celulares son delgadas y permiten la infección bacteriana comience y avance hasta el resto de la planta. Así tenemos que hay cinco géneros principales de bacterias: *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. La mayoría de las enfermedades en plantas son causadas por los tres últimos géneros (Agrios, 2005). Entre las principales enfermedades bacterianas que atacan al Babaco en el Ecuador tenemos:

**Tumor del cuello** (*Agrobacterium* sp.). Es una bacteria Gram negativa, comúnmente encontradas en el suelo. No forman esporas, poseen forma de bacilo se mueven por medio de 1 a 6 flagelos. Esta bacteria es el principal agente etiológico de la “agalla de la corona”. La infección en el Babaco comienza con la penetración de *Agrobacterium* en el tejido vegetal, a través de lesiones producidas por insectos, labores culturales y por heladas (cambios bruscos de temperatura). Las bacterias son atraídas con compuestos liberados por las plantas (aminoácidos, azúcares y fenoles). Una vez en contacto con las células vegetales de la planta hospedera, la bacteria sintetiza las microfibrillas de la celulosa propiciando una mejor fijación y la enfermedad avanza al resto de la planta (Agrios, 2005).

Los primeros síntomas en el Babaco se localizan en las raíces donde se forman agallas. Estos tumores son de consistencia dura e impiden a las raíces su normal desenvolvimiento en la absorción de agua y nutrientes necesarios para completar su ciclo vital. Cuando el ataque es severo estos abultamientos puede comprometer al resto de las raíces próximas al cuello de la planta, esta se vuelve débil y finalmente muere (Agrios, 2005).

**Pudrición radicular** (*Erwinia* sp.). Todas las especies del género *Erwinia* son patógenas de plantas. Es una bacteria Gram negativa, flagelada y móvil (Agrios, 2005). Esta enfermedad es considerada como la segunda de mayor importancia después de *Fusarium* sp., que ataca al cultivo de Babaco. Su incidencia puede

ser leve, moderada y severa según las condiciones ambientales le sean favorables (Caguana, 2003; Agrios, 2005).

El ataque de *Erwinia* sp., en Babaco empieza con la infección que se inicia con clorosis de las hojas bajas, seguidamente la infección asciende por la planta mientras el resto de las hojas se marchitan y se necrosan. En el tallo se presenta inicialmente un ablandamiento leve y con una muy leve decoloración, conforme avanza la enfermedad los tejidos se ablandan (licuados) hasta su completa descomposición (Caguana, 2003; Agrios, 2005). En los frutos se presenta una necrosis húmeda del tejido, que se ablanda y se licua su pulpa, cuando se parte el fruto no se evidencian los halos de la infección, pero si la lisis del tejido (Agrios, 2005). En algunos casos los frutos infectados con este tipo de bacteria pueden almacenar amoniaco dentro de la pulpa y es expulsado al exterior en forma de burbujas. Asimismo los frutos maduran prematuramente y posteriormente se desprenden. (Caguana, 2003; Agrios, 2005).

### **2.6.3. Enfermedades Causadas por Virus**

Los virus son partículas compuestas por ácidos nucleicos (ADN o ARN) y por capas de proteínas, son de tamaño submicroscópico. Los virus no tienen órganos reproductivos y son parásitos obligados, es decir, que utilizan a las plantas que infectan para poder replicarse, utilizando su propia energía y maquinaria biosintética (Agrios, 2005). Por esta razón el metabolismo de las plantas hospederas de virus se altera diversas funciones vitales que indican al desarrollo de síntomas, que pueden variar desde cambios de color hasta necrosis severa o muerte súbita de la planta. En otros casos el efecto de los virus en las plantas pasa casi de forma imperceptible como en el caso de los hospedantes asintomáticos. (Hull, 2009). Se ha descrito y caracterizados molecularmente a más de 10 000 tipos de virus, pero solo 500 atacan a las plantas (Agrios, 2005). Entre las principales enfermedades causadas por virus que afectan al Babaco tenemos:

Virus del mosaico de la papaya en Babaco (Papayo Mosaic Virus). Es virus largo y flexuoso de aproximadamente 533 X 1113 nm con un ARN genómico de 6 656

nucleótidos y que pertenece al género Potexvirus. Tiene un amplio rango de hospederos, como es el Babaco (Hull, 2009).

El síntoma principal de este virus cuando infecta al Babaco, está dado por la presencia de un moteado verde claro que se observa en las hojas jóvenes. Las plantas infectadas por lo general poseen un menor tamaño y sus hojas son ligeramente más pequeñas que las normales. Cuando la infección es más severa este moteado se torna en un evidente aclaramiento de las venas y las hojas adquieren un aspecto rugoso. Este virus se trasmite por forma mecánica y por medio de estacas provenientes de plantas infectadas (Hull, 2009).

#### **2.6.4. Enfermedades Causadas por Nematodos**

Los nematodos fitoparásitos son animales filiformes multicelulares, generalmente microscópicos (0,5 mm de largo), su cuerpo es delgado cilíndrico y alargado, con el diámetro reducido en los extremos, las hembras son más grandes que los machos, en algunas especies toman diferentes formas. Los nematodos no son segmentados; están protegidos por una cutícula hialina acelular, transparente y semipermeable de proteínas, lípidos y carbohidratos. Estos microorganismos requieren de un medioambiente húmedo; pero pueden encontrarse en casi todo tipo de ambiente ecológico. Invaden tallos, hojas, semillas (Agrios, 2005; Guzmán-Piedrahita *et al.*, 2009). El principal nematodo que ataca al Babaco es: *Meloidogyne incognita* y *Meloidogyne javanica* *Meloidogyne* sp.

Los nematodos del género *Meloidogyne* cuando infectan al Babaco causan agallas en las raíces, interrumpiendo el paso del agua y minerales necesarios para el metabolismo de la planta. Además, causan un crecimiento retardado de la planta, flacidez en los tallos, amarilleamiento y marchitez causándole la muerte a la planta infectada y por ende disminuye drásticamente la producción. Es necesario indicar que el ataque de este nematodo puede ser mediante infecciones posteriores de hongos, bacterias y virus (Cotacachi, 2013).

## **2.7. El Suelo y sus Componentes Microbianos**

El suelo, como cualquier otro ecosistema, es un importante hábitat para miles de organismos asociados como una amplia variedad de hongos, actinobacteria, algas, protozoos y diferentes tipos de bacterias que varían en la fisiología. Estos microorganismos pueden ocurrir en asociación a las partículas de arcilla o materia orgánica y en la rizósfera de plantas esenciales para su metabolismo en sinergismo con raíces de las plantas; este término se puede definir como las tres unidades que interactúan: la planta, el suelo y los microorganismos (Amora-Lazcano, *et al.*, 2010).

Los microorganismos pues se relacionan con procesos de edafogénesis; ciclos biogeoquímicos de elementos como carbono, nitrógeno, oxígeno, azufre, fósforo, hierro y otros metales; fertilidad de las plantas y protección frente a patógenos; degradación de compuestos xenobióticos. Se considera que el suelo es uno de los ambientes más complejos en cuanto a vida microbiana se refiere, que puede contener cerca de 10<sup>9</sup> células bacterianas/gramo de suelo y un estimado de 10<sup>4</sup> especies microbianas diferentes por gramo de suelo (Franco-Correa, 2008).

## **2.8. La Rizósfera de la Planta**

Es la zona biológicamente activa alrededor de las raíces de las plantas que contiene microorganismos, tales como bacterias y hongos, los cuales interactúan entre sí, con la planta y con el suelo. En este sitio se genera una serie de interacciones complejas, debido a una actividad biológica intensa y a una transferencia de agua y nutrientes, que pueden resultar benéficas o dañinas a las plantas. Esto se debe a la existencia en la rizósfera de una amplia gama de compuestos orgánicos tales como exudados radicales de bajo peso molecular como: secreciones, mucigeles, lisados celulares y metabolitos (Cordero-Ramirez, 2008).

### **2.8.1. División de la Rizósfera de la Planta**

Más allá de la anatomía de la raíz, surge un espacio de interacción raíz- suelo, una interface que ha sido denominada rizósfera y en la que es posible distinguir varias regiones:

**Ectorizósfera:** correspondiente a la parte más externa de la raíz en donde se encuentran mucílagos de la raíz y de microorganismos, células desprendidas de la raíz y células bacterianas (intactas y lisadas) que al mezclarse entre sí y con las partículas de suelo forman un complejo denominado mucigel. El Rizoplano o parte superficial (coincidente con la Epidermis de la raíz) y la Endorizósfera que comprende el área desde el rizoplano hasta la región cortical (Prashar, et. al., 2014).

### **2.8.2. Microorganismos Antagonistas de la Rizósfera de los Cultivos.**

Los microorganismos presentes en el suelo ejercen una acción específica cuando se relacionan con una especie vegetal. En la rizósfera existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de microorganismos patógenos vegetales (Jiménez *et al.*, 2009). Entre los cuales tenemos:

**Hongos:** Se ha reportado en estudios de microbiología del suelo en La zona de preservación ecológica de centro de población “la Uva” en Sinaloa, la presencia de hongos micorrízicos arbusculares del *Phylum Glomeromycota* y pertenecientes a los géneros *Glomus*, *Scutellospora* y *Gigaspora*. Así mismo, se han reportado hongos de diferentes clases como se los puede mencionar el hongo fitopatógeno *Phytophthora infestans* y un gran número de fitopatógenos sobre todo de cultivos de importancia comercial; los saprófitos *Crucibulum laevis* y *Cyathus stercoreus*; y algunos de los hongos habitantes de suelos arenosos y arcillosos *Battarrea stevenii* y *Podaxis pistillaris* (López R, 2011).

**Bacterias:** Las rizobacterias se benefician al tomar las sustancias secretadas por las plantas, además de ejercer efectos positivos, directos o indirectos; en algunos casos puede ocasionar una estimulación en el crecimiento. En éste grupo de rizobacterias se incluyen algunos géneros como: *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Enterobacter*, y *Azotobacter*, entre otros, Bacterias de éstos géneros se han utilizado con éxito para el control de diferentes especies de *Fusarium* tanto, en la parte aérea de la planta como en el suelo (Tobar 2008).

De acuerdo a lo anteriormente descrito podemos afirmar que la especie más estudiada y utilizada para el control biológico de diversos patógenos vegetales es el hongo *Trichoderma* spp., debido a que esta especie coloniza diversos nichos ecológicos y posee diversos mecanismos de acción, el cual impide que los microorganismos fitopatógenos puedan generar resistencia y por ende lograr producir alimentos más aptos para el consumo humano (Michel-Aceves, 2006)

## **2.9. *Trichoderma* spp., como Agente de Control Biológico de la MVB**

El principal beneficio de *Trichoderma* para la agricultura, es el antagonismo con microorganismos patógenos de las plantas, por su capacidad para producir secreciones enzimáticas tóxicas extracelulares que causan desintegración y muerte en hongos fitopatógenos que habitan el suelo (micoparasitismo), en la degradación de paredes celulares de las hifas de hongos patogénicos (depredación), en la producción de químicos volátiles y antibióticos antifungales que inhiben hongos basidiomicetos (amensalismo), en la colonización directa del hongo por penetración hifal (predación), en la competencia por oxígeno, nutrientes y espacio en el suelo y por su gran adaptabilidad y rápido crecimiento (Cobos, 2010).

### **2.9.1. Genero *Trichoderma* spp.**

El género *Trichoderma* está clasificado taxonómicamente, según Agrios (2005), en las siguientes categorías:

<b>Reino:</b>	Fungi
<b>División:</b>	Ascomycota
<b>Subdivisión:</b>	Pezizomycotina
<b>Clase:</b>	Sordariomycetes
<b>Subclase:</b>	Hypocreomycetidae
<b>Orden:</b>	Hypocreales
<b>Familia:</b>	Hypocreaceae

**Género:** *Trichoderma*

Especies: *T. aggressivum*, *T. arundinaceum*, *T. asperellum*, *T. atroviride*, *T. aureoviride*, *T. brevicompactum*, *T. citrinoviride*, *T. citrinoviridex*, *T. crassum*, *T. erinaceum*, *H. estonica*, *T. fasciculatum*, *T. fertile*, *T. gamsii*, *T. ghanense*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. longibrachiatum*, *T. minutisporum*, *T. asperellum*, *H. neorufa*, *H. nigrovirens*, *T. oblongisporum*, *T. ovalisporum*, *T. pleurotica*, *T. polysporum*, *T. pseudokoningii*, *T. pubescens*, *T. reesei*, *T. saturnisporum*, *T. spirale*, *T. strictipile*, *T. strigosum*, *T. stromaticum*, *T. tomentosum*, *T. virens*, *T. viride*, *T. viridescens* (Samuels et al. 2010).

### **2.9.2. Caracterización Morfológica**

Las colonias de *Trichoderma* presentan crecimiento rápido, que va formando una colonia delgada de sobre la superficie del agar, debido a la conidiación que presenta a través de su desarrollo. Las colonias al comienzo son lisas o casi transparentes y algunas veces blancas, posteriormente se presentan penachos blancos y algodonosos, de micelio blanco, conformando una red densa, responsable del pigmento característico (Tobar, 2008).

Las especies del género *Trichoderma* presentan conidióforos complejos y altamente ramificados en forma piramidal o cónica dando origen a esterigmas, con extremos ahusados. Al microscopio las fiálides se observan más estrechas en la base que en la parte superior, permitiendo una buena correlación entre el sistema de ramificación del conidióforo y la disposición de estas. Microscópicamente muchas especies del género crecen rápidamente en cultivos artificiales y produce un largo número de pequeñas conidias verdes o blancas de células conidiogenas situadas al final de conidioforos extensamente ramificados.

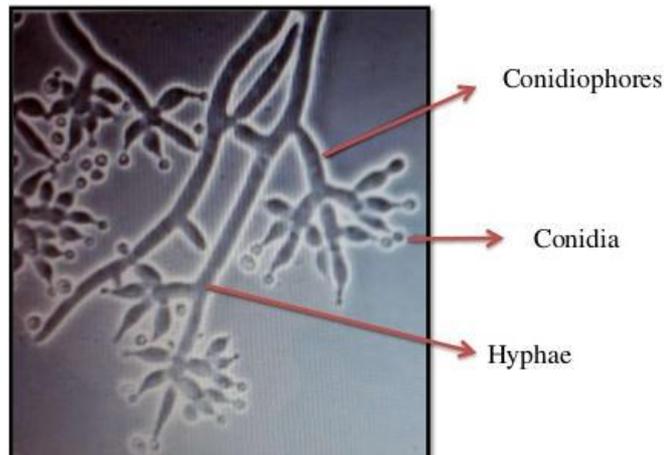


Figura 1. Morfología externa de *Trichoderma* spp.  
Fuente: Singh, et al. 2007

Esta característica permite una relativa fácil identificación de *Trichoderma* como género, se presentan diferencias entre especies del genero de acuerdo al tipo de suelo y temperatura y contenido de humedad (Michel-Aceves, 2001).

*Trichoderma* ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Se reporta varios mecanismos demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma* actúa como biocontrolador y como colonizador de las raíces (Cueva, 2007). Entre los principales mecanismos antagónicos utilizados por *Trichoderma* spp., se puede mencionar los siguientes: Antibiosis, Micoparasitismo, Competencia y la Inducción de resistencia secundaria en el hospedero (Cueva, 2007).

### 2.9.3. Condiciones favorables para *Trichoderma* spp.

*Trichoderma* es un hongo anaerobio facultativo que se encuentra en suelos agrícolas y otro tipo de medios. Se puede desarrollarse en suelos con alto contenido de materia orgánica, restos de cosecha, sobre madera, donde exista abundante presencia de raíces o en sitios con predominio de hongos fitopatógenos, pudiéndose adaptar satisfactoriamente a condiciones climáticas extremas (Gams y Bissett, 1998).

El espectro de luz influye en el desarrollo de *Trichoderma*, fundamentalmente sobre la esporulación. Las colonias del hongo que se desarrollan bajo condiciones de luz alterna, son blancas y algodonosas al inicio y después tonadas concéntricas, alternando una banda delgada hialina con otra ancha de

color verde oscuro, mientras que bajo luz continua son uniformes de color verde oscuro. La luz influye además, en la producción de metabolitos secundarios (Rodríguez *et al.* 2013).

Es importante para que el hongo se desarrolle más rápido, un suelo posea un pH que oscile entre 5.0 a 6,5, es decir, que puede adaptarse a suelos más o menos ácidos, y que tenga la capacidad de tolerar a los químicos o al calor que se puede aplicar al suelo, para garantizar su sobrevivencia. El desarrollo de *Trichoderma* se activa con la presencia de la humedad, con óptimo de 60% de la capacidad de retención de humedad del suelo. A porcentajes mayores de saturación, la colonización y sobrevivencia disminuyen por baja disponibilidad de oxígeno (Rodríguez *et al.*, 2013).

*Trichoderma* puede estar influenciado por la temperatura del suelo en términos de su distribución mundial. *T. harzianum* generalmente es aislado de suelos cálidos mientras que *T. polysporum* y *T. viride* se encuentran mayoritariamente en regiones templadas-frías y *T. hamatum* y *T. koningii* están ampliamente distribuidas en áreas que poseen una diversidad climática. El rango de temperaturas en las que pueden crecer es bastante amplio; puede ser tan bajo como 0°C en el caso de *T. polysporum* y tan alto como 40°C para *T. koningii*. Además de afectar el crecimiento de *Trichoderma* spp., la temperatura puede afectar también su actividad metabólica como la producción de antibióticos volátiles y enzimas (Bourguignon, 2008).

Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* spp. la posibilidad de ser utilizado en diferentes suelos, cultivos, climas y procesos tecnológicos (Páez *et al.*, 2007).

#### **2.9.4. Mecanismos de Acción.**

Han sido varios los mecanismos de acción reportados con los cuales el género *Trichoderma* ha logrado controlar el crecimiento y desarrollo de varios patógenos. Sin embargo, los principales que se reportan son el micoparasitismo, la antibiosis y la competencia por espacio y por nutrientes (Harman, 2000). De forma indirecta presenta otros mecanismos, entre ellos se encuentran la resistencia inducida, tolerancia al estrés mediante la producción de raíces,

inactivación de enzimas producidas por patógeno, entre otros (Harman, 2000). De acuerdo con Jensen y Wilffhechel (1995), puede utilizar varios mecanismos a la vez para hacer más efectivo su antagonismo. Esta diversidad de mecanismos le permiten a *Trichoderma* spp. Ser excelentes antagonistas y exitosos colonizadores de un gran número de hábitat (Schuster y Schmoll, 2010).

#### **2.9.4.1. Antibiosis**

El mecanismo de antibiosis que ejerce *Trichoderma* spp. es mediante la producción de enzimas hidrolíticas o bien por metabolitos secundarios. Mediante antibiosis se inhibe el desarrollo del patógeno o se causa la muerte del organismo por un compuesto metabolizado por el otro organismo. Cuando se lleva a cabo una interacción antagonista-patógeno se producen enzimas líticas extracelulares y antibióticos por parte del antagonista que inhiben el crecimiento del patógeno Howell (2003). *Trichoderma* produce distintos metabolitos secundarios, los cuales dependen de la cepa y los divide en tres grupos; Peptaiboles (oligopeptidos lineales), antibióticos polares (ácido heptelídico) y antibióticos volátiles (6-pentil- $\alpha$ -pirona). Algunas especies de *Trichoderma* producen compuestos antifúngicos que actúan sobre *R. solani* y *R. rolfsii* y que ocasionan la desintegración de las hifas Martínez *et al.* (2013).

#### **2.9.4.2. Competencia**

Se presenta cuando el espacio y nutrientes son un factor limitante. La competencia puede dividirse en competencia saprófita por nutrientes en el suelo y la rizósfera, y competencia por sitios de infección sobre y dentro de la raíz. La competencia por nutrientes puede ser por Nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina y pectinas, entre otros) y micro elementos (Infante *et al.* 2009). Las especies de *Trichoderma*, aplicadas al suelo o a las semillas, crecen fácilmente junto con el desarrollo del sistema radicular de la planta tratada. La competencia depende de las características del agente bio controlador tales como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, así como de factores externos como el tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Howell, 2003; Infante *et al.*, 2009).

### 2.9.4.3. Micoparasitismo

Este es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas (Harman, 2006):

**Crecimiento quimiotrófico:** donde *Trichoderma* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes.

**Reconocimiento:** Se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato

**Adhesión y enrollamiento:** Ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno.

**Actividad lítica:** 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*.

El micoparasitismo concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula hospedante, mostrando síntomas de disgregación. 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 aislamiento de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del ambiente (Woo *et al.*, 2006).

### 2.9.5. Estudios realizados

#### 2.9.5.1. Aislamiento e identificación de los hongos antagonistas

En el estudio realizado por Aquino-Martínez (2007), denominado Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. *dianthi* (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans., con Hongos Antagonistas Nativos de la Zona Florícola de Villa Guerrero, Estado de México, menciona que en las cinco localidades que realizaron aislamientos obtuvieron hongos antagonistas asociados a la rizósfera

de plantas de clavel. Las cepas correspondieron a *Trichoderma* spp. (24), *Trichoderma lignorum* (Tode) Harz (7), *Trichoderma harzianum* Rifai (4) y *Gliocladium* spp. (10). Estos resultados se confirman con los encontrados por Michel-Aceves *et al.*, (2006), quienes obtuvieron cepas nativas de *Trichoderma* spp. de la rizósfera de clavel y de otros cultivos. Los ecosistemas agrícolas contienen gran cantidad y diversidad de microorganismos benéficos (Duffy *et al.*, 2003), por lo que no es raro que se hayan aislado hongos antagonistas de todas las muestras colectadas. La especie más común *T. harzianum*, sólo se encontró en una localidad, pero, el género *Trichoderma* está presente en todas las localidades, lo que resalta su amplia distribución (Woo *et al.*, 2006). Las dos especies de *Trichoderma* identificadas en la zona han sido reportadas como agentes de biocontrol de diversos hongos patógenos del suelo como *Fusarium* spp. (Michel-Aceves *et al.*, 2001, 2006). A diferencia de *Gliocladium* spp., los hongos del género *Trichoderma* son los que más se han estudiado en el biocontrol de hongos patógenos del suelo, debido a su amplia distribución en los suelos del mundo (Harman, 2006; y Woo *et al.*, 2006).

#### **2.9.5.2. Pruebas de antagonismo**

Quirola *et. al.*, 2012., menciona que en la evaluación de la actividad antagónica mostró diferencias entre los tratamientos ( $P < 0.001$ ); donde el aislamiento Tr003 y el producto comercial *T. lignorum* presentaron los mayores porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp. con 94.2 y 93.6%, respectivamente. Según la escala propuesta por Bell *et. al.*, (1982), el aislamiento nativo Tr003 fue clasificado como clase 4, ya que invadió totalmente la superficie del patógeno y esporuló sobre él.

Avendaño *et. al.*, (2006), en pruebas de antagonismo *in vitro* con *Trichoderma* spp. encontraron igualmente inhibiciones del crecimiento de *F. oxysporum* con invasión total del micelio de los patógenos siete días después de la aplicación.

Según Tobar (2008), los aislamientos de *Trichoderma* spp., inhibieron el crecimiento de *R. solani* hasta 63.67% después de 72 horas. Sin embargo, Melo y Faull (2000), demostraron que *T. harzianum* y *T. koningii* inhibieron entre el 79-82% del crecimiento micelial de *R. solani*, demostrando diferentes mecanismos

de acción, donde *T. harzianum* está como parasita y destruye el micelio de *R. solani* y *T. konningii* produce cantidades considerables de antibióticos.

Barocio (2012), menciona que de once aislados realizados obtuvo, que en el tratamiento con *Trichoderma* sp. (VC1) presentó diferencia significativa con respecto al testigo (hongo patógeno sin antagonista) obteniendo 45.3% de inhibición para *F. oxysporum* y 48.06% contra *F. subglutinans*. Estos resultados se encuentran dentro del rango de inhibición obtenido por Michel – Aceves (2001), donde *Trichoderma* spp., presentó inhibiciones de 25.2% a 69.5% sobre *F. oxysporum* y para *F. subglutinans* un rango de 30% a 73% de inhibición. Así mismo, con *T. harzianum* se obtuvo 48% de inhibición sobre *F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Srivastava et al., 2010).

Salazar et al., (2011), obtuvieron porcentajes de inhibición de crecimiento de *F. oxysporum* de 13.2% hasta 54.4% por *Trichoderma* spp., aislados de zonas productoras de tomate (suelo), por lo tanto la cepa utilizada en el trabajo presentó una buena capacidad antagónica.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Ubicación General**

La presente investigación se llevó a cabo en los cantones de Loja, parroquia de Chuquiribamba, sector el Carmelo; y, cantón Saraguro, sector Cochapamba; de donde se tomaron las muestras de suelo. Los análisis de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja.

#### **3.2. Ubicación Político – Geográfica**

##### **3.2.1. Laboratorio de Biotecnología**

El Laboratorio de Biotecnología se encuentra ubicado en la parroquia San Sebastián, al sur de la ciudad y provincia de Loja. Geográficamente se encuentra en las siguientes coordenadas: latitud  $04^{\circ} 08' 00''$  S, longitud  $79^{\circ} 12' 00''$  W y una altitud de 2 134 msnm (CINFA, 2012)

##### **3.2.2. Georeferenciación de los cantones estudiados**

###### **3.2.2.1. Cantón Loja**

Se encuentra ubicado en la provincia de Loja. Entre las coordenadas geográficas  $03^{\circ} 54' 03''$  hasta los  $04^{\circ} 01' 58''$  de latitud sur y  $79^{\circ} 10' 03''$  hasta los  $79^{\circ} 15' 00''$  de longitud oeste, con una altitud que oscila entre 2 050 a 2 445 msnm (CINFA, 2012).

###### **Parroquia Chuquiribamba (SECTOR EL CARMELO)**

Se encuentra ubicado en la provincia de Loja. Entre las coordenadas geográficas  $30^{\circ} 50' 36,94''$  de latitud sur y de  $79^{\circ} 20' 38,95''$  longitud oeste, con una altitud que oscila entre 2920 a 2150 msnm.

###### **3.2.2.2. Cantón Saraguro**

El cantón Saraguro se encuentra ubicada al noreste de la provincia de Loja, a 64 km del norte de la ciudad de Loja. Entre las coordenadas  $03^{\circ} 31' 38''$  a  $04^{\circ}$

30' 20" de latitud sur y 79° 43' 41" a 80° 60' 30" de longitud sur, a una altitud de 2 000 a 3 500 msnm (CINFA, 2012).

### Comunidad Cochapamba.

Se encuentra ubicada a 9,86 km de la Cabecera Parroquial de Tenta perteneciente a la cabecera cantonal Saraguro. Entre las coordenadas 02°47'41.10" de latitud sur y 79°25'39.10" de longitud oeste, a una altitud de 2 000 a 3 500 msnm.

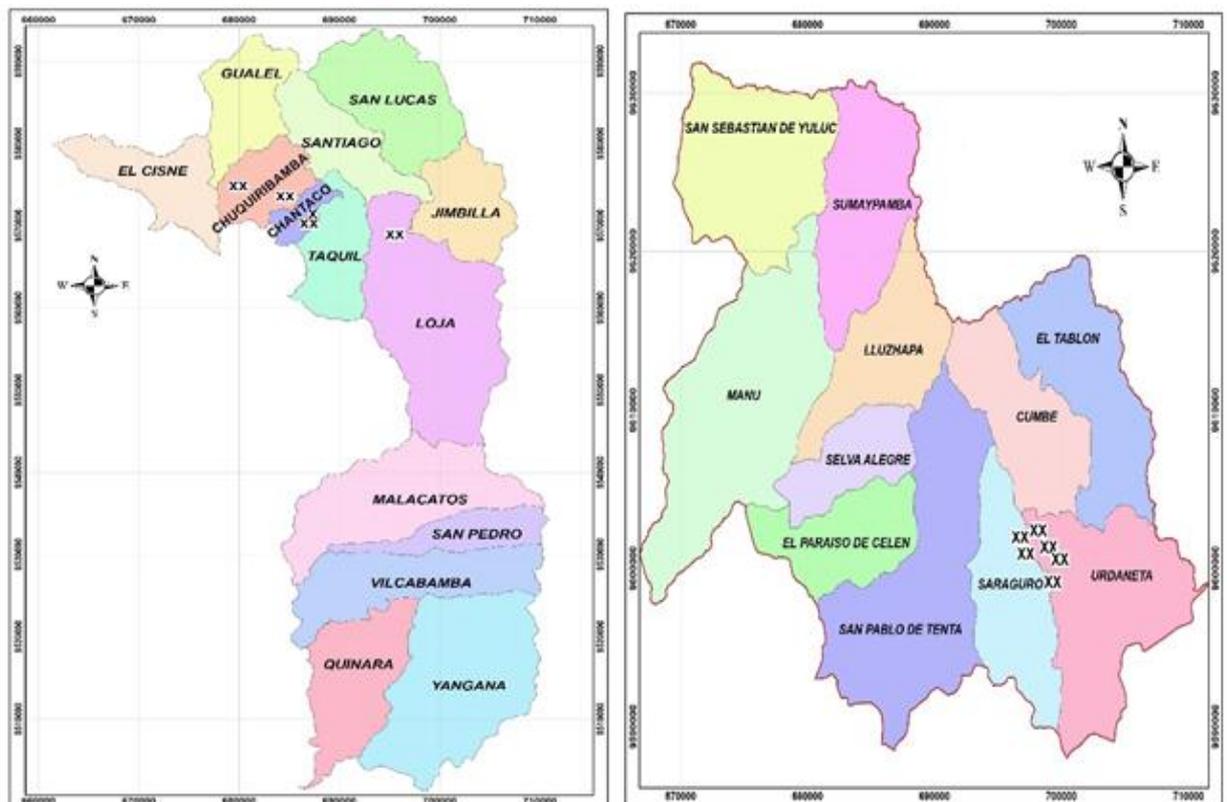


Figura 2. Mapa del cantón Loja y de Saraguro (CINFA, 2012).

### 3.2.3. Clima y ecología

Según el sistema de clasificación de zonas de vida de Holdridge, la zona de Loja pertenece a la formación bosque seco montano bajo (bs-MB), con una temperatura promedio de 16 °C y precipitación de 800 mm. El cantón Saraguro tiene una precipitación media anual de 776 mm, con una temperatura que oscila entre los 8 - 27 ° C y zona de vida según Holdridge, bosque húmedo montano bajo (bh – MB).

### **3.3. Materiales**

#### **3.3.1. Materiales de campo**

GPS, libreta, cámara, palas, fundas plásticas, material de aseo, tierra.

#### **3.3.2. Materiales de escritorio**

Computadora, libreta de campo, registros y documentos digitales.

#### **3.3.3. Material de laboratorio**

Los materiales utilizados en el laboratorio para determinar los factores abióticos, aislamientos, pruebas de antagonismo y caracterización morfológica fueron: tubos de ensayo, estufa, baño maría, matraz, varilla de agitación, espátula, masking, algodón, alcohol potable, alcohol industrial, plato caliente, balanza analítica, bisturí, haza microbiológica, pinzas, parafina, vortex, incubadora orbital, gradillas para tubos de ensayo, lápiz graso, matraz erlenmeyer, vasos de precipitación, cajas de Petri, papel aluminio, guantes quirúrgicos, mascarillas, papel de filtro, mango de bisturí, cubre y porta objetos, tubos eppendoff, gasa, ligas, cámara de Neubauer, cámara de flujo laminar, mecheros, autoclave, embudos, microscópicos, cámara fotográfica, equipo personal de laboratorio, incubadora, guantes plásticos, fundas plásticas, etiquetas, marcadores, tijeras, pipetas, probetas.

#### **3.3.4. Reactivos**

Los reactivos utilizados para los análisis de laboratorio fueron:

- Medio PDA (Papa Dextrosa Agar)
- Medio TSB, Sulfato de magnesio, fosfato di potásico, nitrato de amonio, cloruro de potasio, glucosa, rosa de bengala, cloranfenicol, bacto agar, metalacxyl.
- Caldo papa dextrosa

### 3.3.5. Materiales biológicos

Se utilizaron cuatro aislados de *Fusarium* spp., de los cantones de Loja y Saraguro, caracterizados morfo-cultural, molecular y patogénicamente (Armijos y Salinas, 2013; Gómez y Macas, 2013) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislados de *Fusarium* spp., identificados morfológica y molecularmente.

Código de Aislado	Pares de Bases	Accesión	Identidad (Blastn)	Especie
CHA1	364 bp	KF214790	100%	<i>Fusarium oxysporum</i>
QUI2	366 bp	KF214790	100%	<i>Fusarium oxysporum</i>
AML1	373 bp	FR822779	100%	<i>Fusarium</i> sp.
AML2	360 bp	JX045800	99%	<i>Fusarium oxysporum</i>

Leyenda: CHA (Chantaco), QUI(Quishquinchir), AML(Amable María)

### 3.4. Metodología

#### 3.4.1. Metodología del primer objetivo “Determinar factores abióticos de la rizósfera del Babaco”

##### 3.4.1.1. Colecta de muestras para el análisis de los suelos en plantaciones de Babaco

Con la ayuda de un barreno se colectó muestras de suelo en la rizósfera del Babaco a una profundidad de 5 cm en plantas enfermas con cilindros koppec para los análisis físicos y 2 kg de suelo se colocaron en fundas plásticas (ziploc) debidamente identificadas para análisis químicos, y fueron llevadas al Laboratorio de Análisis de Suelos y Aguas de la Universidad Nacional de Loja, Ecuador, para el análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo.

#### **Determinación de las propiedades físicas del suelo asocias a la MVB.**

Estas propiedades se determinaron según Jaramillo, 2002, sobre una muestra no disturbada de 1000 g, tomadas sobre un radio de 0,50 m a partir de la base del tallo de cada una de las plantas evaluadas. Se utilizaron las siguientes metodologías: Densidad Aparente (Da) por el método de cilindro o anillo

volumétrico (Apéndice 1) y Capacidad de Campo (CC), Punto de Marchitez Permanente (PMP) y Lámina de Agua Aprovechable (LAA) por el método de la curva de retención del agua en el suelo (Jaramillo, 2002) (Apéndice 2)

### **Determinación de las propiedades químicas del suelo asocias a la MVB.**

Se tomaron muestras compuestas de la zona de influencia de la raíz, en los primeros 10 cm de profundidad, para cada unidad muestreada. Las propiedades químicas se determinaron siguiendo la metodología estándar usada en el laboratorio de suelos de la Universidad Nacional de Loja. Se cuantificó el pH (método del potenciómetro), Materia Orgánica (MO) (método de Walkley-Black), Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) (método del formaldehído), Textura (método de Bouyucos) y la conductividad eléctrica (método del conductímetro) (Apéndices 3, 4, 5, 6 y 7).

#### **3.4.1.2. Datos Climáticos**

Se realizó un estudio de la incidencia local de la enfermedad y se analizaron los datos climáticos que fueron facilitados por la estación climática “La Argelia” situada en la Universidad Nacional de Loja desde los años 2013 – 2014. Se utilizaron datos de temperatura, heliofania, pluviosidad y humedad relativa para intentar correlacionar los momentos de máxima expresión de la sintomatología enfermedad con los datos que fueron proporcionados por la estación “La Argelia”. (Apéndice 8)

#### **3.4.2. Metodología para el segundo objetivo “Realizar pruebas de antagonismo in vitro con *Trichoderma* spp como agente de biocontrol de la MVB”.**

##### **3.4.2.1. Pruebas de antagonismo**

La capacidad antagónica de *Trichoderma* fue evaluada enfrentando este hongo con cada una de las cepas de *Fusarium* (Cuadro 1) mediante cultivo dual (Cherif y Benhamou, 1990). Para ello fue necesario poner en cajas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA discos), dos de micelio activo (cultivo de 48 hrs) de 4mm de diámetro, uno de *Trichoderma* y otro de *Fusarium*. Los discos

se colocaron al mismo tiempo, opuestos y equidistantes de tal forma que el patógeno quedó frente al antagonista. Se utilizaron tratamientos control los cuales consistían en poner un disco de 3 mm de diámetro de micelio activo del patógeno en el centro de una caja de Petri. Cada tratamiento incluido los controles se realizaron bajo un diseño completamente al azar con cinco repeticiones. Finalmente se rotularon cuidadosamente cada una de las cajas, se sellaron con papel Parafilm y se incubaron a  $28 \pm 1$  °C.

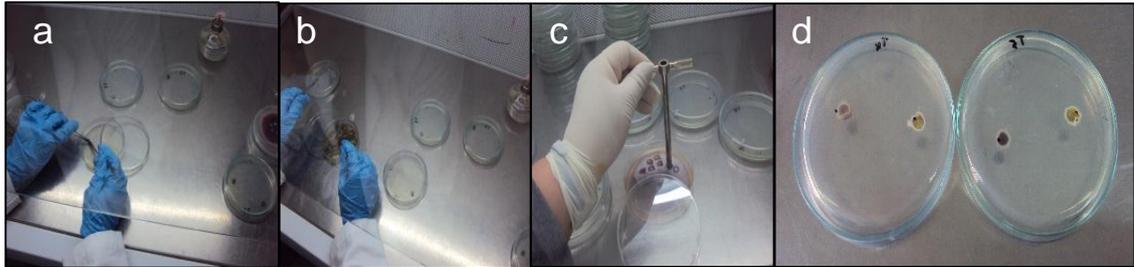


Figura 3. Procedimiento para realizar cultivos duales.

Elaborado por: Villa, 2015 (Laboratorio de Microbiología Vegetal).

Tanto el crecimiento del antagonista como el crecimiento del patógeno fueron registrados cada 24 horas con un calibrador digital tipo pie de rey y los valores se expresaron en milímetros. La toma de datos finalizó hasta que el patógeno colonizó toda la caja en el tratamiento control.

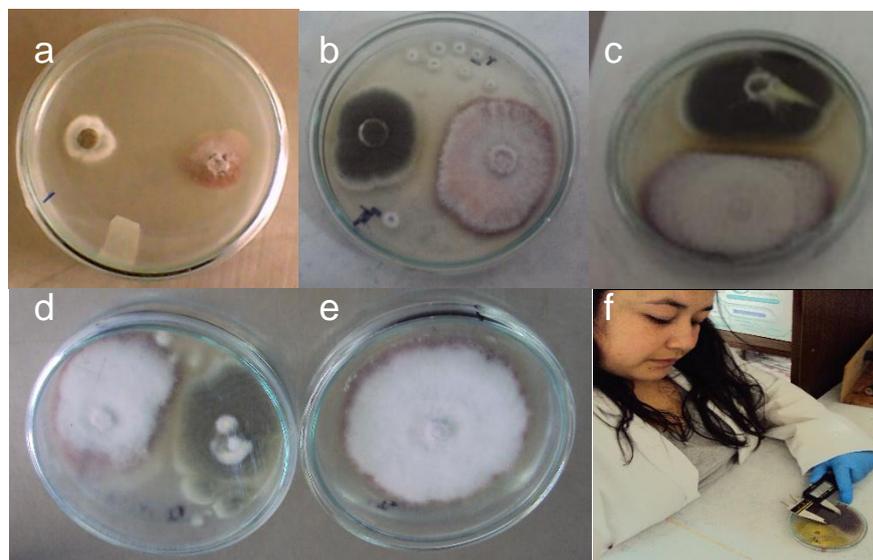


Figura 4. . Evaluación de enfrentamiento dual *Trichoderma-Fusarium*.

Elaborado por: Villa, 2015 (Laboratorio de Microbiología Vegetal).

Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) usando la fórmula:

$$\text{PICR} = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno con el antagonista (Anoop and Bhay, 2014; Mokhtar y Dehimat, 2015).

### 3.4.3. Metodología del tercer objetivo “Caracterizar morfológicamente las diferentes cepas de *Trichoderma* spp aisladas de la rizósfera del Babaco”.

#### 3.4.3.1. Sitios de muestreos

Para realizar este estudio se recolectaron 15 muestras al azar de suelo rizosférico del Babaco de la provincia de Loja en los cantones: de Loja, parroquia Chuquiribamba, sector el Carmelo y en el cantón Saraguro, sector Cochapamba (Figura 2), durante los meses de Noviembre a Diciembre del 2014. En cada sitio de muestreo se colectaron 2 submuestras de aproximadamente 1 kg de tierra a 10 cm de profundidad, descartado los primeros 5 cm de superficie de suelo. Las muestras se transportaron en bolsas de plástico (ziploc) al Laboratorio de microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, donde se mezclaron, homogenizaron y se conservaron a temperatura ambiente hasta su procesamiento.



Figura 5. Recolección de muestras de suelos del cantón Loja y Saraguro

Elaborado por: Villa, 2015 (Laboratorio de Microbiología Vegetal).

#### 3.4.3.2. Aislamiento y caracterización morfológica de *Trichoderma* spp.

El hongo antagonista se aisló mediante la técnica de diluciones seriadas o decimales, la cual consistió en diluir 1 g de suelo en un tubo de ensayo de vidrio

con 9 ml de agua destilada estéril, a continuación se agitó con la mano durante cinco minutos. De la primera dilución se tomó 1 ml y se depositó en un tubo de ensayo con tapa rosca que contenía 9 ml de agua destilada estéril, se agitó durante 30 segundos aproximadamente en un agitador vórtex. Este procedimiento se repitió por cuatro veces hasta obtener soluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$ , de las dos últimas soluciones se tomaron con una micropipeta 0.3 ml y se colocaron en una caja de Petri con medio selectivo TSB (Sulfato de magnesio 0.20 gr, Fosfato di potásico 0.90 gr, Nitrato de amonio 1 gr, Cloruro de potasio 0.15 gr, Glucosa 3.0 gr, Rosa de bengala 0.15 gr, Cloranfenicol 0.25 gr, Bacto agar 25 gr, Metacaxyl 0.01 gr y 1000 ml agua destilada estéril) con ligeras modificaciones (Michel-Aceves, 2001; Kumar *et al.*, 2018), enseguida se incubó durante siete días a una temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 1$ . Crecieron varias colonias de hongos, algunas con características morfológicas propias del género *Trichoderma* spp., como es la coloración verde brillante (Michel-Aceves, 2001). Los aislados fueron purificados por medio de punta de hifa y fue crecido en Agar-Papa-Dextrosa (PDA).

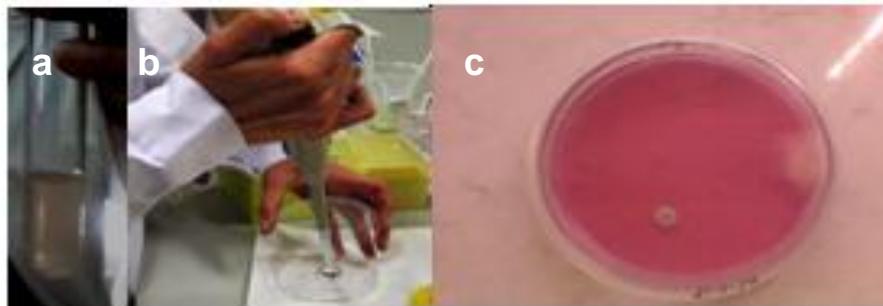


Figura 6. Aislamiento y purificación de *Trichoderma*, a) diluciones; b) aislamiento, c) crecimiento de colonias de hongos en medio TSB.

Elaborado por: Villa, 2015 (Laboratorio de Microbiología Vegetal).

La caracterización de los aislados (*Trichoderma*), fue con base a sus características morfológicas macroscópicas, tomando en cuenta su aspecto, color y superficie de la colonia desarrollada en medio PDA. La identificación microscópica de los aislados fue con base a las características del género como son conidióforos hialinos, ramificaciones, no verticilados; fialides individuales o en grupo, conidios hialinos de una célula, ovoides y globosas, nacidos de

pequeños racimos terminales (Chaverri y Samuels, 2003). Las cepas se mantuvieron a 4°C hasta realizar las pruebas de antagonismo.

La medición y caracterización de las estructuras reproductivas (microconidias) de cada uno de los aislados, se realizaron con la técnica de los microcultivos en porta objetos cóncavos en medio PDA, los cuales se incubaron a  $\pm 28^{\circ}\text{C}$  por 72 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron las muestras al microscopio óptico (Olympus Serie: 1D81617, Japón). El valor micrométrico usado fue de 1  $\mu\text{m}$  en el objetivo de 40X y de esta forma se determinó el tamaño de las estructuras reproductivas. Se realizaron mediciones de 100 microconidas elegidas al azar para determinar el tamaño promedio de las mismas (Castaño-Zapata, 1998).

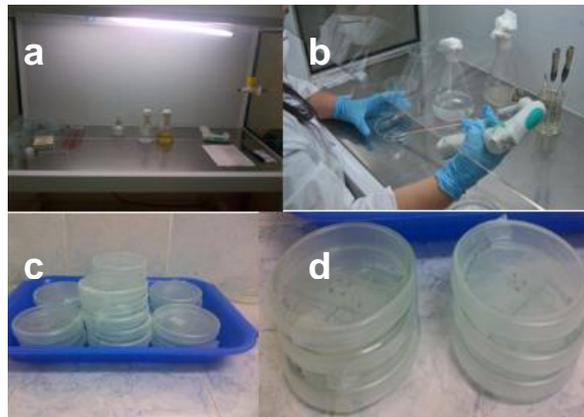


Figura 7. Elaboración de micro-cultivos, a) materiales en la cámara de flujo laminar, b) micro cultivo, c) sellado se micro cultivos, d) incubación.

Elaborado por: Villa, 2015 (Laboratorio de Microbiología Vegetal).

Además, de estas mediciones se realizó el conteo de conidios por cada uno de los aislados, llevándose a cabo mediante el método de conteo por cuadrantes en cámara Neubauer doble (Depth, Alemania) con un aumento de 40X. El cálculo de la concentración final de unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizó la fórmula descrita por Rojas-Triviño, (2011).

$$\text{Concentracion (UFC)} = \frac{\text{Número de células} \times 10000}{\text{Número de cuadrantes contados}}$$

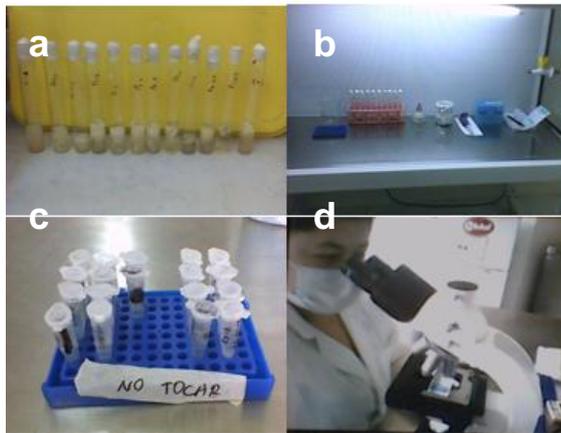


Figura 8. a) *Trichoderma* en medio líquido, b) cernido de micelio, c) medio líquido con conidios de *Trichoderma*, c) Conteo de conidios de *Trichoderma* en la cámara de Neubauer.

Elaborado por: Villa, 2015 (Laboratorio de Microbiología Vegetal).

La identidad a nivel de género de cada uno de los aislados fúngicos fue establecida teniendo en cuenta los parámetros expuestos en párrafos anteriores. Además se utilizaron las claves detalladas de: Barnett y Hunter (1987); Chaverri y Samuels (2003); Jaklitsch, (2015) para las género de *Trichoderma* e *Hypocrea*.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Determinar factores abióticos de la rizósfera del Babaco

#### 4.1.1. Determinación de las propiedades físicas del suelo asocias a la MVB

Cuadro 2. Determinación de las propiedades físicas del suelo asocias a la MVB, de la provincia de Loja, cantón Loja, parroquia Chuquiribamba, sector El Carmelo; cantón Saraguro, sector Cochapamba

Propiedades	Saturación %	Capacidad de campo 1/10 atmosferas	Capacidad de campo 1/3 atmosfera	Punto de marchitez 15 atmosfera:	Densidad aparente g/cm <sup>3</sup>	Agua aprovechable Cm
<b>COCHAPAMBA</b>	42,15	38,03	35,70	17,30	1,18	20,73
<b>EL CARMELO</b>	33,93	26,84	24,77	15,34	1,40	11,50

#### 4.1.2. Determinación de las propiedades químicas del suelo asocias a la MVB

Cuadro 3. Determinación de las propiedades químicas del suelo asocias a la MVB, de la provincia de Loja, cantón Loja, parroquia Chuquiribamba, sector El Carmelo; cantón Saraguro, sector Cochapamba.

Propiedad	Unidades de medida	Método	Lugar		Interpretación	
			COCHAPAMBA	EL CARMELO		
Textura	%	Bouyucos	Ao	68,6	30,6	Arcilloso
			Lo	21,8	26,8	
			Ac	9,6	42,6	
Materia orgánica	%	Walkley-Black	8,69	3,05	Medio	
pH		Potenciómetro	4,96	6,19	Ligeramente ácido	
N	Ppm	Formaldehido	91,88	22,86	Bajo	
P2O5	Ppm	Formaldehido	186,97	179,26	Alto	
K2O	Ppm	Formaldehido	346,83	322,62	Alto	
Ca	meq/100ml	Formaldehido	5,34	8,75	Alto	
Mg	meq/100ml	Formaldehido	1,23	2,98	Alto	

<b>Fe</b>	Ppm	Formaldehido	63,21	Alto	75,56	Alto
<b>Mn</b>	Ppm	Formaldehido	21,06	Alto	6,22	Medio

De acuerdo al análisis textural se tiene que Chuquiribamba tiene suelos arcillosos, con pH ligeramente ácido, con mediana cantidad de materia orgánica y un bajo contenido de N y Cu; con un alto contenido de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, Ca Mg y Fe; en cuanto a Mn tiene un contenido medio y con una conductividad eléctrica que da como resultado que los suelos son no salinos.

En cambio los suelos de Cochapamba son franco arenosos, con un pH muy ácido, alto contenido de materia orgánica y nutrientes como: N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O, Fe y Mn; mientras que Ca y Mg tiene un contenido medio; y, el Cu es bajo en este análisis; en cuanto a conductividad eléctrica son suelos salinos.

#### 4.1.3. Datos Climáticos

La mayoría de las plantaciones muestreadas durante los años 2013 y 2014, presentaron problemas de MVB. Debido a diferencias significativas que presentaron en los meses de octubre, noviembre y diciembre 2013 frente al año 2014 (Figuras 3 y 4); en los parámetros de la temperatura, precipitación, humedad relativa y heliofania en los dos cantones (Loja y Saraguro) estudiados de la provincia de Loja.

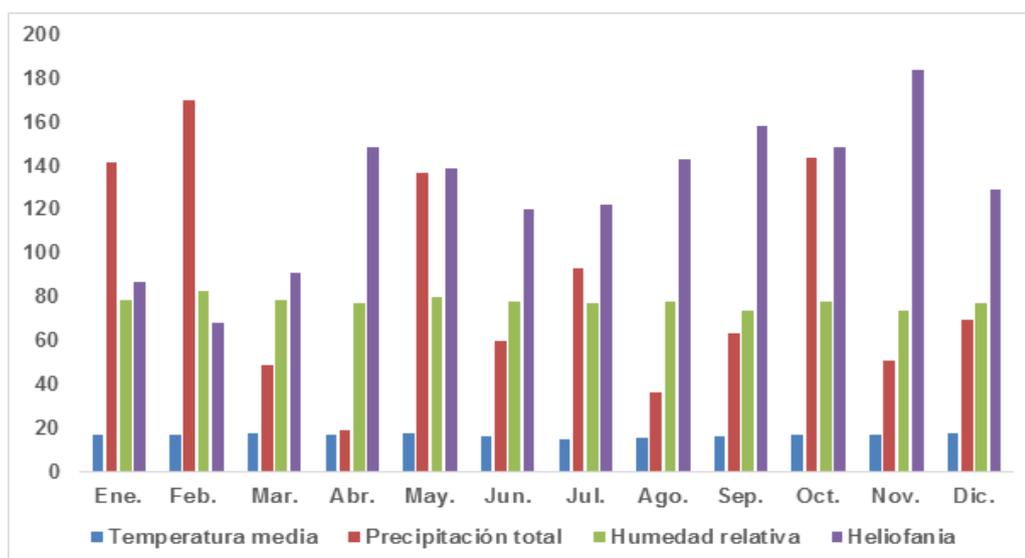


Figura 9. Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre de 2013.

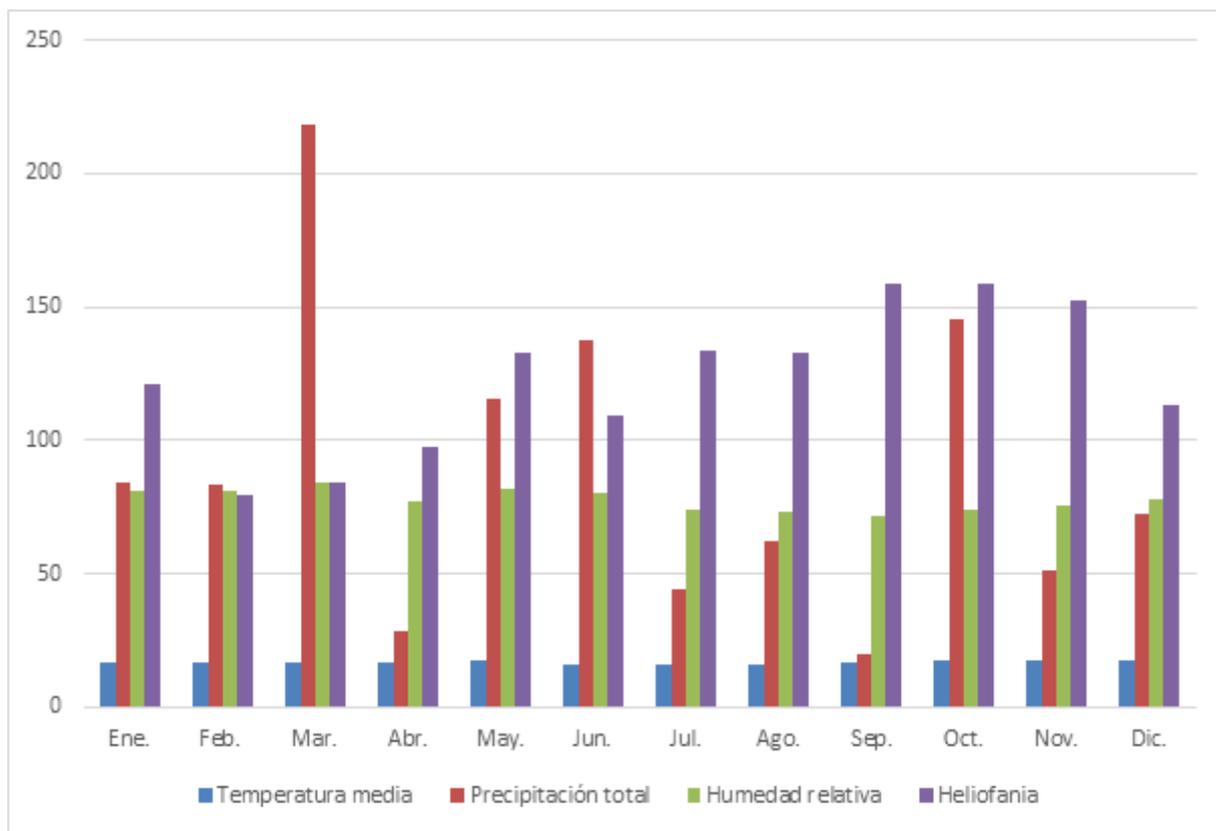


Figura 10. Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre de 2014

#### 4.2. Realizar pruebas de antagonismo in vitro con *Trichoderma* spp como agente de biocontrol de la MVB.

##### 4.2.1. Pruebas de antagonismo

Las mediciones de la cepa de *Trichoderma* (ECM6) se dejaron de realizar hasta que las cuatro cepas de *Fusarium* cubrieron completamente la placa de Petri, las cepas que se utilizaron para realizar el antagonismo son: AML2 (192 horas), AML1 (144h), CHA1 (192h) y QUI1 (144h) de incubación.

La cepa de *Trichoderma* ECM6 inhibió el crecimiento radial de las cuatro cepas de *Fusarium* (Cuadro 1), logrando detener el crecimiento radial de la cepa AML2 a las 192 horas (8 días), siendo el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de 59,63% en la repetición R1 y el menor valor de 37,38% de la repetición R2. Es necesario indicar que en los periodos de evaluación a las 24, 71 y 96 horas, todos los tratamientos presentaron diferencias estadísticas

( $p < 0.05$ ), según la prueba de Tukey; mientras que, el resto de periodos de evaluación no presentaron diferencias estadísticas, (Apéndice 9).

La cinética de la cepa de *Fusarium* spp., aislado AML2 en presencia de cultivos duales, con *Trichoderma* cepa ECM6, demuestra una marcada tendencia irregular en la reducción del PICR (Figura 11).

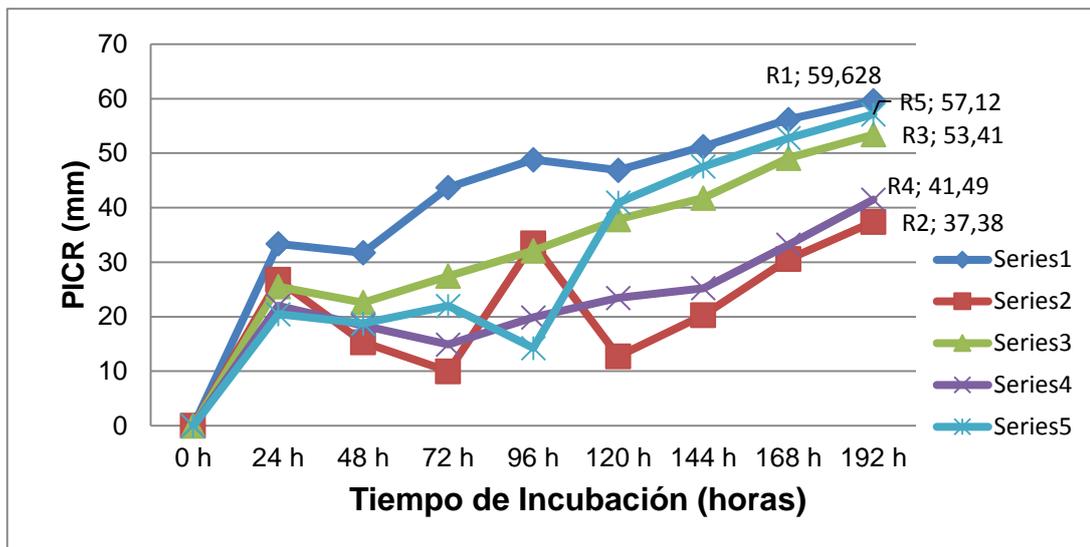


Figura 11. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (AML2), con *Trichoderma* (ECM6), durante 192 horas de evaluación.

Así mismo, en el crecimiento de *Fusarium* spp., cepa AML1, se observó que por la presencia de *Trichoderma* cepa ECM6, a las 144 horas se observa que la repetición R5 fue quien exhibió el mayor PICR con un 39,62%, en cambio la repetición R2 presentó el menor PICR con 20,12%, el análisis de la variancia, nos indica que en todos periodo de evaluación no hay diferencias significativas entré las repeticiones. De acuerdo a los niveles de significación ( $P=0,05$ ) entre los resultados obtenidos en la prueba de Tukey, excepto en los periodos evaluación a las 24, 72 y 96 horas, los cuales presentan diferencias estadísticas (Apéndice 10).

La cinética de la cepa de *Fusarium* spp., cepa AML1 en presencia de cultivos duales, con *Trichoderma* cepa ECM6, demuestra una marcada tendencia muy irregular en la reducción del PICR (Figura 12).

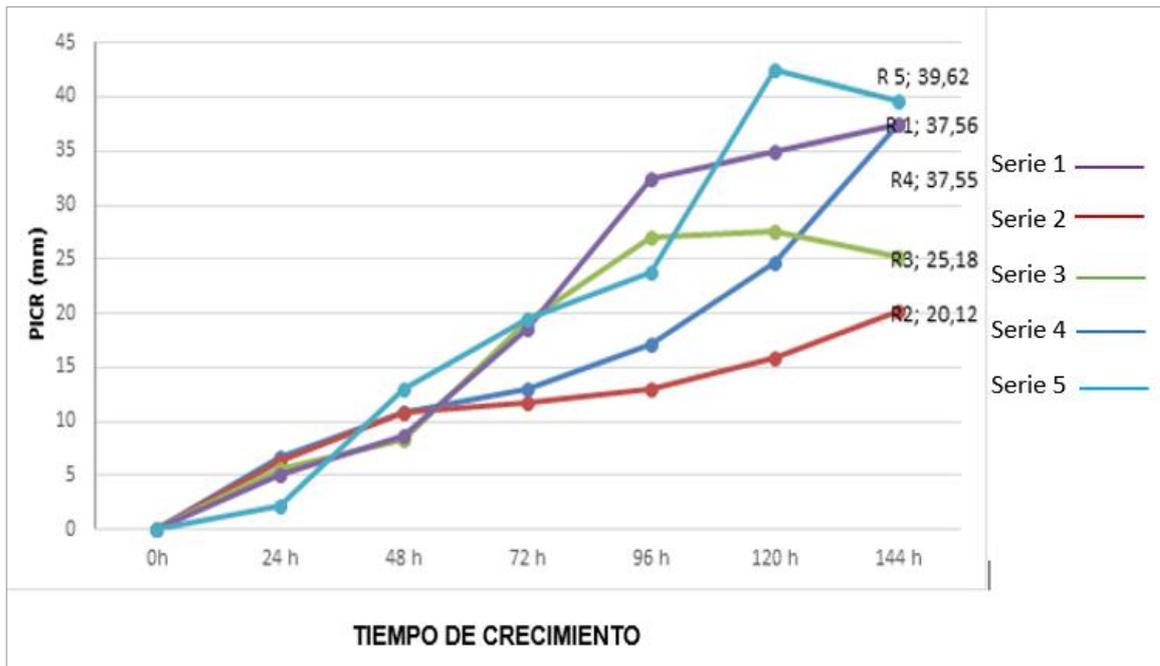


Figura 12. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (AML1), con *Trichoderma* (ECM6), durante 144 horas de evaluación.

Con respecto a la cepa de *Fusarium* CHA1 en confrontación mediante la técnica del cultivo dual con *Trichoderma* cepa ECM6, el PIRC varió de 45,07 en la repetición R1 a 62,81% en la repetición R2 en el periodo de evaluación a las 144 horas. Las cinco repeticiones en todos los periodos de evaluación no mostraron diferencias significativas ( $p=0.05$ ), excepto en el periodo de evaluación 24 horas de evaluación (Apéndice 3).

La cinética de la cepa de *F. oxysporum* cepa CHA1 en presencia de cultivos duales, con *Trichoderma* cepa ECM6, demuestra una marcada tendencia en la reducción del PICR (Figura 13).

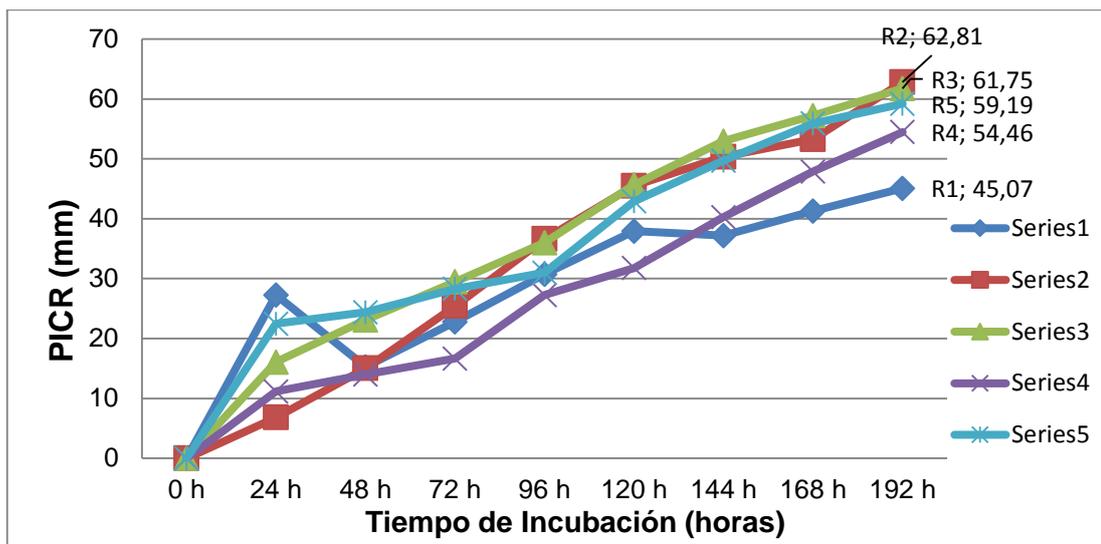


Figura 13. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (CHA1), con *Trichoderma* (ECM6), durante 192 horas de evaluación

En cuanto al crecimiento de *F. oxysporum* cepa QUI1, se observó que por la presencia de *Trichoderma* cepa ECM6, el PICR varió desde 36,07 a 55,25% en el último periodo de evaluación a las 144 horas (Apéndice 12). El análisis estadístico realizado a la cinética de la cepa QUI1 en confrontación con la cepa de *Trichoderma* ECM6, indica una aceleración significativa en la reducción de la enfermedad (Figura 14).

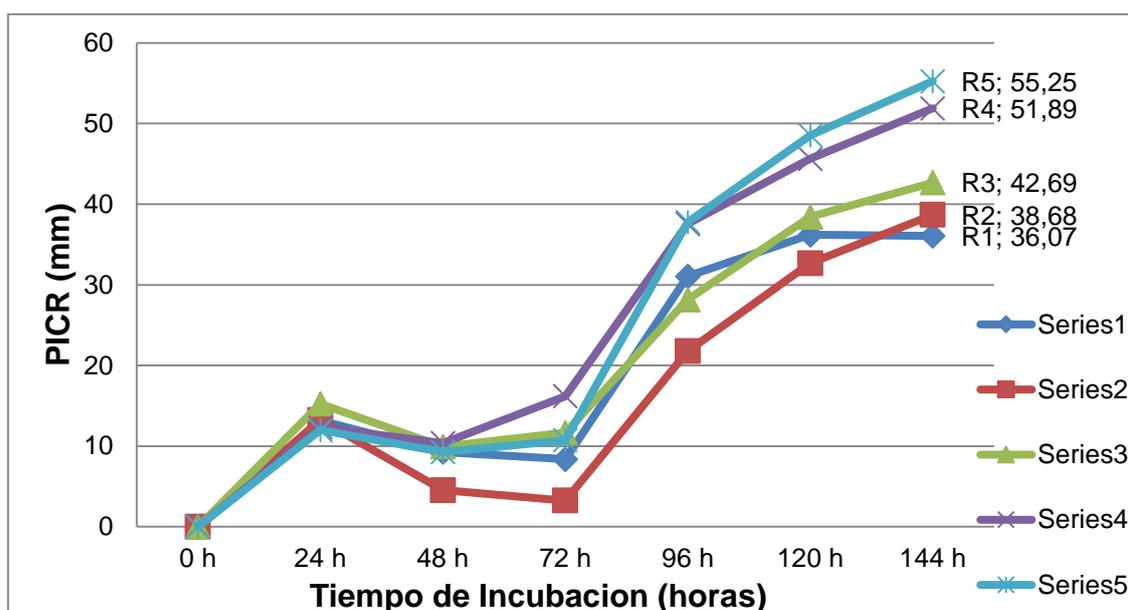


Figura 14. Cinética de la Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (QUI1), con *Trichoderma* (ECM6), durante 144 horas de evaluación.

### 4.3. Caracterizar morfológicamente las diferentes cepas de *Trichoderma* spp aisladas de la rizósfera del Babaco

#### 4.3.1. Sitios de muestreos

Se obtuvieron un total de 12 muestras provenientes del cantón Loja (7 de El Carmelo) y del cantón Saraguro (5 Cochapamba), donde se cultiva el Babaco tanto en invernadero como en campo abierto. La información del origen del aislado, ubicación y codificación de la cepa de cada muestra obtenida se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 4. Origen de los diferentes aislados de *Trichoderma* spp., en la provincia de Loja, Ecuador.

Muestra	Origen del aislado	Ubicación		Codificación de la cepa
		Latitud	Longitud	
1	Saraguro (COCHAPAMBA)	02°47'41.10" S	79°25'39.10" O	COC1
2	Saraguro (COCHAPAMBA)	02°47'41.10" S	79°25'39.10" O	COC2
3	Saraguro (COCHAPAMBA)	02°47'41.10" S	79°25'39.10" O	COC3
4	Saraguro (COCHAPAMBA)	02°47'41.10" S	79°25'39.10" O	COC4
5	Saraguro (COCHAPAMBA)	02°47'41.10" S	79°25'39.10" O	COC5
6	Loja, Chuquiribamba, El Carmelo	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38,95" O	ECM1
7	Loja, Chuquiribamba, El Carmelo	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38,95" O	ECM2
8	Loja, Chuquiribamba, El Carmelo	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38,95" O	ECM3
9	Loja, Chuquiribamba, El Carmelo	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38,95" O	ECM4
10	Loja, Chuquiribamba, El Carmelo	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38,95" O	ECM5
11	Loja, Chuquiribamba, El Carmelo	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38,95" O	ECM6
12	Loja, Chuquiribamba, El Carmelo	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38,95" O	ECM7

Leyenda: Cochapamba (COC) y El Carmelo (ECM)

#### 4.3.2. Aislamiento de *Trichoderma* spp.

Con la metodología aplicada se observó que *Trichoderma* spp., se encuentra aproximadamente de los 5 a 10 cm de la rizósfera del Babaco.

De las 15 muestras de suelo obtenidas, solo en 12 muestras se detectó la presencia de *Trichoderma* spp. De estas 7 muestras corresponden a las parroquias rurales del cantón Loja, parroquia Chuquiribamba, sector el Carmelo y 5 muestras corresponden al cantón Saraguro sector Cochapama.

#### 4.3.3. Identificación morfológica de *Trichoderma* spp.

Se obtuvieron 12 colonias distintas, con características de crecimiento de *Trichoderma* spp, colonias con formación de anillos blancos (micelio) y verde (esporas). En la figura 15, se muestran las colonias de las 12 cepas obtenidas, las cuales presentaron características morfológicas distintas (color, forma y número de conidios y tamaño de conidios).

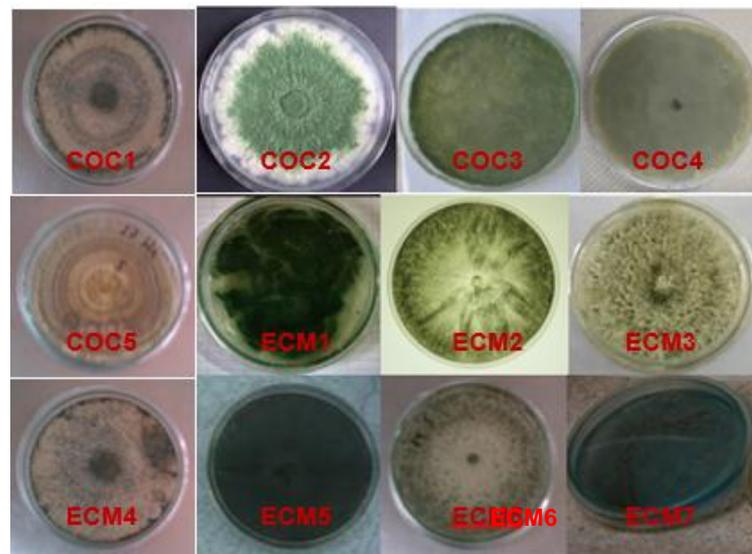


Figura 15. Características de la colonia de los 12 aislados de *Trichoderma* spp

Al microscopio se observaron hifas hialinas, fiálides en forma de matraz, tanto solitarias como en grupo, conidias de diversas formas (ovoide y globosa) tanto pequeños como medianos y en tonalidades verdes (Figura 16).

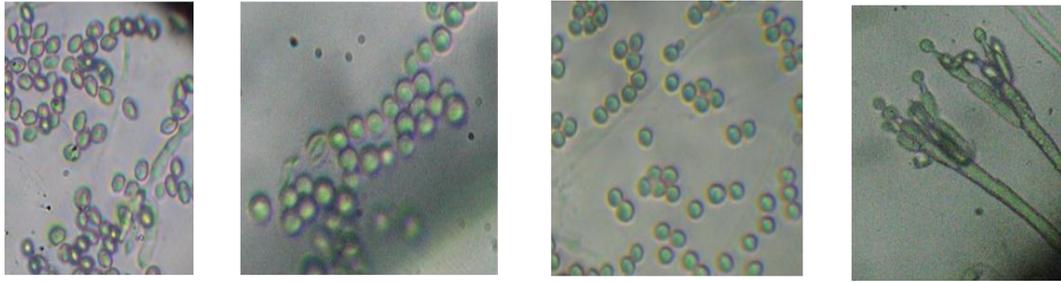


Figura 16. Morfología microscópica de los aislados de *Trichoderma* spp. a) Conidias ovoides, b) globosas; observado en un aumento de 40x.

El Cuadro 5, muestra la variabilidad morfológica observada en la forma de los conidios, de los cuales 10 aislados corresponden la forma globosa y dos con la forma ovoide. En cuanto a las mediciones de las estructuras reproductivas (conidios) en microcultivos, donde al igual que los demás parámetros analizados, esta evaluación evidenció una alta variabilidad entre los aislados. El análisis estadístico para este parámetro evaluados, corresponden a los aislados procedentes de las localidades de Cochapamba 2 y 5 (COC1 y COC2) en el cantón Saraguro. En cuanto a la cantidad de conidios, el análisis estadístico demuestra que el mejor valor es del aislado ECM6.

Cuadro 5. Características morfológicas y culturales de los aislados de *Trichoderma* spp., recolectadas de suelos rizosféricos del Babaco en la provincia de Loja, Ecuador

Aislado	Origen	Forma	Color colonia	Tamaño de conidios (µm)	Numero de conidios
COC1	Saraguro	Globosa	Verde grisáceo	4,2120 x 4,2400 <sup>a</sup>	2,5838 x 10 <sup>6</sup> b
COC2	Saraguro	Globosa	Verde grisáceo	5,1460 x 5,7540 bc	1,19156 x 10 <sup>7</sup> b
COC3	Saraguro	Globosa	Verde grisáceo	4,2280 x 4,1850 bc	7,7442 x 10 <sup>6</sup> b
COC4	Saraguro	Globosa	Verde grisáceo	5,1880 x 5,0520 c	3,3478 x 10 <sup>6</sup> b
COC5	Saraguro	Globosa	Verde grisáceo	5,6840 x 5,8650 c	1,9816 x 10 <sup>6</sup> b
ECM1	El Carmelo	Ovoide	Verde grisáceo	4,4440 x 4,4320ab	1,2508 x 10 <sup>6</sup> b
ECM2	El Carmelo	Globosa	Verde grisáceo	4,3200 x 4,2800 c	1,868 x 10 <sup>6</sup> b

ECM3	El Carmelo	Globosa	Verde grisáceo	4,3560 x 4,3480	c	4,2998 x 10 <sup>6</sup> b
ECM4	El Carmelo	Globosa	Verde grisáceo	4,0360 x 4,0360	bc	3,648 x 10 <sup>5</sup> b
ECM5	El Carmelo	Globosa	Verde grisáceo	4,6760 x 4,5080	a	9,5372 x 10 <sup>6</sup> b
ECM6	El Carmelo	Globosa	Verde grisáceo	4,1870 x 4,1960	c	7,1884 x 10 <sup>7a</sup>
ECM7	El Carmelo	Globosa	Verde grisáceo	4,5410 x 4,4160	c	4,2364x 10 <sup>6</sup> b

Leyenda: Codificación de aislados de *Trichoderma* spp: COC (Saraguro; Cochapamba), ECM (Chuquiribamba; El Carmelo).

## **V. DISCUSIÓN**

### **5.1. Determinación de las propiedades físicas y químicas del suelo asocias a la MVB**

#### **5.1.1. Propiedades físicas asociadas a la MVB**

La humedad del suelo es afectada principalmente por el clima, textura, vegetación y topografía, tanto en ambientes naturales como de uso agrícola. Muchos trabajos concluyen que la topografía es un factor físico crucial para entender la variabilidad de la humedad de la superficie del suelo. Siendo la textura la propiedad más fuertemente ligada a la humedad del suelo, específicamente los contenidos de arena y arcilla; normalmente los suelos arcillosos deben presentar una humedad mayor a la del arenoso, debido a su estructura ya que los poros tienen un volumen menor pero se hallan en mayor cantidad que los suelos arenosos (Barros *et al.*, 2014).

Es así que, el agua es determinante en los procesos físicos y biogeoquímicos que ocurren en el suelo, cumpliendo así un importante papel en la organización de los ecosistemas naturales y de la biodiversidad. Gran parte de las prácticas agrícolas, entre ellas el riego, influyen en la dinámica espacial y temporal de la humedad del suelo en la zona radical (Cruz, 2012).

Los resultados obtenidos demuestran una relación muy estrecha entre la marchitez y la acumulación de agua en el suelo, donde el contenido de arcilla y la máxima capacidad de retención de humedad, provocan que el agua sea retenida, mientras las variables como la infiltración y conductividad, se relacionan con la baja capacidad de evacuación de esta dentro del perfil del suelo (Barros *et al.*, 2014; Gatch y Toit, 2015).

Se considera que la humedad es la variable que más incide en el desarrollo de la marchitez en diversos cultivos cuando es causado por *Fusarium* sp., ya que favorece la producción del patógeno, el movimiento de sus estructuras reproductivas hacia zonas de infección y la diseminación a otros cultivos de la misma zona (Geense *et al.*, 2015; Gum, 2012; Navajothy *et al.*, 2012). Además, se ha encontrado que en suelos con presencia de estructuras infectivas de

*Fusarium* spp., pero sin excesos de humedad, la infección en la planta se ve seriamente reducida (Mahmood, 2014; Zakayyah, 2012). Los altos contenidos de humedad en suelos cultivados, traen como consecuencia que la incidencia y severidad de esta enfermedad se incrementa, ocasionando la destrucción de las plantas en un periodo de tiempo más corto (Naseri, 2014).

En varios trabajos reportados en la literatura científica, sugieren que como consecuencia de la retención de agua, se disminuye drásticamente la aireación, condición que afecta a las plantas cultivadas, ya que es altamente susceptible a bajos contenidos de oxígeno (Piraneque, 2008; Toledo-Souza *et al.*, 2013). El déficit de oxígeno en las zonas de crecimiento activo de raíces provoca cambios bioquímicos, los cuales ocasionan cese del crecimiento radical, pérdida de turgencia, cambios en la síntesis de proteínas y funcionamiento inadecuado de enzimas (Piraneque, 2008; Naseri, 2014). La sintomatología observada puede expresarse como baja absorción de agua por la pérdida de turgencia y marchitez de hojas, disminución en la producción de giberelinas y citoquininas y un incremento en el abastecimiento de etileno hacia la parte superior de la planta, resultando en un detenimiento en el crecimiento de brotes, senescencia de hojas y alteración de la glicólisis, induciendo la producción de etanol y otros productos de la fermentación (Benítez *et al.*, 2013). Este último fenómeno favorece la atracción quimiotáctica de las estructuras reproductivas de *Fusarium* hacia la raíz, explicando el incremento en la incidencia (Razean y Drew, 2014). Además esta condición provoca estrés en la planta, el cual la hace más susceptible a enfermedades (Agrios, 2005; O'Brien, 2010).

### **5.1.2. Propiedades químicas asociadas a la MVB**

Los estudios realizados hasta el momento en Babaco, sobre la relación de las propiedades químicas del suelo y la marchitez por *Fusarium* son muy escasos. Las evaluaciones se han enfocado solo estudios sobre las propiedades químicas en relación con la fertilidad. Es así, que se observaron valores muy bajos de pH (4,96) en la localidad de Cochapamba y en la localidad de Chuquiribamba valores cercanos a la fertilidad (6,19). No obstante, la única explicación que se le pudiera dar al valor del pH bajo encontrado es que en la zona de Cochapamba

el sitio evaluado se encuentra bajo condiciones de invernadero y al posible uso de fertilizantes como la Urea y fertilizantes amoniacales.

Diversos estudios indican que con la reducción del nivel de pH del suelo, sucede la destrucción de los minerales de las arcillas y de otros silicatos, y la solubilización de óxidos de Al, lo que conduce a la degradación irreversible del suelo. La biota del suelo sufre las consecuencias de la toxicidad por aluminio. En suelos con pH que tiende a la acidez, se encuentran, por lo general, pocas poblaciones de anélidos y la cantidad de micorrizas es muy reducida; además, muchos grupos de bacterias y basidiomicetes reducen su actividad y desarrollo cuando el pH del suelo está por debajo de 5,5 (Jaramillo, 2002).

Igualmente, estudios previos han demostrado que en dos años de estudio las concentraciones de Ca, Mg, K y B no varían, mientras que las concentraciones de P y Mn, decrecen, con la aplicación de fertilizantes sintéticos (Jaramillo, 2002). Las concentraciones de Ca, variaron de 1 meq/100 g a 6,48 meq/100 g. Estudios edafológicos indican que la magnitud de la toxicidad por Aluminio depende del contenido de elementos nutritivos en el suelo, especialmente Mg y Ca y por ende la planta no puede absolver estos nutrimentos, por lo que el Babaco se vuelve más susceptible al ataque de *Fusarium*.

En lo concerniente al cultivo de Babaco los análisis químicos coinciden con los expuestos por Bravo (2005), que el cultivo es mantenido en parte por los nutrientes que le proporciona el suelo, de estos el nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio y calcio son importantes así como el manganeso, zinc, hierro y boro. El rango del pH adecuado para el Babaco varía entre 5.8 a 8.2 siendo óptimo entre 6.6 a 7.2. El contenido de materia orgánica en este frutal es importante ya que se desenvuelve bien en suelos con contenidos entre 3 al 5%. La presencia de sales debe ser baja, ya que estas en grandes cantidades pueden afectar la nutrición de las plantas y reducir la permeabilidad de los suelos.

### **5.1.3. Datos Climáticos**

Los parámetros de temperatura, precipitación, humedad relativa y heliofania pudieron influir en el desarrollo y biología de *Trichoderma*, debido a que en la literatura científica hay poca información sobre los parámetros ecofisiológicos de

*Trichoderma*. En cambio, los parámetros evaluados en condiciones de laboratorio, nos indican que el hongo *Trichoderma* spp., crece a una temperatura óptima en agar y producción de micelio está entre 20 y 28°C, aunque Infante *et al.*, (2009), en su estudio menciona que también crece bien entre un rango de temperatura de 6 a 32°C, con un contenido mínimo de humedad para su crecimiento vegetativo del 92% y para su esporulación es de 93 al 95%. Tiene cierta respuesta a la luz, especialmente azul y la violeta. La luz promueve la formación de esporas, el crecimiento de micelio y la coloración (Infante *et al.*, 2009).

## **5.2. Realizar pruebas de antagonismo in vitro con *Trichoderma* spp como agente de biocontrol de la MVB**

### **5.2.1. Pruebas de antagonismo**

Los resultados de inhibición para las cinco especies de *Trichoderma* resultaron positivos lo cual coinciden con lo observado por Martínez-Álvarez, *et al.* (2012) y Fernández y Suárez (2009), quienes mencionan que especies de *Trichoderma* producen sustancias antifúngicas que actúan inhibiendo el crecimiento de algunos microorganismos.

En el ensayo de cultivos duales tanto el aislado de *Trichoderma* creció en PDA considerablemente más rápido que las cuatro cepas de *Fusarium* (Cuadro 1) bajo las mismas condiciones (Bokhari y Perveen, 2012); Aunque ninguna especie de *Trichoderma* fue capaz de inhibir completamente el desarrollo de las cepas de *Fusarium* en condiciones in vitro (Pal *et al.*, 2006). Su rápido crecimiento le da a *Trichoderma* una ventaja importante en la competencia por espacio y nutrientes sobre el patógeno (López, 2011). Cuando el antagonista es muy efectivo la concentración de nutrientes decrece (Astorga-Quirós *et al.*, 2013), por lo tanto la inhibición del crecimiento de ambos patógenos pudo ser causado por el agotamiento de nutrientes, el cual es uno de los mecanismo utilizado por muchos agentes de control biológico (Matarese *et al.*, 2012).

Existen pocos estudios sobre el uso de *Trichoderma* en Babaco, uno de ellos es el realizado por Cueva, 2007, quien utilizó 2 cepas de *T. koningii*, una de *T. viride*, dos cepas de *T. harzianum* y *T. álbum*; logrando obtener un mayor PICR de 40%

con la cepa de *T. álbum*. En cambio existen numerosos reportes sobre la utilización de cepas de *Trichoderma* para el control in vitro e in vivo de diversas cepas patogénicas de *Fusarium* en diversos cultivos. Entre los cuales podemos citar a Romero (2014) en el control de patógenos en flores de jamaica; Castro (2013), en el control de *F. verticilloides* en maíz; Hernández (2014), en el control de *Fusarium* spp., causante de la Marchitez en caña de azúcar; Camacho (2014), en el control de patógenos en cebolla.

### **5.3. Caracterizar morfológicamente las diferentes cepas de *Trichoderma* spp aisladas de la rizósfera del Babaco**

#### **5.3.1. Aislamiento e Identificación morfológica de *Trichoderma* spp.**

En los suelos de los cantones de Loja y Saraguro está presente en forma natural el hongo del genero *Trichoderma* observándose que no existe una relación entre el género y el origen en donde están presentes, condiciones de los cultivos, lo cual coincide con lo reportado Mar *et al.*, 2014, quienes menciona que se pueden obtener cepas de *Trichoderma* spp tanto en praderas, bosques, desiertos, en suelos de diferentes zonas climáticas, en materia vegetal muerta, en raíces, semillas entre otros.

Los aislados obtenidos mostraron la formación típica de anillos concéntricos de las colonias de *Trichoderma* spp., donde se intercala el color verde de las conidias y blanco del micelio, lo cual concuerda con descripciones realizadas por otros autores sobre este hongo (Jaklitsch, 2015; Chaverri *et. al.*, 2003).

Así tenemos que, las características morfológicas cuando son sometidas a la influencia del medioambiente y pueden provocar grandes variaciones 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).

El único reporte sobre caracterización morfológica de cepas de *Trichoderma* para el control de la MVB, fue expuesto por Cueva (2007), en la cual afirma que

las cepas de *Trichoderma* presentan las siguientes características morfométricas (Cuadro 5)

Cuadro 6. Características morfométricas de diferentes cepas de *Trichoderma* (Cueva, 2007)

Cepa	Forma de la conidia	Medida de la conidia (LXA)
<i>T. koningii</i>	Oblonga	3,25 X 1,75
<i>T. viride</i>	Elíptica	3,75 X 2,50
<i>T. harzianum</i>	Globosa o subglobosa	3,0 X 2,50
<i>T. álbum</i>	Globosa o subglobosa	3,0 X 2,50

## VI. CONCLUSIONES

Se aislaron 12 cepas de *Trichoderma* spp de las cuales 5 son provenientes del cantón Saraguro y 7 muestras provenientes del cantón Loja.

En el análisis fisicoquímico de suelos se pudo evidenciar que son los óptimos para el desarrollo del cultivo de Babaco y *Trichoderma* ya que este microorganismo bio-controlador se desarrolla de manera en suelos ácidos, con un alto contenido de materia orgánica y con presencia de macro y micro elementos, para ello la temperatura y la humedad relativa influye en este proceso.

En los datos climáticos se pudo evidenciar una diferencia significativa entre los meses de noviembre 2013 a enero 2014, aumentando los niveles de temperatura humedad relativa, precipitación y heliofania, causando de esta manera que el ataque de *Fusarium* hacia el cultivo de Babaco, sea mayor es decir a mayor temperatura y precipitación el hogo fitopatogeno causa mayor daño en los cultivos.

Las pruebas de antagonismo ayudó a visualizar a las cepas más idóneas para utilizarlas como una herramienta de biocontrol; obteniendo como resultado que la cepa ECM6 de la especie *Trichoderma* tiene potencial de biocontrol por la inhibición y antagonismo sobre *Fusarium oxysporum*,

Se evaluaron el antagonismo de *Trichoderma* (ECM6) frente a cuatro cepas de *Fusarium* (AML1, AML2, QUI2, CHA-1) teniendo 2 más patogénicas y 2 menos patogénicas, en cultivos duales en condiciones *in vitro*; obteniendo que, en los tratamientos probados si existió diferencias significativas, a la MVB sin embargo el tratamiento AML1 – ECM6 de *Trichoderma* frente a *Fusarium* fue la que mejor efecto antagonista presento con un porcentaje 30, 22% de en los cultivos duales, expresado en crecimiento diario.

## VII. RECOMENDACIONES

Realizar la caracterización molecular los 12 aislados de *Trichoderma* spp encontrados en la rizosfera del Babaco, para reconocer su especie.

Realizar bioensayos con diferentes dosis de inoculo de *Trichoderma* spp. en el cultivo de Babaco y en otros cultivos para establecer el porcentaje más idóneo de sobrevivencia de las plantas y su producción .

Evaluar el efecto antagónico in vitro de *Trichoderma* spp. sobre otros fitopatógenos Realizar análisis en suelos, sustratos y raíces, con el objeto de aislar microorganismos antagonistas benéficos para el manejo integrado de plagas y enfermedades en varios cultivos de importancia económica.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Published Elsevier. 5 ed. United States of America. 948 p.
- AAIC.2013. El cultivo de babaco en invernadero (Carica pentágona. Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar. Quito, Ecuador.
- Alexopoulos C.; Mims C. & Blackwell M. 1996. Introductory Micology. Jonn Wiley & Sons. 4a edición. EUA.
- Amora-Lazcano E, Guerrero-Zúñiga L.A, Rodriguez-Tovar A, Rodriguez-Dorantes A. and Vasquez-Murrieta M.S.2010. Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soils. Microbiology Department, National Biological Sciences School, National Polytechnic Institute, 11340, D.F., México
- Ampuero, P. 2004. Elaboración de mermelada de Babaco como producto no tradicional de exportación al mercado Europeo. Tesis de Economista con Mención en Gestión Empresarial Especialización Marketing. Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Escuela Superior Politécnica del Litoral. Ecuador.
- Anoop, K., & Suseela Bhai, R. (2014). Evaluation of antagonistic potential of indigenous *trichoderma* isolates against *pythium aphanidermatum* (edson) fitz. Causing rhizome rot in turmeric (*curcuma longa* l.).
- Aquino-Martínez, J. G., Vázquez-García, L. M., & Reyes-Reyes, B. G. (2007). Biocontrol in vitro e in vivo de *Fusarium oxysporum* Schlecht. f. sp. dianthi (Prill. y Delacr.) Snyder y Hans. con hongos de Villa Guerrero, Estado de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26, 127-137.
- Argotti E. 2010. Análisis molecular de la región ITS de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez vascular de *Vasconcellea heilbornii* y *Solanum quiotense* en Ecuador.

- Armijos Wilman & Salinas Darío. 2013. Identificación taxonómica y caracterización molecular de los agentes causales de la Marchitez Vascular del Babaco *Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. pentagona, en los cantones Loja y Saraguro. Tesis. Universidad nacional de Loja. Loja- Ecuador.
  
- Astorga-Quirós, K., Meneses-Montero, K., Zúñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J., & Rivera-Méndez, W. (2014). Evaluación del antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 82-91.
  
- Asturizaga A, Øllgaard B & Balslev H.2006. Frutos comestibles .Herbario Nacional de Bolivia. Instituto de Ecología. Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.
  
- Avendaño, C., Arbeláez, G., & Rondón, G. (2006). Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. phaseoli en frijol *Phaseolus vulgaris* L., mediante la acción combinada de *Entrophospora colombiana*, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. *Agronomía colombiana*, 24(1), 62-67.
  
- Badillo, V.M. 1997. Neotipificación de *Carica pubescens* Lenné et Koch y de *Carica quercifolia* (St. Hil.) Hieron. y nuevos registros de la familia para Ecuador. *Ernstia*, 6(4): 201-205.
  
- Badillo, V.M. 2000. *Carica* L. vs. *Vasconcella* St.-Hil. (Caricaceae) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10(2): 74-79.
  
- Badillo, V.M. 2001. Nota correctiva *Vasconcellea* St. Hill. Y no *Vasconcella* (Caricaceae). *Ernstia*, 11(1): 75-76
  
- Barocio Ceja, N. B. (2012). Evaluación de vermicomposta de gallinaza para el manejo de enfermedades de la raíz de jitomate.
  
- Barnett,.HL; Hunter, BB.1987. Illustrated Genera of Imperfect. Fungi.4. ed. Nueva York, US, MacMillan Publishig Company. p118.

- Barros, J. A., Medeiros, E. V., Notaro, K. A., Moraes, W. S., Silva, J. E. M., Nascimento, T. C., & Moreira, K. A. (2014). Different cover promote sandy soil suppressiveness to root rot disease of cassava caused by *Fusarium solani*. *African Journal of Microbiology Research*, 8(10), 967-973.
- Benítez, S. P., Lobo, M., Delgado, O. A., & Medina, C. I. (2013). Estudios de germinación y remoción de latencia en semillas de papayuelas *Vasconcellea cundinamarcensis* y *Vasconcellea goudotiana*.
- Bokhari, N. A., & Perveen, K. (2012). Antagonistic action of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Fusarium solani* causing root rot of tomato. *African Journal of Microbiology Research*, 6(44), 7193-7197.
- Bravo Alejandra; Ibarra J.; Castro M.; Galindo E.; Patiño M.; Serrano L.; García R.; Pereyra B.; Pizaña A.; Luna H.; Galán Wong L.; Pardo L.; Muñoz C.; Gómez I. y Soberón M. 2005. Los microorganismos en el control de insectos y patógenos. Cuernavaca, México. Revista, Latinoamericana de Microbiología. 48(2). 113 -120 pp.
- Bourguignon, E.2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. PhD. Tesis. Lincoln University, Canterbury, New Zealand.pp.235.
- Castaño-Zapata, J. 1998. Prácticas de laboratorio de fitopatología. Práctica (20). Segunda edición. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Fitotecnia. Escuela Agrícola Panamericana. Departamento de Protección Vegetal. p 103.
- Castro Del Ángel, Epifanio. (2013). Control de *Fusarium verticillioides* en genotipos de maíz con especies de *Trichoderma* bajo condiciones de campo.
- Chaverri P and Samuels G. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae):species with green ascospores. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands An institute of the Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences. USA

- Cherif, M., & Benhamou, N. (1990). Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Phytopathology*, 80(12), 1406-1414.
- CINFA. 2012. Centro Integrado de Geomática Ambiental. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.
- Cobos G. 2010. Evaluación De Cepas Nativas De *Trichoderma* Spp. Para El Control De Sigatoka Negra (*Paracercospora Fijiensis* M.) En Elcultivo De Banano (*Musa Paradisiaca*) En Fase De Laboratorio. Informe Tecnico. Escuela Politécnica Del Ejército Departamento De Ciencias De La Vida Carrera De Ingeniería En Ciencias Agropecuarias Santo Domingo.
- Cordero-Ramirez J. 2008. Microorganismos de la rizosfera del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como antagonistas de *Fusarium oxisporum* f. sp. *radicis – lycopersici*. Tesis. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa. Guasave, Sinaloa, México.188p
- Cotacachi, R. 2013. Evaluación agronómica del desarrollo de plantas de babaco (*Carica pentágona*) con tres dosis de bioestimulante radicular orgánico y tres combinaciones de sustratos en la parroquia de Yaruquí, Provincia De Pichincha. Universidad Estatal De Bolívar. Tesis De Grado Previo A La Obtención Del Título de Ingeniera Agrónoma.160 p.
- Coyago Ronald.; León F y Patiño V. 2010. "Evaluacion Del Comportamiento Del Babaco (*Vasconcella X Heilbornii* Nm. Pentagona) En Tres Tipos De Alturas De Podas En Plantas De Seis Años De Produccion En La Parroquia Bulán, Canton Paute, Provincia Del Azuay. " 128 P.
- Cruz Aguilar, M. *Respuesta fisiológica y bioquímica de gulupa (passiflora edulis Sims) afectada por fusariosis (fusarium sp.)* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Cueva (2007). Producción de inoculantes a base de *Trichoderma* spp., para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp., *caricae* en injertos de babaco

(*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco). Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniera Agropecuaria, Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí, Ecuador. 114 pp.

- Donoso, Eduardo; Lobos, Gustavo A y ROJAS, Nadia. **Efecto de *Trichoderma harzianum* y compost sobre el crecimiento de plántulas de *Pinus radiata* en vivero.** *Bosque (Valdivia)* [online]. 2008, vol.29, n.1, pp. 52-57. ISSN 0717-9200
- Duffy, B., Schouten, A., & Raaijmakers, J.M. 2003. Pathogen self-defense: mechanisms to counteract microbial antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 41:501- 538.
- Fabara J. Bermeo N. Barbaran C. 1985. Manual del Cultivo del Babaco. Quito. Esquina Editores. 101 p.
- Fernández Barbosa, R. J., & Suárez Meza, C. L. (2009). ANTAGONISM IN VITRO OF *Trichoderma harzianum* Rifai AGAINST *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp *passiflorae* IN PASSION FRUIT (*Passiflora edulis* Sims var. Flavicarpa) FROM COLOMBIAN BANANERA ZONE MUNICIPALITY. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín*, 62(1), 4743-4748.
- Franco-Correa, M. 2008. Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas. Tesis Doctoral, Director: Dr. José Miguel Barea N. Departamento de Fisiología Vegetal. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada. pp. 266
- Gams y Bissett, 1998. Morphology and identification of *Trichoderma* in: *Trichoderma and Gliocladium* Vol. 1. 3-31p.
- Gatch, E. W., & du Toit, L. J. (2015). A Soil Bioassay for Predicting the Risk of Spinach *Fusarium* wilt. *Plant Disease*.
- Geense, P., Pattison, A. B., Kukulies, T. L., Scholberg, J. M., & Molina, A. B. (2015). Can Changes in Soil Properties in Organic Banana Production Suppress *Fusarium* Wilt?. *Natural Resources*, 6(03), 181.

- Gum, J. (2012). Effects of compost and lime application on soil chemical properties, soil microbial community, and *Fusarium* wilt in florida-grown tomatoes.
- Guzmán-Piedrahita, O., Castaño-Zapata, J., Villegas-Estrada, B. 2009. Diagnóstico de enfermedades de plantas de origen biótico. Revista Agron.
- Harman, G.E. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Disease. 84(4): 377-393 pp.
- Harman G. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. ;96(2):190- 194.
- Howell, C, R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(1):1-10.
- Hull R. 2009. Comparative plant virology. Science & technology books. Department of Disease and Stress Biology John Innes Centre Norwich, UK. Second edicion.
- Infante., Martínez, B., González, N y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* Frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24 (1), 80p.
- Jacomé J. 2011. Evaluación de tres mezclas de sustratos y tres fitohormonas en enraizamiento de brotes laterales de Babaco (carica pentagona), barrio Pinllocruz, cantón Mejía, provincia de Pichincha. Tesis. Universidad Técnica de Cotopaxi. Latacunga-Ecuador.
- Jaklitsch, W. M. y Voglmayr, H. (2015). Bio-diversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in mycology*, 96, 1–87

- Jaramillo, D. F. J. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Universidad Nacional de Colombia.
- Jensen, D.F. y Wolffhechel, H. (1995). Biological Control: Benefits and risks. (Series: Plant and Microbial Biotechnology Research. In: Heikki, M.T.H. y Lynch, J.M. (Eds.). The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., to control root rot and damping-off diseases. 177-189 pp.
- Jiménez, M. A., Ulacio, D., Perdomo, W., & Briceño, E. (2009). Micobiota y nematodos asociados con la rizósfera y raíz en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.). *Bioagro*, 21(3), 209-216.
- Kumar, Reddi Sudheer, M., John Reddy, M., y Chenchu, B. (2008). Morphological Characteristics of *Trichoderma* spp. En *Biological Control of Plant Pathogens, Weeds and Phytoparasitic Nematodes* (pág. 43).Hyderabad, IND: Global Media.
- Kyndt T. 2005. Molecular genetic analysis of the genera *Carica* L. and *Vasconcellea* Saint Hilaire (Caricaceae). Thesis submitted in fulfillment of the requirement for the degree of doctor (ph.d.) in applied biological sciences. Faculteit bio-ingenieurswetenschappen.
- Leslie, J.F.; Summerell, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Published, Blackwell. Manhattan, United States of America. 387 p.
- López R, 2011. Biodiversidad de la microbiota rizosférica de dos especies de solanáceas: *Solanum lycopersicum*, L. y *Datura* spp. (tomate y toloache). Tesis para maestría en recursos naturales y medio ambiente. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa. Guasave, Sinaloa, México.
- Mar. A., Aganon, C. P., & Juico, P. P. (2014). Isolation of *Trichoderma* species from carabao manure and evaluation of its beneficial uses. *International Journal Of Scientific & Technology Research*, 3(8), 190-199.

- Martínez-Álvarez, P., Alves-Santos, F. M., & Diez, J. J. (2012). In vitro and in vivo interactions between *Trichoderma viride* and *Fusarium circinatum*. *Silva Fenn*, 46, 303-316.
- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*. 28(1): 1-11 pp.
- Matarese, F.; Sarrocco S.; Gruber S.; SeidlLSeiboth V. and Vannacci G. 2012. Biocontrol of *Fusarium* head blight: interactions between *Trichoderma* and mycotoxigenic *Fusarium*. *Microbiology* 158, 98–106. Rojo *et al.* 2007. *Mycotoxin Research* 23: 173L179
- Melo, I. S. D., & Faull, J. L. (2000). Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. *Scientia Agricola*, 57(1), 55-59.
- Michel-Aceves. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp euascomycetes: Hypocreales), su Antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). Universidad De Colima. México. 176 p.
- Mokhtar, H., & Dehimat, L. (2015). In vitro and In vivo Efficiency of *Trichoderma harzianum* against *Phoma* and *Glocladium* Soft Rot Occurred on Tomato Fruits (*Lycopersicon esculentum*). *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 4(8), 141-147.
- Navajothy A., Narayanaswamy R., Danis Ponniah & Irudayaraj V. 2012. Physicochemical analysis of soil in relation to panama disease (*Fusarium* wilt) in banana. *IJP*. Vol. 5. No. 1. pp. 15-24.
- Núñez, D. 2008. Optimización del proceso de elaboración de pulpa de Babaco (*Carica pentagona*), con incorporación de su corteza y maximizando la retención de ácido ascórbico. Tesis de Ingeniería en Industrias Agropecuarias. Área Biológica. Universidad Técnica Particular De Loja, Ecuador. 102 p.

- O'Brien, H. E., J. L. Parrent, J. A. Jackson, J. M. Moncalvo y R. Vilgalys. 2005. Fungal community analysis by largescale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71:5544-5550.
- Ochoa, J.; Fonseca, G. 2000. First Report of *Fusarium* Wilt of Babaco (*Carica x heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador. *Revista Plant Disease*. 84(2): 190.
- Páez, M.E., Albarracin, N. 2007. Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Fav. Agron. (LUZ)*. Supl. 1: 27 – 31.
- Pal K. K., and B. M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. In: APSnet. [www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI\\_biologicalControl.pdf](http://www.apsnet.org/edcenter/advanced/topics/documents/PHI_biologicalControl.pdf). consulta: junio 2013.
- Prashar P., Kapoor N., Sachdeva S., 2014, Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance (Review), *Rev Environ Sci Biotechnol*, 13: 63-77
- Piranique. G., & Virgilio, N. *Factores edafológicos que determinan la presencia y diseminación del hongo Sclerotium cepivorum en el cultivo de cebolla de ulbo (Allium cepa) en Tibasosa, Boyacá* (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia).
- Razean Haireen, M. R., & Drew, R. A. (2014). Isolation and Characterisation of PRSV-P Resistance Genes in *Carica* and *Vasconcellea*. *International journal of genomics*, 2014.
- Robles, A. 2011. Evaluación de microorganismos antagonistas y sustancias naturales en el control de enfermedades foliares en tomate. Tesis de Máster en Ciencias en Agricultura Sostenible Mención "Sanidad Vegetal". Facultad

de Ciencias Agropecuarias. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Cuba.

- Rodríguez, M., Sánchez, L., Gómez, L., Hidalgo, L., González, E., Gómez, M., Díaz, L., Casanova, A., Cuadra, R., Fernández, E., Hernández, R., 2013. *Meloidogyne* spp., plagas de las hortalizas: alternativas para su manejo en sistemas de cultivo protegido. Rev. Protección Veg. Vol. 20 (1).
- Rojas-Triviño, A. 2011. Conceptos y Práctica de Microbiología General. Editorial: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. Palmira, Colombia. 161 p.
- Romero Rosales, T. (2014). Cepas nativas de *Trichoderma* spp., aisladas de suelo cultivado con jamaica, su antibiosis y micoparasitismo sobre *Phytophthora parasitica* y *Fusarium oxysporum*.
- Salazar, L., Sanabria, N., Aponte, G., Alcano, M., Herrera, R., Colmenares, D., & Magaña, S. (2011). Efectividad de aislamientos de *Trichoderma* spp. en el control de la *fusariosis* del tomate en condiciones in vitro e in vivo. *Bioagro*, 23(3), 185-190.
- Samuels, GJ., Chaverri, P., Farr, DF., McCray, EB. 2010. *Trichoderma* (online). Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA.
- Scheldeman, X. 2002. Distribution and potential of Cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) and highland papayas (*Vasconcellea* spp.) in Ecuador. Thesis of Doctor in Applied Biological Sciences. Faculty of Agricultural and Applied Biological Sciences. Ghent University, Belgium. 190 p.
- Schuster, A. y Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 87: 787-799 pp.
- Srivastava, R., Khalid, A., Singh, U. S., & Sharma, A. K. (2010). Evaluation of arbuscular mycorrhizal fungus, fluorescent *Pseudomonas* and

- Trichoderma harzianum* formulation against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* for the management of tomato wilt. *Biological Control*, 53(1), 24-31.
- Stocco, M. C. (2014). *Control biológico de Mycosphaerella graminicola, patógeno del trigo, con cepas de Trichoderma harzianum caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular* (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo).
  - Tobar, M. 2008. Análisis de competitividad de los productores de Babaco de San Pablo de Tenta (Saraguro, Loja) con enfoque de agrocadena. Tesis Magister en Estudios Sociales y Globales. Programa de Estudios Latinoamericanos Mención en Estudios Agrarios Universidad Andina Simón Bolívar, Ecuador. 109 p.
  - Toledo-Souza, E. D. D., Silveira, P. M. D., Café-Filho, A. C., & Lobo Junior, M. (2012). *Fusarium* wilt incidence and common bean yield according to the preceding crop and the soil tillage system. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 47(8), 1031-1037.
  - Torres, E., Iannaccone, J., & Gomez, H. (2008). Biocontrol del moho foliar del tomate *Cladosporium fulvum* empleando cuatro hongos antagonistas. *Bragantia*, 67(1), 169-178.
  - Uzcátegui C. 2007. Estudio de factibilidad para la implementación de una empresa dedicada a la industrialización del babaco. Tesis de Ingeniería Empresarial. Escuela Politécnica Nacional, Ecuador. 185 p.
  - Woo L, Scala F, Ruocco M, Lorito M. 2006. The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi, and plants. *Phytopathology*;96:181-185.

- Zeilinger S, Omann M. 2007. *Trichoderma* Biocontrol: Signal Transduction Pathways Involved in Host Sensing and Mycoparasitism. *Gene Regul Syst Bio*; 1: 227-234.
  
- Zakayyah, T. (2012). *Cultivar Susceptibility to the Fusarium Wilt Complex and Race Characterization of Fusarium oxysporum f. sp. vasinfectum* (Doctoral dissertation, Auburn University).

## IX. APÉNDICE

### Apéndice 1. Determinación de la Densidad Aparente del suelo

#### Materiales y métodos

- Muestra de suelo
- Equipo de barrenación (barreno tipo Uhland para toma de muestra sin disturbar, juego de cilindros biselados).
- Balanza analítica.
- Estufa.
- Pala.
- Machete.
- Tela porosa.
- Ligas.
- Método del cilindro o anillo volumétrico

#### Procedimiento

Se seleccionó el lugar del terreno y colocó el cilindro dentro del barreno; la muestra se tomó presionando el barreno hacia el suelo y cuando había lugares q estaba muy compactado el suelo se le puso agua, luego se dio golpes suaves con el martillo de goma.



La forma y característica del cilindro tiene por objeto evitar la alteración estructural al tomar la muestra. Luego se sacó el barreno suavemente con el fin de no dañar las muestras. Al sacar el cilindro que estaba dentro del barreno, se eliminó el exceso de suelo con la ayuda de un cuchillo de tal manera que el cilindro quedó totalmente lleno y con esto se poder obtener los 100 cc de suelo

capacidad del cilindro, luego se taparon correctamente, las mismas que fueron codificadas y guardadas, después llevadas al laboratorio para determinar la densidad aparente.

Se pusieron las muestras en la estufa a 105°C por 24 horas, luego se las sacó y se pesó, seguidamente se anotó el valor.



## CÁLCULOS

$$D_a(g/cm^3) = \frac{\text{Peso del cilindro con suelo seco}(105^\circ C) - \text{Peso del cilindro vacío}}{\text{Volumen del cilindro (100 cc)}}$$

**Apéndice 2.** Determinación de Capacidad de Campo, Punto de Marchitez, Permanente, Agua Aprovechable.

### **Materiales y equipos**

- Balanza de precisión
- Estufa
- Equipo de succión
- Placas de porcelana porosa-membranas (para alta y baja presión).
- Anillos de caucho
- Compresor de aire que permita una presión de alrededor de 20 atmosferas / cm<sup>2</sup>.
- Capsulas o cajas metálicas de 30 a 50 ml de volumen, con tapas taradas previamente.
- Tamizar el suelo
- Bandejas plásticas

### **Procedimiento**

#### **Saturación de las muestras**

Nos trasladamos a los invernaderos donde se recolecto las muestras de suelo, para tomar las muestras a la profundidad de la zona radicular de acuerdo al cultivo, las mismas que fueron codificadas y llevadas al laboratorio de suelos, para ponerlas a secar y luego tamizarlas.

Previamente verificamos la limpieza y buen estado de las placas antes de empezar a trabajar, luego se puso a saturar las placas de porcelana por 48 horas. Se colocó las placas de porcelana porosa sobre la mesa, manteniendo el borde del caucho elevado.

Se ubicó de manera circular los anillados de caucho sobre la placa y se registró el número de la muestra que se colocaron en el mismo orden sobre la placa, siguiendo el sentido de las agujas del reloj, así como el número de placa.

Se preparó el número de muestras a analizar siguiendo el orden que estuvieron dispuesta sobre la placa (se retiró los residuos vegetales o piedras que se encontraron con la mano).

Con la ayuda de una espátula, se llenó el anillo de caucho nivelando bien cada una sin ejercer presión, se llenó hasta el borde superior del anillo. Evitando ensuciar la placa en el suelo. Una vez que se concluyó con el llenado de suelo en los anillos, se colocó las membranas, unos aros metálicos y se añadió agua destilada sobre la placa, evitando que caiga agua sobre las muestras.

Esto se dejó así durante 24 horas, para evitar posibles contaminaciones, se cubrió las placas con un plástico. Después de las 24 horas de saturación, se eliminó el agua en exceso y se instaló las placas dentro de la olla de presión, luego se conectó los tubos de evacuación de las placas a los de la olla.



### **Tensión ejercida**

Previamente se prendió el compresor 2 horas antes de colocar las membranas, para obtener una presión suficiente alta y estable, se cerraron cuidadosamente las ollas y se colocó un recipiente junto a los tubos de drenaje de las ollas, para recoger el agua en exceso.

Luego se abrió el circuito de aire comprimido y se ajustó a la tensión deseada. Esta tensión se realiza en forma progresiva (sobre todo en el caso de presiones altas a 15 atmosferas). Alrededor de media hora después, se verifica y se ajusta en caso de ser necesario la tensión. Esto se dejó así por 24 horas, verificando regularmente la tensión.

### **Determinación de la humedad.**

Se Preparó las capsulas previamente identificadas con el número de cada muestra que estaba dentro del equipo, después de las 24 horas se apagaron los compresores y se deja escapar el aire abriendo las válvulas despacio y en forma progresiva, una vez que el manómetro está en cero, se abrió con cuidado la seguridad de las ollas y luego con cuidado se abrió las tapas.

Después se desconectó la manguera de drenaje que está conectada directamente a las capsulas porosas y se levantó cuidadosamente las placas para llevarlas a la balanza. Luego se pesó en la balanza de precisión la capsula vacía y se anotó el peso, después con la ayuda de una espátula ancha se pasó la muestra de suelo húmedo a la capsula y se pesó el suelo húmedo y se lo anotó.

Luego fueron llevadas a la estufa a 105 °C por 24 horas, una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar en un desecador para luego pesarlo. Se anotó el peso del suelo seco en el registro.

### **CALCULOS**

#### **Evaluación de las condiciones físicas del suelo**

##### ***Volumen total de poros***

Saturación = Porosidad

$$VS = 100 - Sat$$

Saturación = aire + agua

##### ***Saturación = macroporos + microporos***

PSH: Peso del suelo húmedo.

PSS: Peso del suelo seco.

PC: Peso del cilindro.

$$Saturacion = \frac{PSH - PSS}{PSS - PC}$$

##### ***Agua aprovechable***

AA: Agua aprovechable.

$$AA = CC - PMP$$

CC: Capacidad de campo.

PMP: Punto de marchitez permanente.

***Volumen físicamente inerte***

VFI: Volumen físicamente inerte.

$$VFI = [100 - (VTP - PMP)]$$

100: Constante.

VTP: Volumen total de poros.

PMP: Punto de marchitez permanente.

**Humedad gravimétrica. Hg**

$$Hg = \text{Log } P \times m + b$$

Hg: humedad gravimétrica.

Log P: logaritmo de las presiones (cbs).

**Humedad volumétrica. Hv**

$$Hv = Da \times Hg$$

Hv: Humedad volumétrica.

Da: densidad aparente (g/cm<sup>3</sup>).

### Apéndice 3. Determinación del pH

#### Materiales y métodos

##### Equipo:

- pH metro ORION 4 STAR.

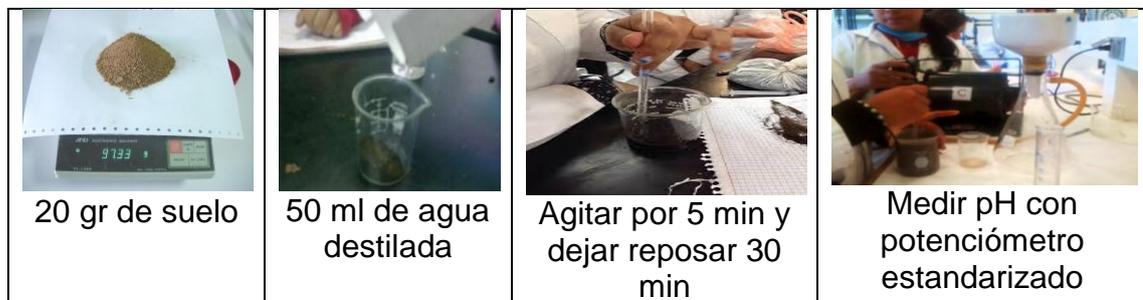
##### Reactivos:

- Solución buffer pH 4, pH 7, pH 10.

##### **Procedimiento:**

Se hizo la mezcla de suelo con agua destilada, y se dio agitación, luego se dejó reposar 30 minutos y se hizo la medida del potencial de hidrogeno utilizando un potenciómetro (electrodo de vidrio). La dilución utilizada fue (1:2.5) el líquido puede ser agua (pH-H<sub>2</sub>O); KCl 1 M (pH- KCl) o CaCl<sub>2</sub> 0.01 M (pH-CaCl<sub>2</sub>).

Se tomó 20ml de suelo y agregó 50ml de agua destilada, luego se agitó por 5 minutos a 400 rpm, y se dejó reposar por 30 minutos, luego se hizo la lectura en el potenciómetro previamente estandarizado, y se mide el pH mientras se agita la muestra.



##### Interpretación:

pH	Interpretación
5.5	Acido
5.6 a 6.4	Ligeramente acido
6.5 a 7.5	Prácticamente neutro
7.6 a 8.0	Ligeramente alcalino
8.1	Alcalino

Estos niveles son válidos cuando el pH se ha determinado en una suspensión de relación (1: 2.5).

#### **Apéndice 4.** Determinación de materia orgánica (método de Walkley-Black).

##### **Materiales y métodos**

- Balanza analítica 1/10 mg
- Erlenmeyer de 500 ml
- Buretas de precisión de 25 ml
- Pipetas de diferentes volúmenes
- Probetas
- Vasos
- Cronómetro

##### **Reactivos**

- Ácido sulfúrico concentrado.
- Ácido ortofosfórico concentrado.
- Solución de dicromato de potasio 1N.
- Difenilamina.
- Solución de sal de Morh 0,5 N.

##### **Procedimiento:**

Para la aplicación de este método, las muestras de suelo, deben estar secas, triturada y libre de raicillas y restos de materia orgánica grandes, para el efecto las muestras fueron tamizadas sobre papel encerado (tamiz de 0,25 mm).

	
Etiquetado y codificación de muestras de suelos en el invernadero del laboratorio	Tamizaje de muestras de suelo en papel de 0,25 mm

Se pesó 0,1 g de suelo cuando existía mucha MO y 0,5 g cuando el suelo tenía poca MO.

	
<p>Muestras de suelo listas para el pesaje para determinar su contenido de materia orgánica.</p>	<p>Pesado de submuestras, 10 g en suelos negros y &gt;10 g en caso de suelos claros o amarillentos y arenosos.</p>

Se agregó 5 ml de dicromato de potasio 1 normal y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado al 97 % por muestra.

	
<p>Adición de 5 ml de dicromato de potasio</p>	<p>Adición de 10 ml de ácido sulfúrico al 97 % en Erlenmeyer que contienen 10 g de suelo.</p>

Se agitó suavemente durante un minuto a fin de homogeneizar, evitando que la muestra se adhiera a las paredes del matraz.

Se dejó en reposo durante 30 minutos. Luego de este tiempo se agregó en el siguiente orden: 100 ml de agua destilada, 5 ml de ácido fosfórico al 85 % y 4 gotas de difenilamina, en este estudio.

	
<p>Adición de 100 ml de agua destilada.</p>	<p>Adición de 5 ml de ácido fosfórico al 85 %.</p>

Se tituló el exceso de dicromato por medio de la solución de sal de Morh de concentración 0,5 normal. El viraje de color se hizo de azul a verde, luego se anotó el volumen consumido.

	
<p>Adición de sal de Morh con una concentración de 0,5 normal</p>	<p>Muestras de suelo tituladas</p>

Para cada conjunto de muestras analizadas se realizó un blanco siguiendo el mismo procedimiento que con las muestras.

Para el cálculo de la cantidad de materia orgánica y carbono de cada muestra se utilizó las fórmulas propuestas por Alvarado *et al.*, (2000), cuyos resultados ESTÁN DADOS EN PORCENTAJE.

### CÁLCULOS:

$$MO \% = \frac{(V_o - V) * N * 0,39 * 1,72 * 1,1}{PM}$$

Dónde:

Vo	: Volumen gastado en la titulación del blanco.
V	. Volumen gastado en la titulación de la muestra
N	: Normalidad exacta del sulfato de hierro.
0,39	: Peso equivalente del carbono
1,72	: Constante de conversión de C a MO sobre la hipótesis de que la materia orgánica contiene 58 % de C en la generalidad de suelos encontrados en el Ecuador.
1,1	: Error de conversión de C a MO (10 %)
PM	: Peso de la muestra de suelo

## **Apéndice 5.** Capacidad de Intercambio Catiónico (método del Formaldehido)

### **Materiales y métodos**

- Balanza analítica
- Vaso de precipitación
- Vareta
- Embudo
- Papel filtro
- Pipetas
- Pipeteador

### **Reactivos:**

- Acetato de amonio 1 N.
- Alcohol etílico.
- NaCl
- Formol al 40 % neutralizado.
- Fenolftaleína
- Hidróxido de sodio a 0.1 N.

### **Procedimiento:**

Se pesó 5 gr de suelo al cual se le agregó 25ml de  $\text{AcNH}_4$  1N pH 7,0 y se agitó por 30 min luego se dejó reposar 15min. Una vez transcurrido el tiempo se filtró y paso más acetato hasta completar 100ml. El filtrado se lo recibió en botellas de polietileno y se guardó para determinar  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ , y  $\text{Na}^+$ .

Luego se lavó el suelo con 100 ml de alcohol etílico y se hizo filtrando 20 ml de alcohol etílico por 5 ocasiones. Nuevamente se lavó el suelo con NaCl al 10% en porciones de 10 ml por 5 veces y se recibió la solución en Erlenmeyer de CIC.

Al mismo que se le agregó 10 ml de formol al 40% neutralizado al filtrado de NaCl, luego se adicionó al contenido 3 a 4 gotas de fenolftaleína al 1%. Esto se titulo con NaOH 0,1 N hasta llegar a un color rosado y también se realizó un blanco con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, NaCl y formol.



5 gr de suelo



Agregar 25 ml de acetato de amonio al 1N pH7.0 y agitar por 30min



Filtrar el suelo con acetato de amonio



Agregar 10ml de acetato de amonio + 50 ml de alcohol etílico al 96%



Lavar con 50 ml cloruro de sodio al 10%



Agregar 10ml de formol al 40 %



Agregar hidróxido de sodio 0.1N al filtrado.



Agregar de 3 a 4 gotas de fenolftaleína al 1%.



Blanco: 50ml de NaCl al 10% y 10 ml de formol al 40%



Agregar de 2 a 5 gotas de fenolftaleína al 1% y agrega hidróxido de sodio 0.1 N. para titulación



### CALCULOS:

$$\text{CIC (meq/100 g)} = (\text{gasto de NaOH 0,1 N de la muestra} - \text{gasto de NaOH del$$

**Apéndice 6.** Determinación de Textura del suelo (método de Buyucus o Método del Hidrómetro).

### **Materiales y métodos**

- Muestras de suelos
- Vasos plásticos de 250 ml
- Pipetas de 5 a 10 ml
- Vaquetas
- Probetas Buyucus

### **Equipo**

- Agitador mecánico para suelos con sus accesorios
- Balanza analítica de precisión. 0,01g – 0,00001g
- Hidrómetro (ASTM)
- Termómetro Centígrado 250°C
- Cronómetro

### **Reactivos**

- Agua destilada
- Alcohol amílico
- Agentes dispersantes: Hidróxido de sodio 1 N, Na (OH) + Oxalato de sodio saturado (C<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>).

### **Procedimiento**

Se pesó 50 gr de muestra de suelo y se colocó en un vaso de plástico de 250 ml, al mismo se le agrego 100 ml de agua destilada y 5 ml de hidróxido de sodio 1N, más 5 ml de oxalato de sodio saturado.

Se dejó en reposo durante 30 minutos, luego se agitó la mezcla con un vaqueta, luego se vertió con todo cuidado en el vaso de dispersión y se puso en el agitador para dispersar durante 5 minutos para suelos arenosos y 15 minutos para suelos arcillosos.

		
<p>50 gr de suelo</p>	<p>100 ML H<sub>2</sub>O destilada 5ml de NaOH a1N 5ml de oxalato de Na</p>	<p>Mezclar la solución y verter en un vaso de dispersión.</p>

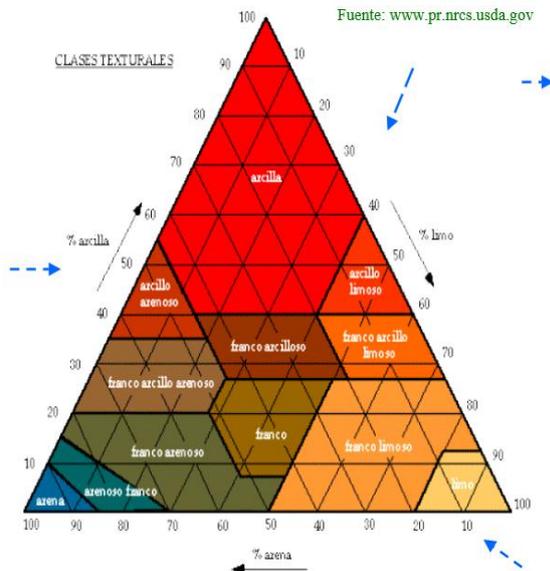
Se trasladó la suspensión dispersada a una probeta de vidrio Buyucus cuidando de no dejar ningún residuo en el vaso, para eso se adicionó un poco de agua destilada con la ayuda de la peseta enjuagando el vaso y depositarla en la probeta.

Con el hidrómetro en la probeta de Buyucus se completó a 1000 ml de agua destilada, luego se introdujo el agitador manual dentro de la probeta y con movimientos de arriba abajo agitamos hasta que la mezcla de sólidos este uniforme. En el caso de haber espuma, se adiciona una gota de alcohol amílico sobre la superficie la suspensión.



Se colocó nuevamente el hidrómetro en la probeta, para medir la primera lectura al final de los 40 segundos y se anotó en el cuadro de resultados, luego se retiró lentamente el hidrómetro y se midió la temperatura en la suspensión, se anotó en el cuadro de resultados. Después de transcurrido 2H00 de sedimentación se

realizó una segunda lectura con el Hidrómetro y conjuntamente la segunda temperatura y se anotó en el cuadro.



## CÁLCULOS.

Con el hidrómetro se mide en gr/l del material en suspensión. Después de haber cesado la agitación, se realizó la lectura a los 40 segundos esta es una medida de (ARENA) en suspensión. La lectura a las 2H00 es una medida de ARCILLA en suspensión, las lecturas iniciales se las corrigió en base a la temperatura de la suspensión.

El hidrómetro esta calibrado a 67 °F (20°F). El factor de corrección es de (0,36°C).

Por cada grado Fahrenheit de diferencia se suma el factor, sí la temperatura de la suspensión está sobre la temperatura de calibración (20°C), se resta sí la temperatura de suspensión está por debajo de la temperatura de calibración (20°C).

Para hacer la corrección de lecturas del hidrómetro, se usó la siguiente tabla que brinda más precisión y que es deducida de la ecuación de sedimentación de Fisher – Oden.

Tabla de conversión

Temperatura °C	Factor corrección	de
14	2.16	
15	1.88	
16	1.44	
17	0.108	
18	0.72	
19	0.36	
20°C		0.0
Calibración		
21	2.16	
22	1.88	
23	1.44	
24	0.108	
25	0.72	
26	0.36	

Se calculó el material en suspensión y se hizo en base a la lectura corregida y el peso de la muestra utilizada a través de la siguiente ecuación:

LECTURA CORREGIDA

%MATERIAL EN SUSPENSIÓN = ----- X 100

PESO DE LA MUESTRA

## Apéndice 7. Conductividad eléctrica

### Materiales y métodos

- Vasos de Beaker 250ml plástico.
- Embudo Buchner
- Puente de conductancia(conductímetro)
- Papel filtro cualitativo
- Bamba de vacío
- Tubos de ensayo
- Varillas

### Reactivo

- Solución de cloruro de potasio a la 0.01M

### Procedimiento

Se pesó 0,7455 g de KCl previamente seco a 105°C por dos horas y se disolvió en un litro de agua desionizada y destilada de buena calidad. Esta solución dió una conductividad de 1,412 mS/cm a 25°C.

**Pasta saturada de suelo:** se tomó aproximadamente 100 ml de suelo previamente pasado por un tamiz de 2mm y se agregó agua destilada agitando con 1 varilla de vidrio o espátula. Al saturarse la pasta brilla, por la reflexión de la luz; fluye ligeramente y se inclinó el recipiente. Después de mezclar se dejó reposar la muestra 24 horas antes de filtrar en un embudo Buchner aplicando vacío. Se midió la resistencia eléctrica de la suspensión en las escalas dadas por el equipo.



100 gr de suelo



Agregar agua destilada



Mezclar hasta que el suelo se sature y dejar reposar 30 min.



Filtrar en el embudo de Buchner.



De mide la CE, en el conductímetro, antes de usarlo se debe medir la temperatura de líquido.

**Apéndice 8.** Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre del 2013

PARAMETROS	UNID	ENE.	FEB.	MAR.	ABR.	MAY	JUN	JUL.	AGO.	SEPT.	OCT.	NOV.	DIC.
TEMPERATURA MEDIA	o C	17,1	17,3	17,7	16,9	17,5	16,6	15,2	15,6	16,5	17,1	17,3	17,6
PRECIPITACION TOTAL	Mm	141,7	169,7	48,8	18,9	137	60,2	93,5	36,3	63,4	144	50,7	69,6
HUMEDAD RELATIVA	%	79	83	79	77	80	78	77	78	74	78	74	77
HELIOFANIA	Horas	86,9	68,6	91,4	149	139	120,3	122,1	143,1	158,2	148	183,9	128,9

**Apéndice 9.** Datos meteorológicos de las zonas de la provincia de Loja, Enero – Diciembre del 2014.

PARAMETROS	UNIDADES	ENE.	FEB.	MAR.	ABR.	MAYO	JUN	JUL	AGO	SEPT.	OCT.	NOV.	DIC.
TEMPERATURA MEDIA	o C	16,7	16,9	16,9	17,1	17,3	16	16,2	15,9	16,9	17,3	17,6	18
PRECIPITACION TOTAL	mm	84,5	83,8	218,2	28,2	115,5	137,2	44	62,2	20	145,5	51,1	72
HUMEDAD RELATIVA	%	81	81	84	77	82	80	74	73	72	74	76	78
HELIOFANIA	horas	121,3	79,8	84,4	97,6	132,7	109,3	134	133	158,8	158,9	153	113

**Apéndice 10.** Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (AML2), con *Trichoderma* (ECM6), durante 192 horas de evaluación

Tratamiento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
1	33,37a	31,27	43,70a	48,81a	46,86	51,21	56,18	59,63
2	22,02ab	15,31	9,99 b	14,26 b	12,74	20,28	30,57	37,38
3	26,77ab	22,61	27,47ab	32,12ab	37,86	41,78	49,10	53,41
4	20,46 b	18,37	14,39 b	19,88 b	23,44	25,24	33,21	41,49
5	25,53ab	18,75	21,99 b	33,46ab	40,94	47,54	52,76	57,12

Las letras diferentes entre columnas del mismo día indican diferencias significativas para Tukey ( $P \leq 0,05$ )

**Apéndice 11.** Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (AML1), con *Trichoderma* (ECM6), durante 144 horas de evaluación.

Tratamiento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
1	10,87	6,74	6,29 b	24,76	17,14	12,99
2	20,12	10,78	5,67 b	15,92	13,08	11,72
3	19,36	8,26	5,04 b	26,98	27,52	25,18
4	18,66	8,61	2,14b	32,50	34,90	37,55
5	19,46	23,73	37,57a	42,42	42,57	39,62

Las letras diferentes entre columnas del mismo día indican diferencias significativas para Tukey ( $P \leq 0,05$ )

**Apéndice 12.** Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (CHA1), con *Trichoderma* (ECM6), durante 192 horas de evaluación

Tratamiento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	192 h
1	27,25a	15,26	22,77	30,72	37,93	37,18	41,28	45,07
2	6,83 b	15,02	25,43	36,61	45,50	50,34	53,28	62,81
3	16,06ab	23,09	29,48	35,99	45,68	52,94	57,22	61,75
4	11,17ab	13,99	16,66	27,26	31,76	40,27	47,89	54,46
5	22,47ab	24,37	28,29	30,99	42,90	49,71	55,91	59,19

Las letras diferentes entre columnas del mismo día indican diferencias significativas para Tukey ( $P \leq 0,05$ )

**Apéndice 13.** Inhibición del crecimiento radial (PICR) en cultivos duales de *Fusarium* (QUI2), con *Trichoderma* (ECM6), durante 144 horas de evaluación

Tratamiento	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h
1	13,16	9,26	8,36	31,06	36,21	36,07
2	13,23	4,53	3,24	21,77	32,69	38,68
3	15,24	9,93	11,65	28,17	38,42	42,69
4	12,33	10,37	16,19	37,55	45,63	51,89
5	11,98	9,26	10,72	37,77	48,55	55,25

Las letras diferentes entre columnas del mismo día indican diferencias significativas para Tukey ( $P \leq 0,05$ )

**Apéndice 14.** *Colecta* de suelos en los catones Loja y Saraguro.



Cantón: Saraguro  
Barrio: Cochapamba  
Cultivo de Babaco en  
invernadero.



Cantón: Loja  
Parroquia: Chuquiribamba  
Barrio: El Carmelo  
Cultivo de Babaco a campo  
abierto.



Etiquetado y conservación de muestras para diluciones

**Apéndice 15.** Diluciones seriadas para el aislamiento de *Trichoderma* en medio sólido TSB.



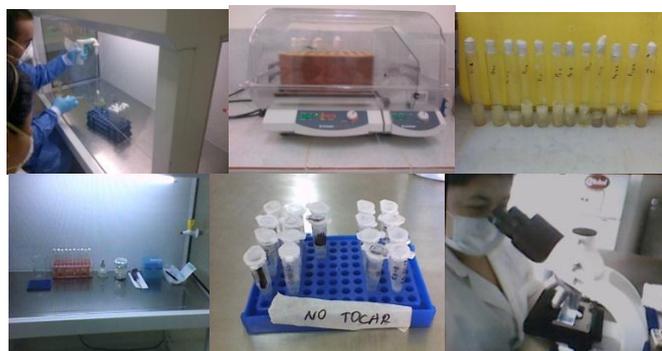
**Apéndice 16.** Purificación de cepas aisladas de *Trichoderma*



**Apéndice 17.** Elaboración de micro cultivos para la caracterización morfológica de *Trichoderma*



**Apéndice 18.** Siembra de micelio e incubación de tubos con *Trichoderma* spp en medio líquido.



**Apéndice 19.** Pruebas de antagonismo in vitro con *Trichoderma* spp como agente de biocontrol de la MVB.

