



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS
NATURALES RENOVABLES**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**“BIOCONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR
DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii*. var.
pentágona) EMPLEANDO MICROORGANISMOS
ANTAGONISTAS”**

Tesis de Grado Previo a la
Obtención del Título de
Ingeniera Agrónomo.

AUTORA:

Ruth Raquel Espinoza Buele

DIRECTOR:

Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión, M. Sc.

LOJA-ECUADOR

2016



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

CERTIFICACIÓN

Ing. Ángel Robles Carrión M. Sc.

DIRECTOR DE TESIS.

CERTIFICO:

Que el presente trabajo de investigación titulado “**BIOCONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii*, var. pentágona) EMPLEANDO MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS**” de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica: **RUTH RAQUEL ESPINOZA BUELE**, ha sido desarrollada de acuerdo a las actividades de investigación establecidas, las mismas que cumplen a cabalidad con la planificación, cronograma, metodologías y requisitos legales exigidos por el Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja. Por lo expuesto, queda autorizada la presentación para fines legales.

Loja 13 julio del 2016

.....
Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión M. Sc.

DIRECTOR DE TESIS



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES
RENOVABLES**

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

CERTIFICACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

“BIOCONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii*. var. pentágona). EMPLEANDO MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS”

Tesis presentada al tribunal de grado como requisito, previo a la obtención del título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO
APROBADA**

Ing. Edmigio Valdivieso Caraguay
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

Dr. Tulio Solano Castillo M. Sc.
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Ing. Bolívar Peña Merino
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

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

AUTORÍA

YO **RUTH RAQUEL ESPINOZA BUELE**, declaro ser autora 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.

Firma:



Autora: Ruth Raquel Espinoza Buele.

Cédula: 1104431414

Fecha: Loja, julio del 2016

CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR, PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA Y TEXTO COMPLETO.

Yo **Ruth Raquel Espinoza Buele**, declaro ser autor, de la tesis titulada **“BIOCONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii*. var. pentágona) EMPLEANDO MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS”**, como requisito para optar al grado de **INGENIERA AGRÓNOMO**, autorizo al Sistema Bibliotecario de la Universidad Nacional de Loja para que con fines académicos, muestren al mundo la producción intelectual de la Universidad, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera en el Repositorio Digital Institucional:

Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo en el RDI, en las redes de información del país y del exterior con las cuales tenga convenio la Universidad.

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

Para la constancia de esta autorización, en la ciudad de Loja a los 15 días del mes de julio del 2016, firma la autora.

Firma: ----- 

Autora: Ruth Raquel Espinoza Buele.

Número de Cedula: 1104431414

Dirección: Loja, calles Machala y Jaramijó.

Teléfono: 072657802 Celular: 0996576995

E-mail: raquelita29031990@outlook.es

DATOS COMPLEMENTARIOS.

Director de Tesis: Ing. Agr. Ángel Robles Carrión M. Sc.

Tribunal de Grado: Ing. Edmigio Valdivieso Caraguay. PRESIDENTE

Dr. Tulio Solano Castillo. VOCAL

Ing. Simón Bolívar Peña Merino. VOCAL

AGRADECIMIENTO

A la Carrera de Ingeniería Agronómica del Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja que me brindó la posibilidad de formarme profesionalmente durante los cinco años de estudio y en especial un sincero agradecimiento a sus catedráticos y servidores quienes que con sus sabias enseñanzas supieron impartir sus conocimientos, contribuyendo de manera desinteresada a mi completa formación profesional.

Al Centro de Biotecnología y a sus directivos por permitirme realizar la fase de laboratorio de mi trabajo de tesis.

Al Ing. Ángel Robles Carrión M Sc. director de mi tesis quien me brindó apoyo asesoramiento en todo el proceso investigativo.

Al Dr. Roldan Torres por brindarme sus valiosos conocimientos y orientación en la culminación de esta investigación.

Finalmente agradezco a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron en el desarrollo de esta investigación.

Ruth Raquel Espinoza Buele.

DEDICATORIA

A Dios que es el pilar fundamental en mi vida por darme inteligencia y sabiduría para cumplir mis metas, por ser signo de amor, perseverancia para superarme. A mis padres Diego y Delia a quienes amo, admiro y respeto mucho por su apoyo incondicional, que con su amor, esfuerzo y dedicación han sabido darme buenos ejemplos y guiarme por el camino correcto inculcando en mi valores, por cada uno de sus consejos para cada día ser mejor y no dejarme vencer por ningún obstáculo, por estar siempre a mi lado cuando más los he necesitado y enseñarme a ser agradecida con Dios y con las personas que me han ayudado y apoyado en mi vida. A mis hermanos y hermanas que han estado siempre dándome su confianza y ánimo para superarme. A mis sobrinos, sobrinas y en especial a mi hija por brindarme la fortaleza e inspiración y ser el motor de mi vida. A toda mi familia, amigas que estuvieron siempre apoyándome ya sea de forma moral como espiritual.

Ruth Raquel Espinoza Buele.

INDICE GENERAL

Contenido	Págs.
PORTADA	i
CERTIFICACIÓN	ii
CERTIFICACION DEL TRIBUNAL	iii
AUTORÍA	iv
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS	v
AGRADECIMIENTO	vi
DEDICATORIA	vii
INDICE GENERAL.....	viii
INDICE DE CUADROS	x
INDICE DE FIGURAS.	xi
INDICE DE ANEXOS.	xii
TITULO	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
I. INTRODUCCIÓN.	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.	3
2.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE BABACO.	3
2.1.1. Producción.....	4
2.2. LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO.	4
2.2.1. Descripción de la enfermedad.....	4
2.2.2. Síntomas	5
2.2.3. Agente causal.....	6
2.2.4. Ciclo de la enfermedad.....	7
2.3. CONTROL BIOLÓGICO DE <i>F. oxysporum</i>	8
2.3.1. Agentes utilizados en el control biológico de <i>Fusarium oxysporum</i>	10
2.3.2. Mecanismos de acción de los agentes de control biológico.	14
2.4. Estudios realizados con microorganismos de la rizósfera.	18
III. MATERIALES Y MÉTODOS.	21
3.1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	21
3.1.1. Ubicación política.....	21

3.1.2.	Ubicación geográfica.....	21
3.1.3.	Ubicación ecológica.....	22
3.2.	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS	22
3.2.1.	Material de Laboratorio.....	22
3.2.2.	Materiales de campo.	22
3.2.3.	Materiales de escritorio.....	22
3.2.4.	Material biológico.....	23
3.2.5.	Reactivos.....	23
3.3.	METODOLOGÍA.	24
3.3.1.	Metodología del primer objetivo. “Determinar la capacidad antagonista de microorganismos rizosféricos sobre los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> en condiciones de laboratorio.”	24
3.3.2.	Metodología del segundo objetivo. “Establecer la cinética del desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante la aplicación de varios microorganismos rizosféricos bajo invernadero”	26
IV.	RESULTADOS	30
4.1.	Capacidad antagonista de microorganismos rizosféricos sobre los diferentes aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> en condiciones de laboratorio.	30
4.2.	Cinética del desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante la aplicación de varios microorganismos rizosféricos bajo invernadero.....	35
V.	DISCUSIÓN.....	37
5.1.	Capacidad antagónica de microorganismos rizosféricos sobre diferentes aislados de <i>fusarium oxysporum</i> en condiciones de laboratorio.....	37
5.2.	Cinética del desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante la aplicación de varios microorganismos rizosféricos bajo invernadero	38
VI.	CONCLUSIONES.	41
VII.	RECOMENDACIONES.	42
VIII.	BIBLIOGRAFIA.	43
IX.	ANEXOS.	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aislados de <i>Fusarium</i> spp., identificados morfológica y molecularmente..	23
Cuadro 2. Bacterias aisladas de la raíz de Babaco de la provincia de Loja.	23
Cuadro 3. Actividades desarrolladas durante la cuarentena.....	27
Cuadro 4. Escala de evaluación (severidad externa) de la Marchitez Vascular del Babaco.	29

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Mapa de ubicación del lugar de realización de la investigación.	21
Figura 2. Distribución espacial de los tratamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> (QUI2). .	26
Figura 3. Distribución espacial de los tratamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> (AML2).	26
Figura 4. Crecimiento radial <i>F. oxysporum</i> (QUI2) frente a la inoculación cepas bacterianas y <i>Trichoderma</i> utilizadas en el ensayo.	30
Figura 5. Antagonismo de aislados bacterianos y <i>Trichoderma</i> contra <i>F. oxysporum</i> (QUI2).	31
Figura 6. Crecimiento radial <i>F. oxysporum</i> (AML2) frente a la inoculación cepas bacterianas y <i>Trichoderma</i> utilizadas en el ensayo.....	33
Figura 7. <i>Antagonismo de aislados bacterianos y Trichoderma contra F. oxysporum. (AML2)</i>	34
Figura 8. Progresión de la enfermedad de Marchitez Vascular del Babaco en condiciones de invernadero según los tratamientos evaluados.	36

INDICE DE ANEXOS.

Anexos 1. Fotografías del proyecto de tesis de la fase de campo y de laboratorio.	50
Anexos 2. Grados de escala de severidad externa de la Marchitez Vasculare del Babaco a los 10 días luego de la inoculación.....	53
Anexos 3. Conteo de estructuras conidiales de las cepas de <i>Fusarium oxysporum</i> (AML2) y <i>Trichoderma</i> spp. (ECM6).	54
Anexos 4. Tríptico entregado en la socialización de resultados.....	56
Anexos 5. Registro de asistencia, de la socialización de resultados.....	58

**“BIOCONTROL DE LA MARCHITÉZ VASCULAR DEL BABACO
(*Vasconcellea heilbornii*. var. pentágona) EMPLEANDO MICROORGANISMOS
ANTAGONISTAS.”**

RESUMEN

El marchitamiento vascular del Babaco causado por *Fusarium oxysporum* constituye una de las enfermedades destructivas en las áreas cultivadas, es por ello que se planteó como objetivo: Evaluar el biocontrol de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) empleando microorganismos antagonistas bajo condiciones *in vitro* e *in vivo* sobre el crecimiento del cultivo. La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja, los aislados de *F. oxysporum* (QUI2) y (AML2) fueron proporcionados de la colección de microorganismos rizosféricos del babaco del Centro de Biotecnología, los aislados de *Trichoderma viride* (ECM6) y las rizobacterias (*Enterobacter amnigenus*, *Kluyvera intermedia* y *Lelliottis amnigena*). Se realizaron dos ensayos triales hongo-hongo- bacteria (*F. oxysporum*-*Trichoderma*-*E. amnigenus*, *K. intermedia* y *L. amnigena*). Se realizaron 7 tratamientos en laboratorio de cada uno de los aislados de *Fusarium oxysporum* y 5 en invernadero. Para evaluar el porcentaje de biocontrol de cada tratamiento, se midió el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de Abbott. Para la evaluación *in vivo*, se emplearon 55 plantas de Babaco de 60 días de edad, se procedió a la inoculación con una suspensión de conidios de *Fusarium* y de *Trichoderma* de 1×10^6 UFC/ml, el inóculo de la rizobacteria se preparó en forma de suspensión ajustando a una concentración de 1×10^8 UFC/ml, con la Escala de McFarland. Se evaluó el porcentaje de biocontrol, tanto los ensayos de las pruebas *in vitro* como *in vivo*, fueron realizados bajo un diseño completamente aleatorizado (DCA). El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico SPSS versión XXII. Para el análisis de varianza, se aplicó la prueba de medias de Tukey, a fin de determinar los mejores tratamientos aplicados. El control del marchitamiento vascular fue más efectivo con el tratamiento de *F. oxysporum* (AML2) + *Trichoderma* + *E. amnigenus*, tanto en condiciones de laboratorio como en la fase de invernadero. Se hizo evidente que las bacterias inoculadas en solitario no son capaces de controlar la enfermedad. Estos resultados preliminares permiten dilucidar el efecto controlador de diferentes combinaciones microbianas para establecer una estrategia de biocontrol en el cultivo del Babaco.

PALABRAS CLAVE: Control biológico, antagonismo, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma* spp.

SUMMARY

Vascular wilt Babaco is caused by the fungus *Fusarium oxysporum* and is one of the most destructive diseases in cultivated areas, and for this reason is the subject of this research as to how to evaluate the biocontrol of Vascular Wilt Babaco (VWB) using antagonistic microorganisms under *in vitro* and *in vivo* conditions on crop growth. This research was conducted at the Center for Biotechnology at the National University of Loja, isolates of *F. oxysporum* (QUI2) and (AML2) were taken from the collection of babaco rhizosphere microorganisms from the Biotechnology Center as well as isolates of *Trichoderma viride* (ECM6) and rhizobacteria (*Enterobacter amnigenus*, *Kluyvera intermedia* and *Lelliottis amnigena*). Two-industrial experiments on the fungus bacteria (*F. oxysporum*-*Trichoderma*-*E. amnigenus*, *K. and L. intermediate amnigena*) were conducted. 7 treatments were performed in laboratory of each of the *Fusarium oxysporum* isolates and 5 treatments were conducted under greenhouse conditions. To evaluate the percentage of biocontrol of each treatment, the inhibition percentage pertaining to radial growth (IPRG) was measured using Abbott's formula. For the *in vivo* evaluation, 55 x 60 day old plants were used, and inoculated with a conidia suspension of *Fusarium* and *Trichoderma* 1×10^6 CFU / ml. The inoculum of rizobacteria was prepared as a suspension adjusted to a concentration level of 1×10^8 CFU / ml on the McFarland scale. The percentage of biocontrol, both *in vitro* and *in vivo* assays were conducted under a completely randomized design (CRD). Statistical analysis was performed using SPSS version XXII. For the variance analysis the Tukey test was applied to determine the best treatments applied. The control of vascular wilting was more effective with the treatment of *F. oxysporum* (AML2) + *Trichoderma* + *E. amnigenus*, both under laboratory and greenhouse conditions. It became clear that the bacteria inoculated on their own were unable to control the disease. These preliminary results obtained clarified the controlling effect of different microbial combinations in establishing a biocontrol strategy in the cultivation of Babaco.

KEYWORDS: Biological Control, antagonism, *Fusarium oxysporum*, *Trichoderma spp.*

I. INTRODUCCIÓN.

La marchitez vascular del babaco (MVB), causado por *Fusarium oxysporum*, constituye una enfermedad importante y con mayor incidencia en las zonas donde se cultiva el babaco, ocasionando graves pérdidas, especialmente cuando se lo cultiva bajo invernadero, la cual es un ambiente típico para el desarrollo del patógeno (Ochoa y Fonseca, 2000).

En Ecuador, la mayoría de los suelos agrícolas destinados a la producción del babaco, se encuentran altamente infestados con este patógeno, el cual ha ocasionado reducciones en la producción de este cultivo hasta en un 100% (Bravo, 2012).

Por lo expuesto anteriormente, la naturaleza saprofítica del patógeno y su gran capacidad de sobrevivencia, ha causado serios daños de importancia económica en las zonas tradicionalmente productoras ubicadas en las provincias de la zona norte y sur de la sierra ecuatoriana (Núñez, 2008; Jácome, 2011). La importancia de controlar al patógeno *F. oxysporum* f.sp. *vasconcellae* radica en que el babaco se destina tanto al consumo fresco como al procesamiento industrial, constituyendo además la fuente de sustento para los agricultores dedicados a su producción, que requieren de alternativas de control favorables con el medio ambiente, que no pongan en peligro su salud y que controlen eficientemente los patógenos que afectan a este cultivo (Bravo, 2012).

Para el control de MVB, los agricultores han usado grandes cantidades de plaguicidas, los cuales han resultado poco satisfactorios, debido a que representan un riesgo para la salud humana y el ambiente ya que pueden contaminar suelos, agua, sedimentos y aire (Ampuero, 2008). Además, tomando en cuenta que los plaguicidas clasificados como extremadamente tóxicos por Organización Mundial de la Salud (OMS), son de uso frecuente y la importancia que representa el Babaco en el consumo y los altos niveles aplicados para su producción, particularmente en las zonas productoras, se hace necesario la reducción en el uso de estos productos por las razones

anteriormente expuestas. En base a ello, es importante señalar que 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 patógenos vegetales. Entre los microorganismos más importantes se encuentran las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Enterobacteriaceas* y hongos de los géneros *Gliocladium*, *Penicillum* y *Trichoderma*, siendo éste último el más utilizado para el control de un grupo importante de patógenos del suelo. (Pérez, 2004; Druzhinina *et al.*, 2011).

Dada la importancia del patógeno *F. oxysporum* f.sp. *vasconcellae* causante de la MVB y con el propósito de hacer más eficiente el control de la MVB, surge la necesidad de utilizar diversos microorganismos para el control biológico de enfermedades, los mismos juegan un papel importante en la regulación natural de las poblaciones de patógenos. Sin embargo, las investigaciones encaminadas en el Ecuador son muy escasas. Es por ello, que las investigaciones y el uso de agentes de control biológico se muestra como un complemento o alternativa frente a la utilización del control químico (Pérez, 2004), haciendo necesaria la búsqueda de organismos capaces de controlar los agentes patógenos que causan considerables pérdidas a este importante cultivo para las regiones andinas y en especial para la sierra ecuatoriana.

Los objetivos planteados en esta investigación son los siguientes:

Objetivo general.

- Evaluar el biocontrol de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) empleando microorganismos antagonistas.

Objetivos específicos.

- Determinar la capacidad antagonista de microorganismos rizosféricos sobre los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* en condiciones de laboratorio.
- Establecer la cinética del desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante la aplicación de varios microorganismos rizosféricos bajo invernadero.

II. REVISIÓN DE LITERATURA.

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL CULTIVO DE BABACO.

La amplia biodiversidad en cultivos agrícolas en el Ecuador incluyendo a sus ancestros, encontrados en forma silvestre, 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).

El babaco es originario de las zonas altas de Ecuador y Colombia, en forma natural, se encuentra desde hace varios decenios en los valles abrigados del callejón interandino y lugares secos de la costa, es un híbrido natural proveniente de las especies *V. cundimarcensis* (Chamburo) y *V. stipulata* (Toronche). Esta especie debe establecerse en zonas donde no exista una presencia fuerte de vientos y heladas. (Montenegro, 2009).

La especie *V. heilbornii*, "babaco" es actualmente la especie más importante de las *Vasconcelleae*. Se cultiva en algunos países subtropicales y es considerada como originaria de los valles de la provincia de Loja (Scheldeman, 2002).

En el Ecuador, las principales zonas del cultivo de babaco en invernadero y a campo abierto son: las provincias de Imbabura (Atuntaqui, Perucho); Tungurahua (Patate y Baños); Pichincha (Tumbaco); Azuay (Gualceo, Santa Isabel) y Loja (Vilcabamba, Catamayo), constituyen las provincias representativas en la producción de babaco (Ampuero, 2004). Su producción ha crecido favorablemente y según datos reportados se calcula que la superficie sembrada de babaco puede llegar de 150 a 200 ha, representados en su mayoría por cultivos bajo invernadero (Núñez, 2008).

El cultivo del babaco es de mayor difusión comercial, especialmente en Ecuador y sur de Colombia, introducida a Nueva Zelanda, Australia, Israel, Italia, Grecia y Brasil. En el país se cultiva babaco, sin embargo, el problema principal es la forma de reproducción de las plantas. El fruto es partenocarpo, (no produce semillas) lo que reduce su propagación a una forma asexual es decir a la obtención de clones por estacas en otras plantas del mismo género, lo cual ha repercutido en la falta de diversidad genética y la contaminación masiva del Babaco con varias enfermedades. (Falcón y Brito, 2006).

2.1.1. Producción.

El período vegetativo del babaco desde la siembra hasta la recolección es de 14 meses. Su fructificación empieza a partir del año y medio según la altitud y el clima. El Babaco produce de 25 a 45 frutos/planta/año, con una densidad de 2500 plantas por hectárea produce entre 50 y 80 toneladas por año (García, 2011).

Dentro de invernadero se puede llegar a obtener un rendimiento de 320 ton/ha (32 kg de fruta/m²), con un total de 8,000 plantas por hectárea (0.8 plantas/m²) e inclusive se ha llegado a obtener 600 ton/ha con densidades de 0.6 a 1 planta/m², sistema en el que el peso del fruto llegó a ser muy alto. (García, 2011).

Según la Corporación de Promoción de Exportaciones e Inversiones (CORPEI, 2006), vale señalar que el Ecuador exportó 5560,62 tn en promedio en los años 2002-2003.

2.2. LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO.

2.2.1. Descripción de la enfermedad.

En el país la marchitez vascular del babaco, es una enfermedad radicular importante ya que puede llegar a una incidencia de hasta el 100%, ésta es transmitida fácilmente a través del material de propagación contaminado (Falconí *et al.*, 2006).

La principal causa por la cual esta enfermedad es difícil de controlar es por la imposibilidad del Babaco para producir semilla (por ser un híbrido natural) y usar como única alternativa la propagación asexual mediante estacas, con la consecuente pérdida de variabilidad genética y resistencia a enfermedades. De esta manera algunos productores para disminuir las pérdidas económicas cortan plantas y producen estacas contaminadas vendiéndolas a otros, propagándose de esta manera la enfermedad en nuevos terrenos de forma acelerada (Galarza, 2002).

2.2.2. Síntomas

Los primeros síntomas que producen la marchitez es el amarillamiento de las hojas bajas, luego este se extiende a toda la planta con lo que provoca una defoliación total y destrucción de las raíces. A nivel de la corona, el tejido se torna de un color café que conforme avanza la enfermedad su consistencia se torna acuosa. La gran mayoría de los frutos caen, pero unos pocos pueden permanecer en la planta, los cuales tiene un aspecto rugoso y deshidratado. El crecimiento de brotes nuevos se detiene; en el ápice vegetativo se observa un necrosamiento (pudrición blanda) descendente, el mismo que puede alcanzar a todo el tallo, debiéndose básicamente al ataque y movimiento vascular de la enfermedad (Agrios, 2005).

Las estructuras del hongo (micelio o esporas) se adhieren en primer lugar a la superficie externa de los órganos de la planta, a través de estas estructuras penetran directamente a la raíz mediante heridas realizadas durante las labores agrícolas, daños de insectos y nematodos (Agrios 2005).

El micelio del hongo se propaga dentro de las células de la planta de la corteza de la raíz, cuando llega a los vasos xilémicos, entra y se mantiene exclusivamente en ellos, comienza ascender por el tallo hacia el ápice de la planta. El micelio se ramifica y produce estructuras llamadas microconidias que son desprendidas y llevadas hacia la parte superior de la planta con el flujo de la savia (Agrios 2005).

Las microconidias maduran o germinan en el punto donde se detiene su movimiento ascendente. El micelio del hongo avanza dañando las células vegetales, impidiendo el paso de agua y savia. Por la escasez de agua de las células se mueren y el micelio del hongo se expande por todos los tejidos de la planta para consumir rápidamente los elementos disponibles, el patógeno llega a la superficie de los tejidos muertos y allí esporula formando macroconidias (Agrios, 2005).

El hongo produce toxinas que pueden ser llevadas también hacia las hojas ocasionando el amarillamiento, marchitez y finalmente la muerte de la planta (Agrios, 2005).

2.2.3. Agente causal.

La especie de *Fusarium oxysporum* fue descrita por el micólogo Von Schlechtend en 1824, este género comprende un amplio y diverso grupo de especies de distribución mundial, frecuentemente aislados como saprófitos en aguas, suelos y sustratos orgánicos en descomposición. La distribución de este género se atribuye a su capacidad para crecer en diferentes sustratos y a sus eficientes métodos de dispersión. (Días de Castro *et al.*, 2007). Además es el agente causal de la Marchites Vascular, enfermedad que afecta una gran variedad de cultivos económicamente importantes alrededor de todo el mundo (Ortoneda., 2004).

F. oxysporum se encuentra ampliamente distribuido en el suelo, en partes subterráneas y aéreas de las plantas, plantas en descomposición y sustratos orgánicos. Los marchitamientos vasculares causados por este patógeno son más comunes y destructivos en las regiones templadas más cálidas y en los trópicos y subtropicos, llegando a ser menos dañinos o raros en climas más fríos, excepto en el caso de los cultivos de invernaderos. Los factores como el clima, la vegetación, el tipo o la humedad del suelo influyen directamente en la distribución y abundancia de este hongo (Cook y Baker, 1995).

- **Clasificación taxonómica**

Según Agrios (2005), *Fusarium* se clasifica en: Reino: Mycatae, División; Mastigomicota, Clase: Dueteromycetes, Orden Moniliales, Familia: Tuberculariacwae, Género: Fusarium, Especie: *Fusarium oxysporum*.

- **Clasificación morfológica**

Las colonias Fusarium, crecen de moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, o copioso (Agrios, 2005).

Fusarium oxysporum presenta un micelio incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquiere una coloración rosa pálido o algo púrpura. Produce conidióforos alargados en algunos

casos sólo constan de una célula conidiógena, otros están ramificados, a veces en verticilos, septados, individuales, agrupados en esporodoquios (Agrios, 2005).

Presenta conidias hialinas y variables; produce 3 tipos de esporas asexuales, los macroconidios son estructuras largas en forma de media luna o elípticas, multiseptadas, constituidos de tres a cinco células que se encorvan hacia ambos extremos, los ápices son puntiagudos y en muchas especies con una célula basal en forma de pie (Agrios, 2005). Los microconidios, que tienen de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia, su forma pueden ser: elipsoidal, fusiforme, claviforme, piriforme o subgloboso con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas, pero en algunas especies en cadenas basípetas. No siempre se producen ambos tipos de esporas.

Las clamidosporas son el tercer tipo de espora que produce este hongo. Constituidas por una o dos células, son de pared gruesa, pueden ser terminales, laterales o intercalares, a veces formando cadenas. Las clamidosporas pueden permanecer largo tiempo en el suelo debido a que están adaptadas a condiciones adversas (Vizuite, 2000).

2.2.4. Ciclo de la enfermedad.

Primeramente el hongo penetra en la planta por las raíces, invade luego algunos vasos del xilema y pronto taponan todo el sistema vascular. El primer síntoma es un amarillamiento, más adelante se observa la marchitez de las hojas por falta de nutrientes y por último la defoliación de la planta (Agrios, 2005).

La infección es el proceso mediante el cual los patógenos entran en contacto con las células o tejidos susceptibles de un hospedero y en el que se producen nutrientes suficientes para ambos, durante la infección, los patógenos se desarrollan o se reproducen dentro de los tejidos de la plantas, e invaden a estas de forma variable, de esta manera, la invasión del patógeno sobre los tejidos, el crecimiento y reproducción (Gomes y Macas, 2014). Cuando esta enfermedad infecta los tejidos de la planta hospedante induce el mecanismo de defensa y provoca la secreción de un gel seguido por la formación de tilosas en los haces vasculares, de esta forma se obstruye el

movimiento del agua a la parte superior (follaje) de la planta y ocasiona el amarillamiento, marchitez y eventualmente, la muerte de la planta. (Leong., 2009).

2.3. CONTROL BIOLÓGICO DE *F. oxysporum*.

El control biológico surge como una alternativa sustitutiva o complementaria a las ya existentes empleadas para el manejo de enfermedades causadas por diferentes patógenos en diversas especies de plantas. Se considera como un método importante para la recuperación del equilibrio de los agroecosistemas y para el aprovechamiento del potencial antagonista natural de ciertos microorganismos contra patógenos vulnerables (Avendaño et al., 2006). El control biológico como un componente del manejo integrado de enfermedades mediante el uso de organismos vivos con el fin de suprimir la densidad poblacional o el impacto de un organismo patógeno específico, haciéndolo menos abundante o menos dañino de lo que pudiera ser (Eilenberg *et al.* 2001). En este contexto, microorganismos como hongos, bacterias y virus son considerados como Agentes de Control Biológico- ACB, los cuales reducen la incidencia y la severidad de las enfermedades (Kloepper y Ryu, 2007).

Para el control de *F. oxysporum*, se han empleado plantas resistentes, fungicidas, desinfección química de los residuos, entre otras, las cuales sin embargo no han tenido la eficacia esperada, debido a la aparición de nuevas variantes del patógeno en el caso de plantas resistentes, generación de resistencia a los diferentes agroquímicos, y a la contaminación que estos materiales producen en el medio ambiente, que en algunos casos han sido reportados como cancerígenos para el hombre (Kloepper y Ryu, 2007).

Otras formas de control más amables con el medio ambiente, son diferentes prácticas agrícolas que sirven para disminuir el inóculo de varios fitopatógenos del suelo, incluyendo *F. oxysporum*. Una de estas es la solarización, la cual consiste en el incremento de la temperatura del suelo por medio de la energía solar a niveles en los cuales muchos patógenos mueren, o son debilitados, para obtener un control significativo de las enfermedades. Adicionalmente, aunque también modifica el balance microbiano para favorecer microorganismos benéficos, como *Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.* (Kloepper y Ryu, 2007).

El método de inmersión de raíces, se observa los signos de la enfermedad en menor tiempo debido que en la inoculación hay contacto directo de *Fusarium* con el sistema radicular de la planta (Gomes y Macas, 2014).

La biofumigación o biodesinfección, es otra práctica agrícola mejor adaptada a regiones frías del planeta, que se basa en el cubrimiento plástico del suelo después de la incorporación de materia orgánica fresca. Esta al fermentarse, genera condiciones anaeróbicas y producción de metabolitos tóxicos (dependiendo de las especies vegetales empleadas) en el suelo, contribuyendo a la inactivación o destrucción de hongos patogénicos. La rotación de cultivos con plantas no hospedantes, es una medida de manejo que evita el incremento de poblaciones específicas de patógenos, lo cual resulta en una disminución de la incidencia y severidad de la enfermedad; de igual modo esta práctica puede estimular poblaciones de microorganismos antagonistas que afecte el crecimiento o actividad del patógeno (Weller, *et al.*, 2002). Por último, el manejo de residuos dejados sobre o cerca de la superficie del suelo es perjudicial, al preservar los patógenos y prevenir un decrecimiento en el inóculo de este, como es el caso de las especies del género *Fusarium sp.* Sin embargo, en otros casos, dejar residuos de cosecha de otras especies e incorporarlos al suelo, promueven la descomposición rápida y liberación de carbono en el suelo, favoreciendo un incremento en la actividad microbiana y mejorando el nivel de supresión, (Weller *et al.*, 2002).

El control biológico de *F. oxysporum* en numerosos cultivos es por la aplicación de bacterias y hongos antagonistas aislados a partir de suelos supresivos se ha investigado durante las últimas dos décadas (Weller *et al.*, 2002). Actualmente, existen varios estudios que reportan diferentes cepas de PGPRs, principalmente del género *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Paenibacillus* como controladoras de este hongo, después de obtener resultados inhibitorios en experimentos tanto *in vitro* como en la aplicación de estos biocontroladores a semillas de las plantas y sustrato donde se siembran (Liu *et al.*, 1995).

Debido a los modos de acción de este hongo para invadir a la planta por la raíz y permanecer en los suelos durante un tiempo prolongado, las PGPRs se han constituido en controladores biológicos importantes en la actualidad gracias a sus características metabólicas y biológicas particulares, donde incluso ya se tienen fórmulas comerciales

desarrolladas a base de este tipo de bacterias para el manejo y control de la marchitez causada por *Fusarium* y otros patógenos (Haas y Défago, 2005).

Sin embargo, es importante aclarar que su implementación a nivel mundial, con el fin de reemplazar productos de síntesis química, ha sido un proceso lento, debido principalmente a que los niveles de supresión de enfermedades no siempre alcanzan a los obtenidos por fungicidas y bactericidas, al alto costo y menor viabilidad de los productos, y en gran parte a la falta de conocimiento e implementación de los mismos por parte de los agricultores (Nakkeeran *et al.*, 2006).

2.3.1. Agentes utilizados en el control biológico de *Fusarium oxysporum*.

En muchos ecosistemas de explotación agrícola, los patógenos del suelo adaptados a crecer y sobrevivir en el suelo, pero cuando entran en contacto con la rizósfera, establecen la relación parasítica con la planta. Existen cuatro grupos principales de fitopatógenos (hongos, bacterias, nematodos y virus), de los cuales los hongos verdaderos y los oomycetes, son los más importantes (Weller *et al.*, 2002). La gran mayoría de hongos fitopatógenos son necrotróficos, lo cual significa que destruyen el tejido del hospedero con enzimas y toxinas a medida que avanza la hifa y no requieren de células vivas para obtener nutrientes (Raaijmakers *et al.*, 2009).

Estos microorganismos se han descrito como agentes de control biológico de enfermedades en cultivos. Prácticamente todas las plagas y enfermedades son afectadas en alguna medida por organismos antagonistas. En muchos casos estos entes biológicos representan un factor importante en la regulación de las poblaciones de microorganismos fitopatógenos en la naturaleza (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

Hongo: Entre las especies de hongos más ampliamente estudiadas y aplicadas como control biológico, se encuentran las del género *Trichoderma*, debido a su eficaz control, capacidad reproductiva, plasticidad ecológica, efecto estimulante sobre los cultivos y recientemente se detectó su acción como inductor de resistencia sistémica en la planta a diferentes patógenos (Infante *et al.*, 2009). El género *Trichoderma* es un controlador biológico y antagonista natural de fitopatógenos ya que muestra una amplia gama de hospedantes y dentro de ellos están los hongos fitopatógenos de importancia, tales

como: *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* spp., entre otros (Rodríguez, 2012).

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Las especies de *Trichoderma* se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Esta distribución tan amplia y su plasticidad ecológica están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos. No obstante, se han realizado pocos estudios acerca de la sobrevivencia, establecimiento y proliferación de este antagonista en la rizósfera de la planta, además el género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Aceves, 2001).

El género *Trichoderma* se ubica taxonómicamente según Agrios (2005) en: Reino: *Fungi*, División: *Ascomycota*, Subdivisión: *Pezizomycotina*, Clase: *Sordariomycetes*, Orden: *Hipocreales*, Familia: *Hipocreaceae*, Género: *Trichoderma*, Especie: *Trichoderma viride*.

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino, los conidióforos son ramificados, parecen un árbol pequeño. Los mismos se presentan como penachos compactados que forman anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides donde se forman las esporas asexuales o conidios, de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies. Los conidios aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo de las plantas. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio (Tobar, 2008).

La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo, las clamidosporas recién formadas presentan más de 75% de germinación, bajo condiciones óptimas de humedad (> 75%) y temperatura (28-30°C) (Tobar, 2008).

Trichoderma puede estar influenciado por la temperatura del suelo en términos de su distribución mundial. *T. viride* se encuentran mayoritariamente en regiones templadas-frías. El rango de temperaturas en las que puede crecer *Trichoderma* 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).

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. 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).

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).

(Bertona, 2005), reporta que el género *Enterobacter* incluye 22 especies o biogrupos clasificados de acuerdo a características bioquímicas o similitudes genómicas. Estas especies son: *E. helveticus*, *E. amnigenus*, *E. intermedius*, *E. arachidis*, *E. nimipressuralis*, *E. kobei*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. dissolvens*, *E. cowanii*, *E. asburiae*, *E. hormaechei subsp. steigerwaltii*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. sacchari*, *E. soli*, *E. hormaechei subsp. oharae*, *E. oryzae*, *E. asburiae*, *E. pulveris*, *E. gergooviae* y *E. pyrinus*.

Enterobacter es un género de bacterias Gram negativas facultativamente anaeróbicas de la familia de las Enterobacteriaceae. Muchas de estas bacterias son patógenas y causa de infección oportunista, otras son descomponedoras que viven en la materia orgánica muerta o viven en animales y en el ser humano como parte de una población microbiana normal (Brooks et al., 2010). Las colonias son grandes y mucosas; algunas cepas forman cápsulas. Como fuente de carbonos pueden utilizar glucosa y lactosa, e incluso citratos. No forman sulfato de hidrógeno (Bertona, 2005).

Estas bacterias son utilizadas como inoculantes biológicos que son productos elaborados a partir de una o varias cepas de microorganismos eficientes y/o benéficos de rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR, por sus siglas en inglés), los cuales al aplicarse al suelo o directamente a las semillas, estimulan el crecimiento de la misma, al favorecer la disponibilidad, toma, transporte y adquisición de los nutrientes en asociación con la planta o su rizósfera, además colonizan la rizósfera de las plantas y son capaces de producir hormonas vegetales como auxinas y giberelinas, citoquininas, etileno (Ogbo y Okonkwo, 2012). Según el ICA, estos bioinóculos deben adaptarse a los cultivos y tener una concentración no menor a 1×10^5 UFC/ml (ICA, 2006). Los biofertilizantes se pueden aplicar en suelos en donde se ha reducido la diversidad y efectividad de los microorganismos o cuando, aunque existan microorganismos nativos estos no se asocien efectivamente con la especie de planta cultivada (Ramírez, et al., 2008). De igual manera su importancia también radica no solo en los beneficios brindados a las plantas, sino también en su capacidad de unirse a partículas del suelo, que al formar agregados estables, mejoran la estructura del suelo y reduce la potencial erosión (Rivera- Cruz, et al., 2008). El empleo de inoculantes biológicos que contienen células vivas o latentes de cepas microbianas en los sistemas productivos, es una

alternativa viable para lograr un desarrollo agrícola ecológicamente sostenible, ya que permite una producción a bajo costo, no contamina el ambiente y mantiene la conservación del suelo desde el punto de vista de fertilidad y biodiversidad (Jaizme-Vega, et al., 2003).

Las comunidades microbianas del suelo son de vital importancia para el mantenimiento del balance ecológico del mismo y por lo tanto de la sostenibilidad de ambientes naturales o agroecosistemas. Estas comunidades microbianas se encuentran en su mayor parte en la rizósfera conocida como la interfase donde interactúan los constituyentes del suelo, las raíces de las plantas y los microorganismos ya sean saprófitos, epífitos, endófitos, patógenos o benéficos. Los microorganismos promotores de crecimiento de las plantas pueden ser considerados microorganismos benéficos ya que influyen la salud de la planta, estos efectos benéficos ya han sido reportados con anterioridad para diferentes cultivos como herbáceas, papa, frijol, soya, cítricos, banano, entre otros, todo eso debido a diversos mecanismos como la producción de fitohormonas, solubilidad de fosfatos, fijación de nitrógeno o control biológico sobre patógenos (Rivera-Cruz, et al., 2008).

2.3.2. Mecanismos de acción de los agentes de control biológico.

En la naturaleza existe una continua interacción entre los microorganismos fitopatógenos y sus antagonistas, de forma tal que ellos ayudan a la regulación natural de las enfermedades. En condiciones naturales los microorganismos están en una proporción dinámica en la superficie de las plantas. No es fácil establecer con precisión los mecanismos que actúan en las interacciones entre los microorganismos antagonistas y los microorganismos fitopatógenos sobre la planta. En general los antagonistas tienen varios modos de acción y la combinación de estos es importante para poder elegir un antagonista ideal. Si estos poseen diversos modos de acción, se reducen los riesgos de que los microorganismos fitopatógenos adquieran resistencia, lo cual se logra mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción. Así, se han descrito varios mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción para controlar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Aceves, 2001; Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006; Ezziyyani et al., 2006).

- **Antagonismo**

Los microorganismos antagonistas presentan una serie de mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto biorregulador, como son la competencia directa por el espacio y los nutrientes; la secreción extracelular de enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas, etc.; el parasitismo directo; y la producción de sustancias antibióticas, ya sean de naturaleza volátil o no volátil (Ezziyani et al., 2006). Además, ciertos microorganismos crean un ambiente favorable a la planta, con mecanismos como la inducción de resistencia y la solubilización de nutrientes no accesibles en su forma original por la planta (Mondino y Vero, 2006).

- **Antibiosis**

La destrucción celular debida a enzimas o metabolitos de otros organismos (exolisis) se puede producir por la producción por parte de un microorganismo competidor de antibióticos, que normalmente actúan a muy bajas concentraciones. Hay antibióticos volátiles y otros productos tóxicos también volátiles capaces de afectar el crecimiento de las células, como el etileno o el cianuro de hidrógeno que también actúan a bajas concentraciones, aunque estos productos no se consideran antibióticos en sentido estricto. Los antibióticos son el mecanismo mas estudiado de antagonismo entre microorganismos dada su importancia en medicina. La mayoría de los antibióticos han sido aislados de microorganismos del suelo, aunque también se han encontrado en microorganismos que viven en las hojas o en otras partes de las plantas (Howell, 2003).

Los antibióticos más comunes producidos por las diferentes bacterias antagonistas incluyen al amonio, butirolactonas, 2,4-diacetil fluoroglucinol (DAPG), kanosamina, oligomicina A, oomicina A, ácido fenacin-1-carboxílico, pioluteorina, pirrolnitrina, viscosinamida, xantobacina y zwitermicina. Muchos de estos antibióticos tienen un amplio espectro de acción contra patógenos, y el DAGP fue el más potente y más ampliamente estudiado (Raaijmakers et al., 2009).

El papel que cada uno de los antibióticos tiene para suprimir a los patógenos, ha sido claramente establecido mediante análisis de mutaciones y genética molecular. Por ejemplo, mutantes de *P. fluorescens* con una sobreexpresión de DAGP ofrece una mejor

protección contra las enfermedades causadas por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* y la marchitez bacteriana del tomate causada por *Ralstonia solanacearum* (Raaijmakers et al., 2009).

- **Competencia**

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren la misma cosa y el uso por uno reduce la cantidad disponible para el otro. La competencia puede ser por los sitios de infección, donde la ocupación de dichos sitios por un microorganismo impide la colonización por otro o bien por determinados nutrientes. En la competencia por nutrientes o bien un microorganismo posee un mecanismo de absorción mejor o posee enzimas extracelulares más activos, de forma que uno obtiene más nutrientes y crece, mientras que el otro no obtiene nutrientes suficientes para crecer. Este mecanismo está demostrado en cuanto a las fuentes de carbono y de nitrógeno, y también es posible para otros requerimientos como oxígeno, hierro y en el caso de autótrofos por la luz. Si hay un exceso del nutriente de forma que hay para todos no hay competencia. En sitios pobres la competencia es por los espacios reducidos donde es posible utilizar el nutriente, no por el espacio total, como ocurre en las hojas de las plantas en climas templados donde el espacio ocupado por microorganismos suele ser inferior al 1%. En raíces la cantidad de exudado producido permite el crecimiento de una cierta biomasa de microorganismos, independientemente de que sean uno o varios si usan el mismo nutriente (Infante et al., 2009).

- **Fungistasis**

Consiste en imponer condiciones de inactividad especialmente para las esporas de hongos por limitación en los nutrientes, generalmente se emplea limitación en las fuentes de carbono. Muchos patógenos producen estructuras de supervivencia que se encuentran en el suelo a la espera de que exista una fuente de nutrientes para desarrollar las formas activas del microorganismo. Los elementos saprotrofos pueden reducir las fuentes de carbono e imponer la fungistasis a las esporas del patógeno impidiendo que germinen y que infecten a las plantas. La disponibilidad de carbono en forma asimilable permite la germinación de esporas y la adición de materia orgánica en forma de compost o similares estimula la actividad microbiana de los saprotrofos, de forma que se origina una intensa competencia, pudiendo producir limitación de carbono para las esporas y

fungistasis. Solo cuando se añade carbono por encima de las necesidades de los saprotrofos las esporas germinan y se rompe la fungistasis. Un ejemplo de fungistasis es la competencia por carbono de diferentes especies de *Fusarium* en suelos donde los saprotrofos impiden la infección por los aislados patógenos (Pérez, 2004).

- **Resistencia sistémica adquirida**

Consiste en la inducción del sistema de defensa que da resistencia al hospedador frente a patógenos por la interacción con un microorganismo no patógeno, el agente de biocontrol. Una vez puesto en marcha el mecanismo de resistencia es operativo ante el ataque de un patógeno. Cuando se induce la resistencia la planta expresa una serie de genes que confieren resistencia como 1,3-b-glucanasas, fitoalexinas, genes relacionados con el refuerzo de la pared celular como peroxidasas y la deposición de lignina, callosa y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y proteínas relacionadas con patogénesis, proteínas. Además radica en una o varias moléculas (no necesariamente antagonistas de fitopatógenos) con la capacidad de inducir autodefensas en las plantas frente a la acción del cualquier microorganismo fitopatógeno. Existen dos tipos de resistencia: la constitutiva, propia de la planta y que se expresa en cualquier momento, y la inducida, expresada solo ante determinados estímulos. Las interacciones planta-patógeno son de dos tipos: compatible, cuando ocurre la enfermedad, e incompatible, cuando la planta resiste. De ahí se sustenta la teoría del gen para el gen. (Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

- **Micoparasitismo**

Es la acción antagónica entre dos hongos, el uno (hiperparásito) parasita al otro (micoparásito) a través de una síntesis de exoenzimas hidrolíticas para facilitar la degradación de la pared celular del hospedante. Un antagonista puede utilizar a un hongo como fuente de alimento. Basado en el micoparasitismo se dividen en dos grupos: biotrópicos, tienen un rango restringido de hospedantes, y necrotrópicos, matan a la célula antes o después de la invasión, excretan sustancias tóxicas y utilizan sus nutrientes (Aceves, 2001; Pérez, 2004). Este mecanismo abarca diferentes interacciones antagonista- patógeno. Consiste en que el hongo antagonista enrolla y penetra el micelio del patógeno. Las hifas del antagonista se multiplican y expanden dentro de las hifas del

hospedero, provocando la pérdida total del protoplasma, dejando solo células vacías. Durante este proceso el antagonista actúa como parásito, forma diferentes estructuras como abrazaderas, ganchos o apresorios que le permiten adherirse y provocar lisis y huecos en las células del patógeno. En el mecanismo de parasitación entre *Trichoderma* a otros hongos, se distingue cuatro estados: a) crecimiento quimiotrófico, en el cual, el estímulo químico proviene del hongo objeto de control; b) reconocimiento específico, probablemente mediado por aglutininas (lecitinas) sobre la superficie celular tanto del hongo antagónico como del patógeno; c) unión y crecimiento de las hifas alrededor del hospedero y d) secreción de enzimas líticas que degradan las paredes celulares del hospedero (Harman, 2006).

2.4. Estudios realizados con microorganismos de la rizósfera.

Cueva, (2007) evaluó la producción de bioformulados (inoculantes) a base de *Trichoderma spp* para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. caricae en plantas de Babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv Babaco) injertadas en papaya hawaiana. Para lo cual se aislaron diversas cepas de *Trichoderma spp* de tres provincias, tomando muestras de suelo. En laboratorio se efectuaron pruebas de eficiencia in vitro (pruebas duales) entre las cepas de *Trichoderma spp* y *Fusarium oxysporum* f. sp. caricae para medir el crecimiento diametral y la capacidad antagónica, seleccionando así las dos mejores cepas, *Trichoderma álbum* y *Trichoderma koningii*. Luego se aplicó bajo invernadero a temperatura y humedad controlada mediante disoluciones las diversas concentraciones de las dos mejores cepas de *Trichoderma*, a las plantas de Babaco injertadas en papaya hawaiana y 15 días después se inoculó artificialmente *Fusarium oxysporum* f. sp. Los resultados demostraron que el mejor incremento diario de altura del injerto fue de 0.06 cm en el grupo de plantas tratadas con inoculante a base de *T. álbum* debido al efecto positivo en el crecimiento, sin embargo las dos cepas de *Trichoderma* realizaron un buen control sobre el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. caricae.

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.

Martínez (2012), quien realizó el estudio sobre la evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. para control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá, en condiciones *in vitro*. Para lo cual, se aislaron ocho cepas de *Fusarium* de las raíces de la maracuyá y una cepa de *Trichoderma*. La evaluación del PICR (porcentaje de inhibición del crecimiento radial) de 50%, la cual corresponde al grado 2 de la escala de capacidad antagonista frente a la cepa de *Fusarium solani*.

Villa, (2015), 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), donde realiza las pruebas de antagonismo *in vitro* con *Trichoderma* spp como agente de biocontrol de la MVB, mediante la caracterización morfológica se obtuvieron 12 cepas de *Trichoderma*, teniendo a una de ellas como las mejor muestra, 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.

Medina, (2015) evaluó la cinética e interacción de aislados fúngicos del género *Fusarium*, causante de la marchitez vascular en Babaco, en condiciones de invernadero lo cual menciona que utilizó 150 plántulas de Babaco de tres meses de edad, sembradas en sustrato estéril. El método de inoculación fue por inmersión de raíces, para la evaluación de la patogenicidad utilizó la escala de evaluación propuestas por Veintimilla (2000). Los resultados obtenidos muestran que los tratamientos T2, T3, T4 y T5 presentaron síntomas típicos de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB). Por lo tanto, siguiendo los postulados de Koch, confirma que todos los cuatro tratamientos fueron capaces de producir un alto grado de severidad de la enfermedad en el cultivo del Babaco.

Rentería, (2015), en este trabajo de investigación realiza con el fin de evaluar la interacción entre *Fusarium*-*Trichoderma* en Babaco, mediante estudios histológicos, donde 42 plantas de Babaco de 60 días de edad se las sometieron a infecciones

inducidas en seis tratamientos, donde evaluó la severidad de cada uno de los tratamientos por un periodo de 40 días, seleccionando los tratamientos: T1, T2, T4 y T5. Los resultados sugieren que la incidencia de la MVB, en la provincia de Loja se encuentra en un rango comprendido de 66,7 al 100%. La cepa de *Trichoderma* spp., mostró gran capacidad antagónica frente a las dos cepas de *Fusarium* sp., reduciendo su severidad en un rango comprendido de 3,6 a 10,7% en el último periodo de evaluación.

III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

El presente estudio se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Nacional de Loja, el cual constó de dos fases experimentales en condiciones controladas. La primera fase de laboratorio se realizó en el Centro de Biotecnología; mientras la fase de invernadero se cumplió en el área de la Quinta Experimental “La Argelia”.



Figura 1. Mapa de ubicación del lugar de realización de la investigación.

Fuente: CINFA, 2014.

3.1.1. Ubicación política.

La Universidad Nacional de Loja se encuentra ubicada en el barrio la Argelia; parroquia San Sebastián, Cantón Loja, perteneciente a la provincia de Loja, en el sur del Ecuador (Figura 1) (CINFA, 2014).

3.1.2. Ubicación geográfica.

Los laboratorios del Centro de Biotecnología se encuentran ubicados al sur de la ciudad y cantón de Loja, en la parroquia San Sebastián. Geográficamente se encuentra en las siguientes coordenadas: Latitud 04° 08' 00" S, Longitud 79° 12' 00" O y una Altitud de 2134 msnm (CINFA, 2014).

Como se ha hecho alusión, en nuestro estudio también se dispuso de las instalaciones donde se encuentran los invernaderos de la UNL, los cuales se localizan en las siguientes coordenadas: Latitud: 04° 08' 04" Sur, Longitud: 79° 12' 4,3 "Oeste y Altitud: 2170 msnm.

3.1.3. Ubicación ecológica.

La temperatura promedio anual en la Universidad Nacional de Loja, es de 16°C, con una precipitación de 800 mm año. Según Holdridge (1971), se encuentra en una zona de vida bosque seco montano bajo (bs-MB), clima temperado-Subhúmedo.

3.2. EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS UTILIZADOS EN LOS EXPERIMENTOS

3.2.1. Material de Laboratorio.

Tubos de ensayo, estufa, matraz, espátula, cinta masking, algodón, alcohol potable, alcohol industrial, bisturí, haza microbiológica, pinzas, parafina, gradillas para tubos de ensayo, matraz Erlenmeyer, vasos de precipitación, cajas de petri, papel aluminio, guantes quirúrgicos, mascarillas, papel de filtro, mango de bisturí, tubos eppendoff, pipetas, probetas. (Veintimilla, 2007).

Baño maría, vortex, cámara de Neubauer, cámara de flujo laminar, autoclave, microscópicos, incubadora, balanza analítica, autoclave, Estufa, Balanza analítica,

3.2.2. Materiales de campo.

Libreta, cámara, palas, podadora, fundas plásticas, baldes plásticos de 12, sacos, material de aseo, bombas de fumigar, insumos químicos, regaderas, carretilla de desinfección al vapor, umbráculo 10 m x 1,5 m, invernadero, tierra, arena sílica y turba, escalas de evaluación (Evaluación interna y externa). (Veintimilla, 2007).

3.2.3. Materiales de escritorio.

Computadora, libreta de campo, registros y documentos digitales, cámara fotográfica, marcadores.

3.2.4. Material biológico

Se utilizarán 2 aislados *F. oxysporum*., y tres de bacterias de los cantones de Loja y Saraguro, caracterizados morfo-cultural, molecularmente y patogénicamente (Armijos y Salinas, 2014; Gómez y Macas, 2014). Una cepa de *Trichoderma* caracterizado por Villa (2015). (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislados de *Fusarium oxysporum* y de *Trichoderma viride*, del suelo de la rizosfera de babaco, identificados morfológica y molecularmente.

Código de Aislado	Pares de Bases	Medida de la conidia (LxA)		Especie
		Micro	Macro	
QUI2	522 bp	2.38x1.00	11.02x1.97	<i>Fusarium oxysporum</i>
AML2	522 bp	2.64x1.02	16.18x2.01	<i>Fusarium oxysporum</i>
ECM6	1729 bp	2,50	3,75	<i>Trichoderma viride</i>

Leyenda: Amable María (AML), Quisquinchir (QUI) y El Carmelo (ECM6).

Cuadro 2. Aislados bacterianos del suelo de la Rizosfera de Babaco de la provincia de Loja.

Código de Aislado	Crecimiento	Color	Elevación	Bordes	Tinción Gram	Pares de Bases	Especie
COP 1	+++	Opaco	+++	Reg	-	1392 bp	<i>Enterobacter amnigenus</i>
COP 3	+++	Opaco	+++	Reg	-	660 bp	<i>Kluyvera intermedia</i>
COP 7	+++	Opaco	+++	Reg	-	1392 bp	<i>Lelliottia amnigena</i>

Leyenda: Abreviaturas de las localidades de aislamientos: Cochapamba: COP1, COP3, COP7. Crecimiento: +++ (rápido o abundante), Elevación: (+++) convexa; Bordes: Reg: Regular (entero o continuo), Tinción Gram: - (Gram negativo).

3.2.5. Reactivos

Medio PDA (Papa, Dextrosa, Agar), Medio AN (Agar nutriente), agua destilada.

3.3. METODOLOGÍA.

3.3.1. Metodología del primer objetivo. “Determinar la capacidad antagonista de microorganismos rizosféricos sobre los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* en condiciones de laboratorio.”

Pruebas de antagonismo directo (cultivos duales) en condiciones *in vitro*

Se cultivaron colonias puras de los dos aislados de *Fusarium oxysporum* (Cuadro 1) en medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA). Estas cepas se encontraban conservadas en aceite mineral y se sembraron en el medio de cultivo mediante la extracción aséptica de las estructuras infectivas (microconidias, macroconidias y clamidosporas).

Las estructuras del patógeno fueron transferidas para inocular en cajas de Petri que contenían PDA, seguidamente cada caja fue rotulada, registrada y sellada con papel parafilm en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente incubado a 28°C por dos semanas (Poleko Series: SN5SE111205, Polonia), para el crecimiento y esporulación de las colonias de *F. oxysporum*.

La colonia pura de *Trichoderma viride*. fue cultivada en medio PDA. Este aislado fue caracterizada morfo-cultural por (Villa 2015). Al igual que para *F. oxysporum*, este aislado se encontraba conservada en aceite mineral. Se hicieron réplicas de este aislado y se cultivaron en cajas de Petri que contenían medio PDA. Cada caja de Petri fue rotulada, registrada y sellada con papel Parafilm en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente incubado a 28°C por una semana (Poleko Series: SN5SE111205, Polonia), para el crecimiento y esporulación de las colonias.

Los aislados bacterianos se sembraron en cajas Petri con medio de cultivo King B, por el método de agotamiento por estrías. Luego de tener los cultivos puros se procedió a la realización de la siembra de cada uno de los aislados independientemente.

Se procedió para la obtención de cultivos puros, se realizó la siembra de los aislados bacterianos para las pruebas de antagonismo. Seguidamente en la misma caja se

depositó en el centro discos de sacabocados de los aislados fúngicos pertenecientes a *F. oxysporum*. Posteriormente las cajas se incubaron a 28°C y se observó cada 24h para cuantificar el antagonismo de las cepas bacterianas frente a *Fusarium oxysporum*. Las pruebas de antagonismo fúngico y bacteriano consistieron en la siembra de los hongos patógeno (*F. oxysporum*) y antagonista (*T. viride*) en cajas Petri con medio de cultivo PDA. En estas cajas se sembró previamente las bacterias aisladas y se depositaron en un extremo discos de micelio de 4 mm de diámetro de las especies de *Fusarium oxysporum*, con crecimiento activo, y al otro extremo se colocaron discos de 4 mm de diámetro de *T. viride* en crecimiento activo. Una vez colocados ambos hongos en las cajas se incubaron a 28°C y se observaron cada 24 h para cuantificar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el patógeno y el diámetro de la zona de intersección.

Diseño experimental

Estos ensayos se realizaron teniendo en cuenta un diseño experimental completamente al azar con 10 réplicas por cada tratamiento (Figura 2 y 3). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y prueba de significación en el paquete estadístico SPSS v.22. Las unidades experimentales fueron 70 cajas Petri agrupadas en los siguientes tratamientos:

T1: *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Enterobacter amnigenus*

T2: *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Lelliottia amnigena*

T3: *Fusarium oxysporum* + *Trichoderma* + *Kluyvera intermedia*

T4: *Fusarium oxysporum* + *Enterobacter amnigenus*

T5: *Fusarium oxysporum* + *Lelliottia amnigena*

T6: *Fusarium oxysporum* + *Kluyvera intermedia*

T7: *F. oxysporum*.



TRATAMIENTOS 	REPETICIONES 									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3
	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4
	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5
	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1
	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2

Figura 2. Distribución espacial de los tratamientos de *Fusarium oxisporum* (QUI2).



TRATAMIENTOS 	REPETICIONES 									
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3
	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4
	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5
	T4	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6
	T5	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	T6	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1
	T7	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T1	T2

Figura 3. Distribución espacial de los tratamientos de *Fusarium oxisporum* (AML2).

3.3.2. Metodología del segundo objetivo. “Establecer la cinética del desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante la aplicación de varios microorganismos rizosféricos bajo invernadero”

Obtención, desinfección y siembra de plantas de Babaco.

Las 55 plántulas de Babaco que se utilizaron en el ensayo en condiciones de invernadero se obtuvieron del cantón Saraguro. Se logró que todas las plantas tuvieran la misma edad promedio (60 días) y que presentaran claros síntomas de vigor y sanidad.

El sustrato para la siembra estuvo compuesto por turba-arena-tierra, en una proporción 2:1:1. El mismo se desinfectó en vapor húmedo a $\pm 200^{\circ}\text{C}$ por dos horas. Luego de la desinfección se llenaron fundas de polietileno de 5 kg y se sembraron las

plántulas. Posteriormente estas se sometieron a un periodo de cuarentena durante 60 días para descartar aquellas con síntomas cloróticos causados por hongos o virus.

Las actividades realizadas durante el periodo de cuarentena fueron las siguientes:

Cuadro 3. Actividades desarrolladas durante la cuarentena.

Tiempo	Objetivo	Producto	Dosis
10 días	Insectos (mosca blanca)	Imidacloprid 25 %	1,5-2 kg ha ⁻¹
		Carbendazin 50 %	1,5-2 kg ha ⁻¹
15 días	Enfermedades	Metomil 90 %	1,5-2 kg ha ⁻¹
30 días	Fertilización	Abonagro	1 Kg 200 L agua ⁻¹
7 días	Riego 2 veces/semana	Agua	0,5 l planta ⁻¹
7 días	Control plántulas	Ninguno	-----

Preparación del inoculo e inoculación de las plantas de Babaco por el método de inmersión de raíces.

Se realizó un pre-inóculo en 10 ml de medio de cultivo Caldo-Papa-Dextrosa (CPD) en tubo de ensayo de 20 ml, en donde se sembró el aislado de *F. oxisporum* (QUI2).(Cuadro 1), y la cepa de *T. viride* (ECM6), luego se las incubaron por 5 días a $\pm 30^{\circ}\text{C}$ y a 300 rpm en una incubadora orbital (*Poleko* Series: SN5SE111205). Después de observado un buen crecimiento de cada una de las cepas, se transfirió todo el contenido del tubo de ensayo a un Erlenmeyer de 500 ml con medio de cultivo CPD. Trascorrido 10 días de incubación, de cada cultivo fúngico se filtraron 2 ml en tubos *ependoff* con el objetivo de realizar el conteo de la cantidad de conidios de cada uno de las muestras en la cámara de Neubauer. Para ello se utilizó la siguiente fórmula (Booth, 1971).

$$CC = \sum n (5 \times 10\ 000)$$

CC = Concentración en la cámara

$\sum n$ = Sumatoria de células en los cinco cuadrantes

(5 X 10 000) = Constante

Se ajustaron todas las concentraciones en una proporción de 1×10^6 por ml^{-1} UFC (Unidades Formadoras de Colonias), aplicando la siguiente fórmula citada por (Booth, 1971).

$$V_{\text{inicial}} \times C_{\text{inicial}} = V_{\text{final}} \times C_{\text{final}}$$

V_{inicial} = Volumen inicial del inóculo que deseamos preparar

C_{inicial} = Concentración inicial del inóculo

V_{final} = Volumen final del inóculo que deseamos preparar

C_{final} = Concentración final deseada del inóculo (1×10^6)

En el ensayo de campo, se utilizó los aislados más eficientes como resultado de las pruebas realizadas en laboratorio. Para la inoculación se sacaron todas las plántulas del sustrato y se sacudieron en agua común para evitar daños mecánicos al sistema radicular. Posteriormente se efectuaron pequeños cortes con la ayuda de tijeras a las raíces para crear la vía de ingreso del agente causal de la marchitez vascular. Seguidamente las plántulas se sumergieron por 5 minutos en la solución fúngica de 400 ml (según el tratamiento), ajustada a una concentración de 1×10^6 UFC. Este paso se realizó para los 4 tratamientos. Para el tratamiento control (T0), las plantas fueron sumergidas durante el mismo tiempo en agua destilada estéril. Subsiguientemente, se sembraron las plántulas inoculadas en el mismo sustrato y funda del cual se extrajeron (Gómez y Macas, 2014). Finalmente, todas las fundas se regaron con 400 ml de agua estéril.

De la misma forma, se procedió para la inoculación del aislado de *T. viride*. con un aislado bacteriano (*E. amnigenus*), de acuerdo con la metodología descripta. Los tratamientos que se aplicaron fueron los siguientes **T1:** Agua estéril, **T2:** *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *E. amnigenus*, **T3:** *F. oxysporum* + *Trichoderma*, **T4:** *F. oxysporum* + *E. amnigenus* y **T5:** *F. oxysporum*.

Evaluación de la severidad o progreso de la enfermedad.

La evaluación se realizó mediante la observación directa a cada uno de las unidades experimentales desde el segundo día después de la inoculación (ddi) hasta los 40 ddi. Se evaluaron los tratamientos y las repeticiones según la escala de evaluación de la severidad extrema (Cuadro 4). (Cueva 2007).

Cuadro 4. Escala de evaluación (severidad externa) de la Marchitez Vascular del Babaco.

Nivel	Síntomas
0	Planta sana
1	Clorosis inicial de las primeras hojas bajas.
2	Clorosis intensa de aproximadamente el 50 % del follaje. Defoliación moderada.
3	Clorosis total del follaje. Defoliación severa. Bandas oliváceas longitudinales y deprimidas en el tallo.
4	Plantas completamente defoliadas. Necrosis descendente desde el ápice del tallo (muerte de la planta).

La severidad fue calculada con la siguiente fórmula:

$$S(\%) = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} \times 100$$

Dónde: S (%) = Incidencia, a = total de plantas en cada grado de la escala; b = grado de la escala correspondiente; N = número de plantas total evaluadas K= grado máximo de la escala (K=5).

IV. RESULTADOS

4.1. Capacidad antagonista de microorganismos rizosféricos sobre los diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* en condiciones de laboratorio.

La Figura 4, muestra los resultados obtenidos en cada uno de los días analizados, observándose una tendencia de crecimiento homogéneo en aquellos tratamientos donde se sembraron las bacterias y el hongo con potencial controlador; mientras que en el tratamiento con *F. oxysporum* en solitario se observa que su crecimiento sobresale desde el primer día de evaluación, finalizando con 19.5 mm más de crecimiento que el tratamiento *F. oxysporum* + *K. intermedia* (T6) y 19.9 mm con la inoculación de *F. oxysporum* + *L. amnigena*. (T5).

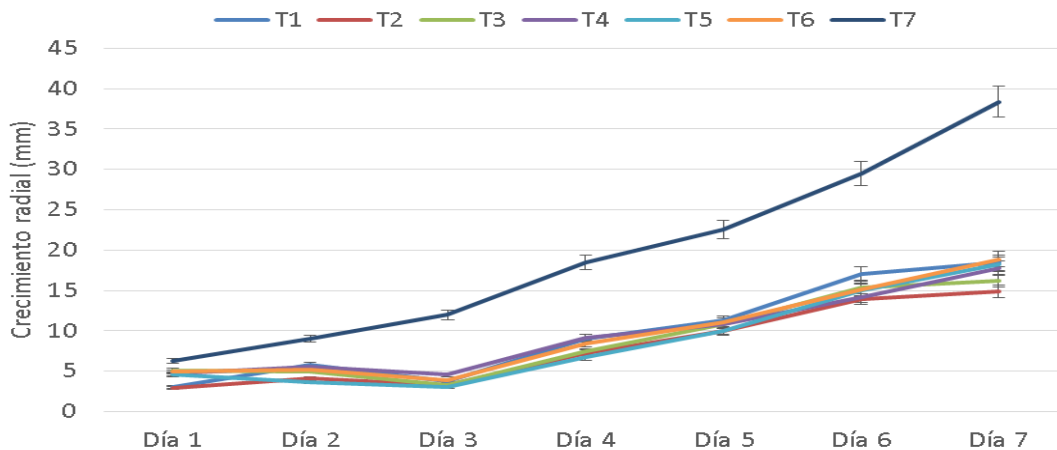


Figura 4. Crecimiento radial *F. oxysporum* (QUI2) frente a la inoculación cepas bacterianas y *Trichoderma* utilizadas en el ensayo.

Leyenda: **T1:** *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Enterobacter amnigenus*, **T2:** *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Lelliottia amnigena* **T3:** *Fusarium oxysporum* + *Trichoderma* + *Kluyvera intermedia*, **T4:** *Fusarium oxysporum* + *Enterobacter amnigenus*, **T5:** *Fusarium oxysporum* + *Lelliottia amnigena*, **T6:** *Fusarium oxysporum* + *Kluyvera intermedia*, **T7:** *F. oxysporum*.

Según los resultados obtenidos del crecimiento radial, se realizó el cálculo del antagonismo de los microorganismos inoculados. Para ello se tomó el crecimiento de *Fusarium oxysporum* como patrón de comparación en la fórmula. En la figura 5 se representa el efecto de los diferentes microorganismos utilizados como biocontroladores

potenciales, donde se observa la correlación positiva con el incremento del crecimiento radial. Los tratamientos con mayor potencial antagonístico son aquellos de co-inoculación hongo-bacteria, destacándose *Trichoderma* + *E. amnigenus* y *Trichoderma* + *L. amnigena*, como los tratamientos de mayor reducción del crecimiento de *F. oxysporum* en los estadios tempranos.

Hasta los 4 días después de la inoculación se detecta el efecto beneficioso de las combinaciones (hongo-bacterias) sobre la reducción del crecimiento de *Fusarium*, observándose las diferencias estadísticas ($p < 0,05$, Tukey HSD) respecto a los tratamientos de inoculación simple de las rizobacterias y sin la presencia de *Trichoderma*.

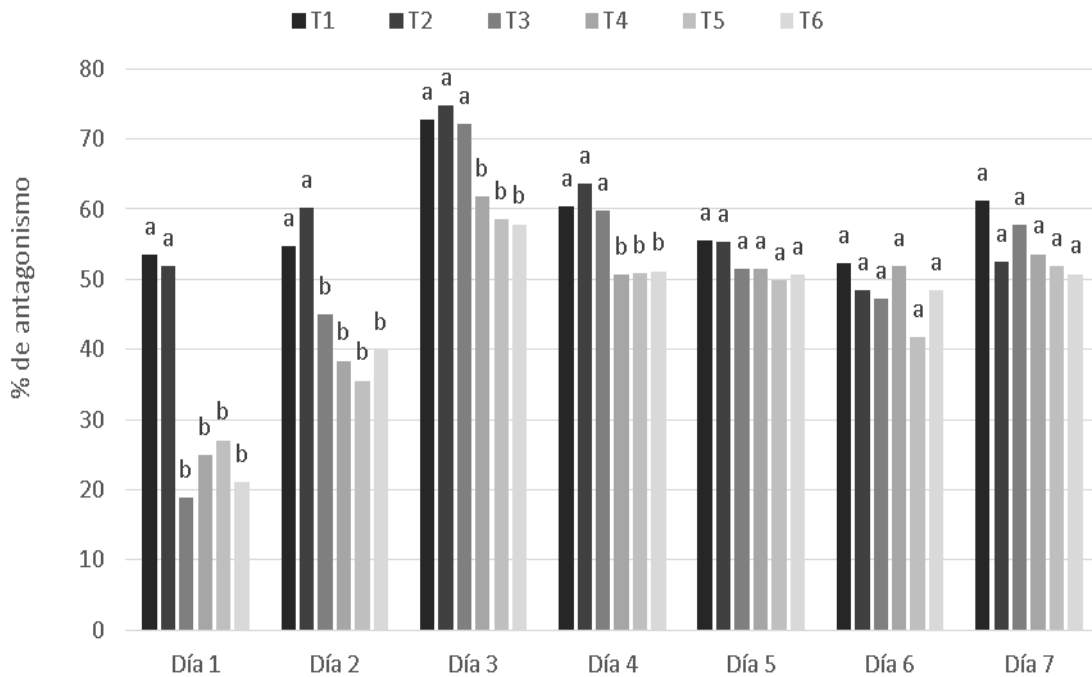


Figura 5. Antagonismo de aislados bacterianos y *Trichoderma* contra *F. oxysporum* (QUI2).

Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. Leyenda: T1: *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *E. amnigenus*, **T2:** *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *L. amnigena* **T3:** *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *K. intermedia*, **T4:** *F. oxysporum* + *E. amnigenus*, **T5:** *F. oxysporum* + *L. amnigena*, **T6:** *F. oxysporum* + *K. intermedia*. *oxysporum* + *Enterobacter amnigenus*, **T5:** *Fusarium oxysporum* + *Lelliottia amnigena*, **T6:** *Fusarium oxysporum* + *Kluyvera intermedia*, **T7:** *F. oxysporum*.

Teniendo en cuenta la cinética del antagonismo en estas condiciones controladas, se puede apreciar que la estimulación del biocontrol por parte de la co-inoculación de los microorganismos se lleva especialmente en los primeros 4 días después de la siembra. A partir de esta fecha no existen diferencias significativas en ninguno de los tratamientos evaluados. Estos resultados sugieren que el efecto de la inoculación de *Trichoderma* se ejerce en los primeros estadios del crecimiento y que este hongo actúa sinérgicamente con las bacterias *E. amnigenus* y *L. amnigena*, no siendo tan marcado el efecto con *K. intermedia*. Es de notar que a partir de los 5 días no existen diferencias significativas entre los tratamientos, aspecto este que se debe al incremento del efecto de la inoculación de las bacterias en solitario, demostrando que el porcentaje de antagonismo crece regularmente en el tiempo para estos tratamientos.

Se realizó el segundo ensayo en laboratorio donde se evaluó el segundo aislado de *Fusarium oxysporum* (AML2). En la Figura 6, muestra los resultados obtenidos en cada uno de los días analizados, observándose una tendencia de crecimiento homogéneo en los tratamientos donde se sembraron cada una de las bacterias con *F. oxysporum* (T4, T5, T6) no hay diferencia significativa entre estos tratamientos, y los tratamientos donde se sembraron el hongo con potencial controlador frente al hongo causante de la enfermedad y cada una de las bacterias (T1,T2,T3), en cambio el tratamiento con *F. oxysporum* podemos observar el crecimiento donde sobresale desde el primer día de evaluación, finalizando en el día cinco de evaluación con 17,59 mm más de crecimiento que el tratamiento con *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *E. amnigenus* (T1), lo que hace notar un biocontrol de los antagonistas frente al patógeno y 2,99 mm el tratamiento *Fusarium oxysporum* + *K. intermedia* (T6) en este no hay mucha diferencia debido a que la bacteria en solitario no es un biocontrolador eficiente, encontrándose los otros tratamientos intermedios a estos.

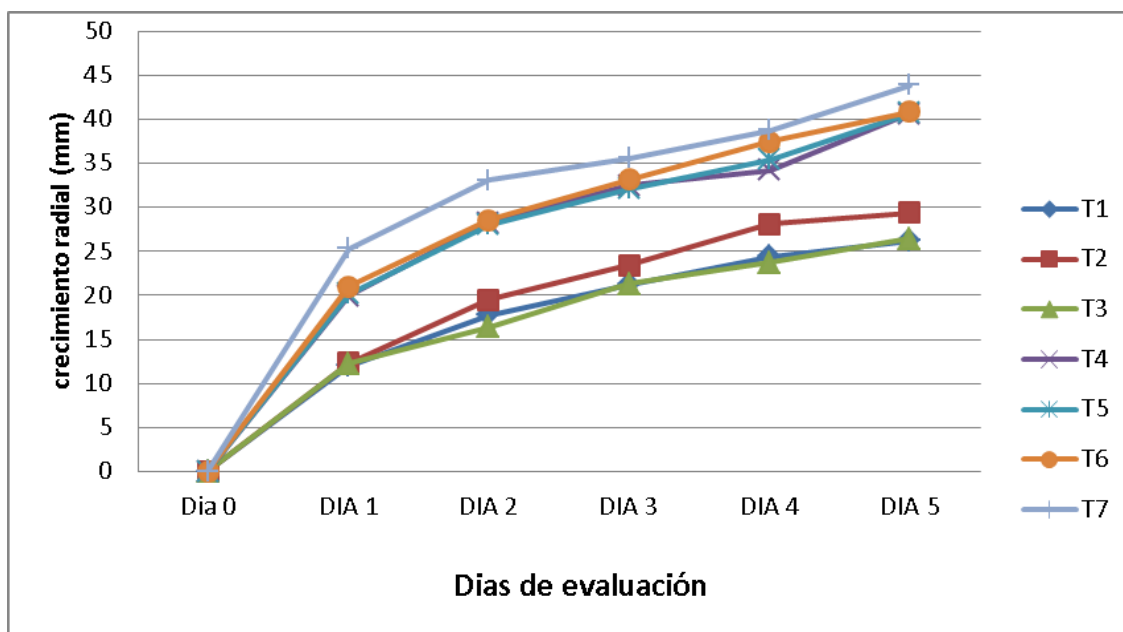


Figura 6. Crecimiento radial *F. oxysporum* (AML2) frente a la inoculación cepas bacterianas y *Trichoderma* utilizadas en el ensayo.

Leyenda: **T1:** *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Enterobacter amnigenus*, **T2:** *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Lelliottia amnigena* **T3:** *Fusarium oxysporum* + *Trichoderma* + *Kluyvera intermedia*, **T4:** *Fusarium Oxysporum* + *Enterobacter amnigenus*, **T5:** *Fusarium oxismporum* + *Lelliottia amnigena*, **T6:** *Fusarium oxismporum* + *Kluyvera intermedia*, **T7:** *F. oxysporum*.

Obtenidos los datos del crecimiento radial, se aplicó el cálculo de antagonismo de los microorganismos inoculados, para esto se tomó el crecimiento de *F. oxysporum* como modelo de comparación en la fórmula. La Figura 7, se puede observar el efecto de los antagonistas utilizados como biocontroladores, donde representa que los tratamientos de con *E. amnigenus*, *L. amnigena* y *K. intermedia*, (*T4*, *T5*, *T6*), no ejercieron ningún biocontrol sobre el fitopatógeno de *F. oxysporum* sp. En cambio los tres tratamientos con *Trichoderma viride*, más cada una de las bacterias: *E. amnigenus*, *L. amnigena* y *K. intermedia* (*T1*, *T2*, *T3*), ejercen dicho biocontrol.

Como se puede observar, el tratamiento con *Fusarium oxysporum*. + *Trichoderma*. + *L. amnigena*, en el día cuatro de evaluación, tiene un porcentaje de 26,84% de acuerdo a los resultados lo que hace suponer que las bacterias encontradas en la raíces del Babaco no pueden ser utilizadas como biocontroladores de *F. oxysporum*, exceptuando el tratamiento con *E. amnigenus* que se podría realizar un estudio más profundo para validar los resultados obtenidos en esta investigación.

El buen desempeño de *Trichoderma* en los tratamientos es un indicador de la alta actividad de los mecanismos de biocontrol disponibles por parte de esta cepa. En la prueba in vitro se obtuvo evidencia de los procesos de competencia por nutrientes y la desnutrición del patógeno (*F. oxysporum*). Llegando en el primer día de evaluación a un 53% de antagonismo el T1 y finalizando el día quinto con un 40%.

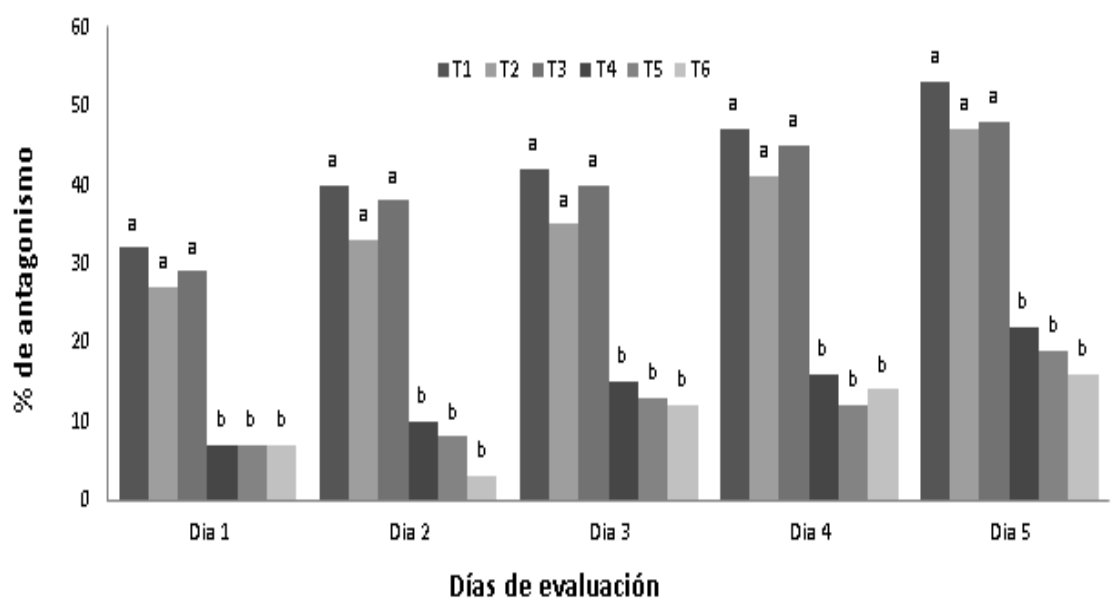


Figura 7. Antagonismo de aislados bacterianos y *Trichoderma* contra *F. oxysporum*. (AML2).

Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD. **Leyenda:** T1: *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Enterobacter amnigenus*, T2: *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *Lelliottia amnigena* T3: *Fusarium oxysporum* + *Trichoderma* + *Kluyvera intermedia*, T4: *Fusarium Oxysporum* + *Enterobacter amnigenus*, T5: *Fusarium oxysporum* + *Lelliottia amnigena*, T6: *Fusarium oxysporum* + *Kluyvera intermedia*, T7: *F. oxysporum*.

No hay diferencias significativas entre los tratamientos que contienen los antagonistas como son las bacterias y *Trichoderma* (T1, T2, T3), pero estos tres tratamientos difieren significativamente de los tratamientos que solo tienen las bacterias y *F. oxysporum* (T4, T5, T6), notándose claramente que dichos antagonistas reducen considerablemente el crecimiento del patógeno estando en asocio mientras que la bacteria en solitario no ejerce biocontrol alguno.

4.2. Cinética del desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante la aplicación de varios microorganismos rizosféricos bajo invernadero.

Para la validación de los resultados obtenidos en condiciones de laboratorio, se realizó un ensayo en condiciones de invernadero. Este experimento se llevó a cabo con el objetivo de evaluar los mejores tratamientos que se obtuvieron previamente en presencia de la planta hospedera.

La Figura 8. muestra el porcentaje de severidad de cada uno de los tratamientos, de acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de severidad bajo condiciones de invernadero se observa que el tratamiento inoculado con agua el porcentaje de severidad es bajo ya que las plantas durante el periodo de evaluación no presentaron ningún síntoma todas las plantas estuvieron sanas y vigorosas, el mejor valor de reducción de la enfermedad se obtienen con el T2 que es la inoculación con *F. oxysporum* + *T. viride* + *E. amnigenus* con un valor del 28% y una severidad de la enfermedad del 30%. Este valor obtenido muestra una compatibilidad entre los dos microorganismos utilizados en el biocontrol tanto el hongo como la bacteria frente al hongo causante de la marchitez vascular de babaco como es *F. oxysporum*.

En la inoculación con *F. oxysporum* + *Trichoderma* (T3), se obtiene un valor de reducción de la enfermedad del 23% y una severidad del 35% en el día 40 de evaluación. Además, en este tratamiento se puede observar el clásico biocontrol ejercido por *T. vidrie* frente a *F. oxysporum*.

El tratamiento donde se obtiene el menor valor en la reducción de Fusarium es el T4 que es con la inoculación con *F. oxysporum* + *E. amnigenus* con un valor del 2% y una severidad de 56% estos resultados, afirman que la bacteria utilizada no ejerció ningún biocontrol frente a *F. oxysporum*, la cual existiría una contradicción con lo descrito en el T2; la única explicación sería que para obtener un mejor biocontrol la bacteria debe

estar asociada con otro microorganismo antagonista en este caso asociado con *T. viride*

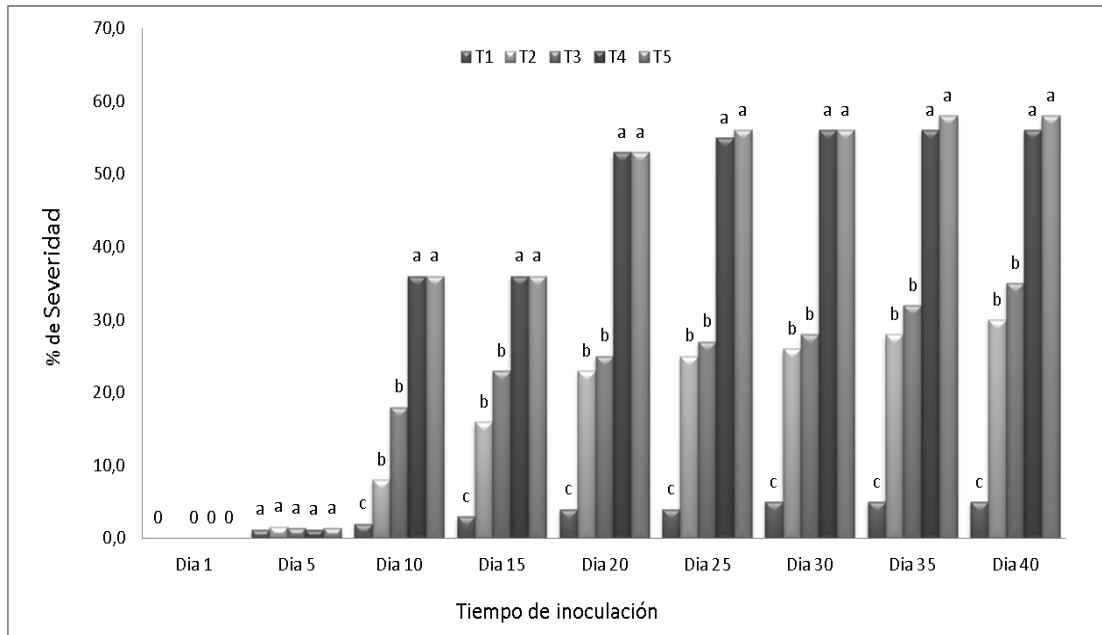


Figura 8. Progresión de la enfermedad de Marchitez Vascular del Babaco en condiciones de invernadero según los tratamientos evaluados.

Letras desiguales en las columnas difieren para $p < 0.05$ por Tukey HSD.

T1: Aplicación de agua estéril, T2: inoculación con *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *E. amnigenus*, T3: inoculación con *F. oxysporum* + *Trichoderma*, T4: inoculación con *F. oxysporum* + *E. amnigenus*, T5: inoculación con *F. oxysporum* (control).

V. DISCUSIÓN.

5.1. Capacidad antagonica de microorganismos rizoféricos sobre diferentes aislados de *Fusarium oxysporum* en condiciones de laboratorio.

Son muchos los estudios realizados en uso de aislados de *Trichoderma* para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* causantes de la MVB bajo condiciones de laboratorio, entre los cuales podemos mencionar a los estudios realizados por Cueva (2007), en la utilización de microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* spp. (*T. koningii* y *T. album*), para el control de *F. oxysporum* f. sp. *caricae*, en plantas de Babaco lo cual demostró satisfactorios resultados en la reducción de la MVB sobre condiciones de laboratorio, alcanzando la escala 4 de capacidad antagonica. De igual forma, Villa (2015), en la evaluación del antagonismo *in vitro* de *Trichoderma* frente a cuatro aislados de *Fusarium oxysporum* causantes de la MVB, redujo significativamente el efecto antagonico de una cepa de *Fusarium* en un 20,12%. lo que concuerda con los resultados de esta investigación donde la cepa de *Trichoderma viride* reduce el crecimiento de *F. oxysporum*.

No obstante, hay diversos estudios sobre la utilización de aislados de *Trichoderma* spp., en biocontrol de *Fusarium* en diversos cultivos de importancia económica bajo condiciones de laboratorio; entre los cuales podemos citar a Martínez (2012) donde la evaluación del PICR (porcentaje de inhibición del crecimiento radial) de 50%, la cual corresponde al grado 2 de la escala de capacidad antagonica frente a la cepa de *Fusarium solani*.

Las especies de bacterias (*E. amnigenus*, *L. amnigena* y *K. intermedia*), son bacterias gran negativas y comúnmente son patógenas de seres humanos y animales (Brooks *et al.*, 2010). No obstante, muchas especies de bacterias del género *Enterobacter* spp., se han encontrado promotoras de crecimiento en trigo, albaricoque, maíz y también como patógena en eucalipto y cebolla. No existen reportes, sobre el uso de *E. amnigenus*, *L. amnigena* y *K. intermedia*. como controladoras de enfermedades en cultivos, ni en asocio con *Trichoderma*. Sin embargo, el uso de estas rizobacterias puede considerarse como PGPR (Plant growth Promoting Rhizobacteria, por sus siglas en inglés). Ogbo y Okonkwo (2012), menciona que las bacterias PGPR que colonizan la rizósfera de las

plantas son capaces de producir hormonas vegetales como auxinas y giberelinas, citoquininas, etileno, etc. Los principales productores de estos compuestos son del grupo de las *Enterobacter* que son capaces de promover el desarrollo de las plantas debido a su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos hongos patógenos. Es por este motivo que en esta investigación las bacterias del genero no realiza un biocontrol a la enfermedad.

Tanto *T. viride* como bacterias crecen rápidamente en medios solidos, formando endosporas y producen metabolitos secundarios que reducen la posibilidad de desarrollar resistencia por parte del patógeno. También presentan la ventaja de que se degradan de forma paulatina. El grado de ataque de estos antagonistas depende de factores como el ambiente, el estado del tejido vegetal y, en el caso de los hongos, de la cantidad y calidad del inóculo (Aceves, 2001). Lo cual coincide con este trabajo que se realizó las pruebas in vitro en medio PDA.

Con los resultados obtenidos de este trabajo, donde parece que cada una de las bacterias utilizadas en este estudio (*E. amnigenus*, *L. amnigena* y *K. intermedia*) inducen mecanismos diferentes, mismos que pueden ser directamente relacionados con la nutrición, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfato y otros nutrientes, donde pueden incidir factores tales como la edad de la planta, tipo de sustrato, humedad del sustrato, temperatura, atmósfera del sustrato, fertilidad, luz, efectos foliares y la actividad microbiana. Parece ser que no pueden ser utilizadas como biocontroladoras de enfermedades en plantas (Jaizme-Vega, et al., 2003; Rivera-Cruz, et al., 2008).

5.2. Cinética del desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), mediante la aplicación de varios microorganismos rizosféricos bajo invernadero

Gomes y Macas (2014), señalan que el método de inmersión de raíces, se observa los signos de la enfermedad en menor tiempo debido que en la inoculación hay contacto directo de *Fusarium* con el sistema radicular de la planta, es por este motivo que en esta investigación se utilizó este método ya que los patógenos se desarrollan muy bien en tejidos lacerados o destruidos antes de llegar a los tejidos sanos lo que coincide con lo dicho por Agrios (2005).

Los tratamientos inoculados con el patógeno coincidió con los signos y síntomas de Marchitez Vascular en plantas de Babaco según las descripciones realizadas por Agrios (2005), quien señala que todos los marchitamientos vasculares presentan características en común; la planta infectada pierde turgencia, se debilitan, adquiere una tonalidad que va del verde claro al amarillo verdoso, decaen y finalmente se marchita y muere.

En los resultados de esta investigación en condiciones de invernadero, la cepa utilizada de *Trichoderma viride* resultó positiva por lo cual inhibió el crecimiento del hongo patógeno causante de la Marchitez Vascular de Babaco lo que coincide con lo observado por Martínez, (2012), quien menciona que especies de *Trichoderma* producen sustancias antifúngicas que actúan inhibiendo el crecimiento de algunos microorganismos.

Las varias especies de *Trichoderma* han sido considerados buenos agentes de control biológico contra un amplio rango de hongos fitopatógenos en invernadero y en campo. Sin embargo la poca eficacia del biocontrol con *Trichoderma* en asocio con *E.amnigenus*, puede estar limitada por la fungistasis del suelo dicho por Pérez, (2004), o por la competencia por otros microorganismos del suelo. De acuerdo a los resultados se observa un porcentaje de biocontrol en la plántula del Babaco en condiciones de invernadero.

El control biológico utilizando microorganismos, así como cepas fúngicas del genero *Trichoderma* para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, constituye hoy en día una alternativa que podría sustituir el control químico sintético, que además de su elevado costo, trae como consecuencia el desarrollo de resistencia por parte del fitopatógeno, y problemas de contaminación y toxicidad (Rey et al., 2000; Rodríguez, 2002). Lo que concuerda con los resultados obtenidos en esta investigación donde la cepa de *Trichoderma* inhibe el crecimiento del agente causal de la marchitez vascular del babaco.

El tratamiento donde se inoculó *Trichoderma virede* frente a *Fusarium oxysporum* produce un biocontrol eficiente lo cual concuerda con los estudios relizados por Medina confirma que todos los tratamientos evaluados de *Trichoderma* frente a *Fusarium* fueron capaces de producir un alto grado de severidad de la enfermedad en el cultivo del

Babaco lo mismo Renteria (2015) afirma que la cepa de *Trichoderma spp.*, mostró gran capacidad antagónica frente a las dos cepas de *Fusarium sp.*, reduciendo su severidad en un rango comprendido de 3,6 a 10,7% en el último periodo de evaluación.

VI. CONCLUSIONES.

Los microorganismos, *Trichoderma viride* y *E. amnigenus*, en interacción frente a *F. oxysporum* obtuvieron un mayor porcentaje de control en condiciones controladas.

Las bacterias *Enterobacter amnigenus*, *Lelliottia amnigena*, *Kluyvera intermedia*, utilizadas en cultivos duales frente a *F. oxysporum*, no demostraron efectividad como biocontroladoras en condiciones in-vitro.

En condiciones de invernadero el tratamiento *Trichoderma* y *E. amnigenus* frente a *F. oxysporum* demostró el mayor porcentaje de biocontrol.

VII. RECOMENDACIONES.

Realizar ensayos a campo abierto con los mejores resultados obtenidos en la presente investigación.

Se debe realizar estudios histológicos y moleculares sobre la compatibilidad de los aislados *Trichoderma- E. amnigenus* en plántulas de Babaco.

Se recomienda evaluar la producción del Babaco con los mejores resultados obtenidos.

VIII. BIBLIOGRAFIA.

1. Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Published Elsevier. 5 ed. United States of America. 948
2. 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.
3. Alabouvette, C., Olivian, C., Migheli, Q., Steinberg, C. 2009. Microbiological Control of Soil-Borne Phytopathogenic Fungi with Special Emphasis on Wilt-Inducing *Fusarium oxysporum*. New Phytol. pp: 1-16.
4. Armijos, W., Salinas D. 2014. 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.
5. Aceves A. C. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp *Euascomycetes: Hypocreales*), su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (*Hyphomycetes: Hyphales*). Tesis presentada en opción al Título Académico de Doctor en Ciencias: Área Biotecnología. Universidad de Colima, México. 152 pp.
6. Avendaño, C., Arbeláez, G. y Rondón, G. 2006. Control biológico del marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* en fríjol *Phaseolus vulgaris* L., mediante la acción combinada de *Entrophospora* colombiana, *Trichoderma* sp. y *Pseudomonas fluorescens*. *Agronomía Colombiana*, 24 (1): 62-67.
7. Bertona, E. 2005. Caracterización fenotípica y genotípica de la resistencia enzimática a las cefalosporas de tercera generación en *Enterobacter* spp. *Revista Argentina de Microbiología*. Argentina. 37: 203-208 p. Booth, C. The genus *Fusarium*. Kew. Commonwealth Mycological Institute. 1971.
8. Brady, S.N. Venter, I. Cleenwerck, K. Engelbeen, P. 2009. Aislamiento de *Enterobacter cowanii* en eucalipto y cebolla.

9. Bravo, C. 2012. Manejo Integrado de la Marchitez Vascular o Fusariosis (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de Babaco. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias- INIAP. Estación Experimental de Austro. Cuenca –Ecuador.
10. Bourguignon, E. 2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. PhD. Tesis. Lincoln University, Canterbury, New Zealand.pp.235.
11. Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonw. Mycol. Inst., Kew, Surrey, England. 237p.
12. Brooks G, Butel J, Morse S, 2010. Microbiología medica de Jawetz Melnick y Adelberg. 19 Edición. Vol: 1. Editorial: Manual Moderno, Mexico.
13. Castellanos, G., Jara, C. y Mosquera, G. (2011): Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Cali, Colombia. Editorial: Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 242 p.
14. CINFA. 2014. Centro Integrado de Geomática Ambiental. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.
15. Cook RJ, Baker KF. 1995. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, EEUU. 539 pp.
16. CORPORACIÓN DE PROMOCIÓN DE EXPORTACIONES E INVERSIONES. CORPEI. 2006. El cultivo del babaco. Exprotaciones y mercados.
17. 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.
18. Días de Castro, F. J.; Restrepo, M.A.; Rojas, W. 2007. Microbiología de las infecciones humanas. Primera Edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín. Colombia.
19. Druzhinina, I. 2011. *Trichoderma*: La genómica de éxito oportunista. Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Cinvestav Campus Guanajuato, 36821, Irapuato, Guanajuato, Mexico. §Department of Biology,

- Technion - Israel Institute of Technology, Haifa 32000, Israel. ||Department of Plant Pathology and Microbiology, Texas A&M University, College Station, Texas 77843, USA.
20. Eilenberg, J., Hajek, A. and Lomer, C. 2001. Suggestions for unifying the terminology in biological control. *Biocontrol*, 46: 387-400.
 21. Ezziyyani M, Perez C., Candela M. 2006. “Trichoderma harzianum como biofungicida para el biocontrol de Phytophthora capsici en plantas de pimiento (Capsicum annuum L.). Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de Murcia, España.
 22. Falconí, C. Landázuri, P. Yáñez, V. Giacometti, J. Oleas, A. Soria, N. Taco, M. Cueva, D. y Chávez, A. 2006. Alternativas biotecnológicas para la producción de plantas libres de la marchitez vascular del babaco *Vasconcellea heilborni*. Producción Científica ESPE. Quito, Ecuador. 20-21p.
 23. Falcón. C. y Brito. M. (2006) “Servicio de Información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y Ganadería del Ecuador”. Proyecto SICA. Banco Mundial. [electronicversion]. Extraído el 2 de Julio de 2009. [www.articulosbabaco\Babaco SICA ecuador.mht](http://www.articulosbabaco/Babaco SICA ecuador.mht).
 24. Fravel, D., Olivain, C., Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and Its Biocontrol. *New Phytologist*. 157: 493-502.
 25. Galarza, V. 2002. Reacción de diferentes especies de Caricaceas a *Fusarium oxysporum* y su Afinidad como Patrón de Babaco, Tesis para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Central.
 26. García, P. 2011. Evaluación de la tolerancia de cinco accesiones de vasconcellas a *fusarium sp.* como posible portainjertos para babaco (*Vasconcelleae x heilborni*) bajo cubierta plástica en la estación experimental del austro de INIAP”
 27. Gómez R. y Macas F. 2014. Estudios de las interacciones patógeno – patógeno que se establecen durante el desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco.
 28. Haas, D., y Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 307–319.

29. Harman G. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of Trichoderma spp. *Phytopathology*. ;96(2):190- 194.
30. Holdridge L, 1971. El Sistema de Zonas de Vida.
31. 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.
32. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). (2006). Manual de Buenas Prácticas de Distribución y Manejo Insumos Agropecuarios. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. pp 12- 17.
33. Infante., Martínez, B., González, N y Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de Trichoderma Frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* 24 (1), 80p.
34. Iskander R. 2002. Manejo de sustratos para la producción de plantas ornamentales en maceta. Department of Horticultural Sciences. Texas University. Texas, USA. 9 p.
35. 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.
36. Jaizme-Vega, M., Rodríguez-Romero, A., and Piñero, M. (2003). Potential use of rhizobacteria from the Bacillus genus to stimulate the plant growth of micropropagate banana. *Fruits*. 59(2): 83-90.
37. Kyndt T. 2005: Molecular Genetic Analysis of the Genera Carica L. and Vasconcellea Saint Hilaire (Caricaceae). Tesis de PhD. Universidad de Gante. Gante, Bélgica. 2008 p
38. Kloepper, J. and Ryu, C. 2007. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. p. 33– 52. En: Schulz, B., Boyle, C., Sieber, T.N. (Eds.). *Soil Biology, Microbial Root Endophytes*, Ed. Springer, United States, 2006, 387 p.
39. Leong, G., 2009. scribble mutants promote aPKC and JNK-dependent epithelial neoplasia independently of Crumbs. pag. 62.
40. Liu, L., Kloepper J. W., Tuzun, S. 1995. Inducción of Systemic Resistance in Cucumber Against Fusarium Wilt by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria. *Phytopathology*. 85 (6): 695-698.

41. Martinez, A, 2012. Evaluación y selección de cepas de *Trichoderma* sp. para el control biológico de *Fusarium* sp. en maracuyá (*Passiflora edulis*, variedad. *Flavicarpa*), Ambato-Ecuador.
42. Medina, L. 2015. Estudio de la cinética de la interacción de diferentes especies de *Fusarium spp.*, asociados a la marchitez vascular del babaco *Vasconcellea heilbornii* Var. *Pentágona*. Tesis de Ingeniería Agronómica Universidad Nacional de Loja. Loja- Ecuador. 27 p.
43. Montenegro, F. 2009. Cultivo de babaco bajo invernadero. Cotopaxi–Ecuador. p. 58.
44. Mondino, P., Silvana Vero (2006): Control biológico de patógenos en plantas. Editorial. Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 158 pp.
45. Nakkeeram, S., Fernando, W. G., Siddiqui, Z. A. 2006. Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations and Its Scope in Commercializations for the Management of Pest and Diseases. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui, Z. A. Springer, Netherlands. pp 257-294.
46. Núñez, D. 2008. Optimización del proceso de elaboración de pulpa de Babaco (*Carica pentágona*), 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.
47. Ochoa, J. y Fonseca, G. 2000. First Report of *Fusarium* Wilt of Babaco (*Carica × heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador. *Revista Plant Disease*. 84(2): 190.
48. Ogbo, F, y Okonkwo J. 2012. Algunas características promotoras del crecimiento vegetal de *Enterobacter spp.* Aislado de las raíces del maíz.
49. Ortoneda, R. 2004. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. Volume 70, September 2014, Pages 42–67.
50. Páez, M.E., Albarracín, N. 2007. Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Fav. Agron. (LUZ)*. Supl. 1: 27 – 31.
51. Perez, L. 2004. “*Fusarium* wilt (panamá disease) of babababas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent”. Publication especial XVI Reunión.

52. Pérez Consuegra Nilda 2004. Manejo Ecológico de Plagas. La Habana,Cuba. Editorial Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural. 127 – 284 pp.
53. Raaijmakers, J. M., Paulitz, T. C., Steinberg, C., Alabouvette, C. 2009. The Rhizosphere: A Playground and Battlefield for Soilborne Pathogens and Beneficial Microorganisms. *Plant Soil*, 321: 341-361.
54. Ramírez, M., Roveda, G., Bonilla, R., Cabra, L., Peñaranda, A., López, M., (2008). Uso de Microorganismos con potencial como Biofertilizantes en el Cultivo de Mora, 1ª Ed. Editorial Produmedios, Bogotá, Colombia, 2008, p. 34-35.
55. Renteria, D. 2015. Estudio de la interacción entre fusarium -trichoderma en babaco (*Vasconcellea heilbornii* badillo var. pentagona), mediante estudios histológicos” Tesis de Ingeniería Agronómica Universidad Nacional de Loja. Loja- Ecuador. 28 p.
56. Rey, M.; Delgado-Jarana, J.; Rincón, A. M.; Limón, M.A.; Benítez T. 2000. Mejora de cepas de Trichoderma para su empleo como funguicidas. *Revista Iberoamericana de Micología*, Bilbao, v.17, p.S31-S36.
57. Rivera-Cruz, M., Trujillo, A., Córdova, G., Kohler, J., Caravaca, F., and Roldán, A., (2008). Poultry manure and banana waste are effective biofertilizer carriers for promoting plant growth and soil sustainability in banana crops. *Soil Biology y Biochemistry*. 40: 3092-3095.
58. Rodríguez, 2012. Efecto antagónico y biocontrolador de algunos microorganismos saprófitos contra *Rhizoctonia solani* un fitopatógeno causante del (Damping off) en plantas de tomate. 2002, 105 p. Tesis para optar el grado de Magíster en Microbiología - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima.
59. 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.
60. Suquilanda M. 2007. Sanidad Vegetal parte 2. Curso de Graduación “Producción de Invernaderos”, Cuenca – Ecuador, 2007.
61. 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.
62. Uzcátegui. 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.
 63. Van Loon, L. C., y Bakker, P. A. H. M. (2007). Root-associated bacteria inducing systemic resistance. In S. S. Gnanamanickam (Ed.), Plant-associated bacteria (pp. 269–316). Dordrecht, The Netherlands: Springer.
 64. Veintimilla, J. 2007. Escala de severidad interna y externa in 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). por Cueva, R. 2007. Escuela Politécnica del Ejército-ESPE. Informe técnico del proyecto de investigación presentado como requisito para optar el título de Ingeniería Agropecuaria. Sangolquí- Ecuador.
 65. Villa, V. 2015. Cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de la rizósfera del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) en el sur del Ecuador. Tesis de Ingeniería Agronómica Universidad Nacional de Loja. Loja- Ecuador. 95 p.
 66. Zapata, L., Peña-Chocarro, L., Pérez Jordá, G. y Stika, H.P. 2004. Early Neolithic Agriculture in the Iberian Peninsula. *Journal of World Prehistory* 18 (4): 285-326.

IX. ANEXOS.

Anexo 1. Fotografías del proyecto de tesis de la fase de campo y de laboratorio.



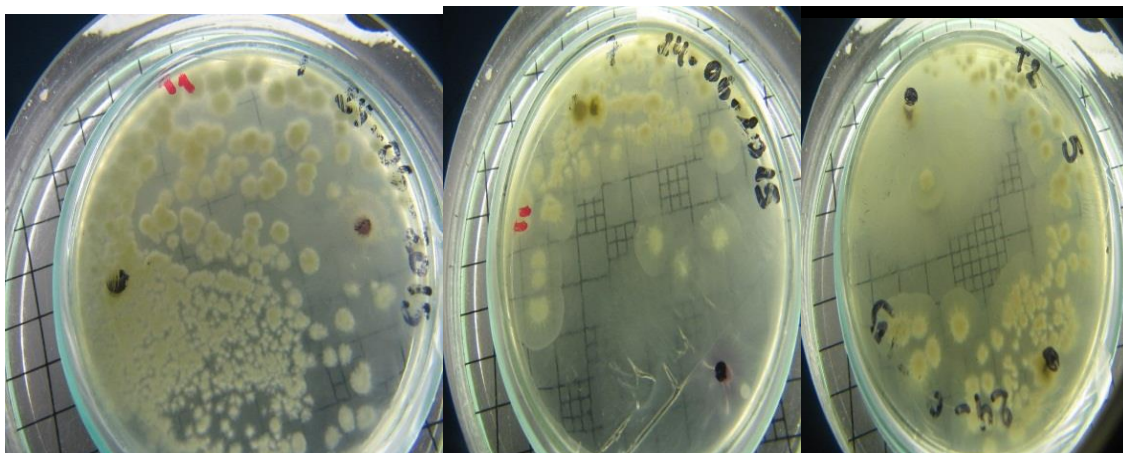
Anexo 1.1. Plantas de Babaco en etapa de cuarentena. Loja septiembre 2015.



Anexo 1.2. Actividades realizadas en la etapa de cuarentena. Loja septiembre 2015.



Anexo 1.3. Siembra de *Fusarium* en laboratorio. Loja septiembre 2015.



Anexo 1.4. Ensayo en laboratorio de *Fusarium* frente a *Trichoderma* y bacteria. Loja septiembre 2015.



Anexo 1.5. Cepas de *Fusarium oxysporum* (AML2), *Trichoderma* (ECM6) para la inoculación de las plantas en invernadero. Loja noviembre 2015.



Anexo 1.6. Inoculación de las plantas por emersión de raíces. Loja noviembre 2015.



Anexo 1.7. . Siembra y arreglo de plantas inoculadas en invernadero. Loja noviembre 2015.



Anexo 1.8. Plantas inoculas a los treinta días. Loja diciembre 2015.



Anexo 1.9. Toma de datos tomando en cuenta la escala de evaluación (severidad externa) de la Marchitez Vascular del Babaco. Loja diciembre 2015.

Anexos 2. Grados de escala de severidad externa de la Marchitez Vascular del Babaco a los 10 días luego de la inoculación.

BIOCONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (<i>Vasconcellea heilbornii</i>. var. pentágona).EMPLEANDO MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.															
Nombre del evaluador: Raquel Espinoza.															
Fecha: Loja, 20 de noviembre de 2015.															
TRATAMIENTOS	REPETICIÓN 1					REPETICIÓN 2					REPETICIÓN 3				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
T1	x					x					x				
T2	x					x					x				
T3	x					x					x				
T4		x					x					x			
T5		x					x					x			
	REPETICIÓN 4					REPETICIÓN 5					REPETICIÓN 6				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
T1	x					x					x				
T2	x					x					x				
T3	x					x					x				
T4		x					x					x			
T5		x					x					x			
	REPETICIÓN 7					REPETICIÓN 8					REPETICIÓN 9				
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
T1	x					x					x				
T2	x					x					x				
T3	x					x					x				
T4		x					x					x			
T5		x					x					x			
	REPETICIÓN 10					REPETICIÓN 11									
	0	1	2	3	4	0	1	2	3	4					
T1	x					x									
T2	x					x									

T3	x					x				
T4		x					x			
T5		x					x			

Anexos 3. Conteo de estructuras conidiales de las cepas de *Fusarium oxysporum* (AML2) y *Trichoderma spp.* (ECM6).

PARTE SUPERIOR					
MUESTRA	AML2				
FECHA	Loja, 09 de noviembre de 2015.				
Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	
18	46	27	18	21	
24	42	19	16	27	
28	37	15	11	23	
44	22	13	21	10	
28	18	27	8	9	
33	36	30	32	16	
31	27	24	17	15	
17	16	9	23	15	
31	13	22	35	28	
34	26	15	26	23	
33	17	25	24	13	
32	22	19	23	12	
21	27	20	14	20	
29	19	28	27	24	
28	23	39	37	18	
27	17	16	38	12	
440	362	321	352	16	
				19	
				13	
				11	
				20	
				14	
				10	
				20	
				17	
				426	

ANEXO 3. Continuación.....

PARTE SUPERIOR				
MUESTRA	ECM6			
FECHA	Loja, 09 de noviembre de 2015.			
Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5
21	21	24	24	20
28	44	22	28	13
28	32	15	28	9
42	29	10	24	17
17	22	13	33	22
29	28	21	18	8
17	25	31	14	16
29	42	22	12	9
28	24	16	28	13
35	29	24	27	10
22	24	15	14	18
22	30	19	28	31
35	28	29	27	18
22	13	21	19	14
25	21	30	18	15
38	27	29	23	11
417	418	317	341	13
				26
				21
				18
				19
				26
				17
				11
				11
				406

Anexo 4. Tríptico entregado en la socialización de resultados.

RESULTADOS

- Evaluar el efecto antagonista de bacterias rizosféricas sobre aislados de *Fusarium*.

Hasta los 4 días después de la inoculación se detecta el efecto benéfico de las combinaciones (hongos-bacterias) sobre la reducción del crecimiento de *Fusarium*, observándose las diferencias estadísticas ($p < 0,05$, Tukey HSD) respecto a los tratamientos de inoculación simple de las rizobacterias y sin la presencia de *Trichoderma*.

Como se puede observar, el tratamiento con *Fusarium oxysporum* + *Trichoderma* + *L. amigonus*, en el día cuatro de evaluación, tiene un porcentaje de 26,84% de acuerdo a los resultados lo que hace suponer que las bacterias encontradas en la raíces del Babaco no pueden ser utilizadas como biocontroladores de *F. oxysporum*, exceptuando el tratamiento con *E. amigonus* que se podría realizar un estudio más profundo para validar los resultados obtenidos en esta investigación. El buen desempeño de *Trichoderma* en los tratamientos es un indicador de la alta actividad de los mecanismos de biocontrol disponibles por parte de esta cepa.

- Determinar la eficiencia antagonista de los mejores aislados bacterianos en condiciones controladas. La Figura muestra el porcentaje de severidad

de cada uno de los tratamientos, de acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación de severidad bajo condiciones de invernadero se observa que el tratamiento inoculado con agua el porcentaje de severidad es bajo ya que las plantas durante el periodo de evaluación no presentaron ningún sintoma todas las plantas estuvieron sanas y vigorosas, el mayor valor de reducción de la enfermedad se obtienen con el T2 que es la inoculación con *F. oxysporum* + *Trichoderma* + *E. amigonus* con un valor del 28% y una severidad de la enfermedad del 30%. Este valor obtenido nos hace pensar que hay una compatibilidad entre los dos microorganismos utilizados en el biocontrol tanto el hongo como la bacteria frente al hongo causante de la Marchitez Vascular de Babaco como es *Fusarium oxysporum*.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA
 ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CARRERA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

TEMA:
 BIOCONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii*. var. pentágona). EMPLEANDO MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.

AUTORA:
 Ruth Raquel Espinoza Buele

DIRECTOR:
 Ing. Agr. Ángel Rolando Robles Carrión, M. Sc.

LOJA-ECUADOR
 2015

Tests de grado previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo.

Anexo 4. Continuación...



INTRODUCCIÓN.

•El babaco es un cultivo tradicional en todas las provincias de la serranía ecuatoriana, se calculado que la superficie sembrada puede llegar de 150 a 200 ha, representados en su mayoría por cultivos bajo invernadero Scheldeman (2002); Núñez (2008); Jácome (2011).

•La forma de propagación es asexual, dando lugar a diversas enfermedades, la principal limitante en el desarrollo y la producción, es la Marchitez Vascular del Babaco (MVB), puede causar hasta un 100% de pérdida en algunas zonas productoras del país y principalmente en la provincia de Loja. •Ochoa y Fonseca (2000); Tobar 2008.

•El uso de agentes de control biológico se muestra como un complemento o alternativa al control químico, haciendo necesaria la búsqueda de organismos capaces de controlar las principal enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco. •Pérez, 2004

OBJETIVOS.

Objetivo general.

- Evaluar el biocontrol de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB) empleando microorganismos antagonistas.

Objetivos específicos.

- Evaluar el efecto antagonista de bacterias rizosféricas sobre aislados de *Fusarium*.
- Determinar la eficiencia antagonista de los mejores aislados bacterianos en condiciones controladas.

METODOLOGÍA

Ubicación del área de estudio

El presente estudio se desarrolló en las instalaciones de la Universidad Nacional de Loja, el cual contó de dos fases experimentales en condiciones controladas. La primera fase de laboratorio se realizó en el Centro de Biotecnología; mientras la fase de invernadero se cumplió en el área de la Quinta Experimental "La Argelia".

Se utilizaron dos cepas de *F. oxysporum*, una de *Trichoderma* y tres cepas de bacterias.

- Evaluar el efecto antagonista de bacterias rizosféricas sobre aislados de *Fusarium*.

Así mismo se procedió para la obtención de cultivos puros, se realizó la siembra de los aislados bacterianos para las pruebas de antagonismo. Subsecuentemente en la misma caja se depositó en el centro discos de sacabocados de los aislados fúngicos pertenecientes al género *Fusarium*. Posteriormente las cajas se incubaron a 28°C y se observó cada 24h para cuantificar el antagonismo de las cepas bacterianas frente a *Fusarium* spp.

Las pruebas de antagonismo fúngico y bacteriano consistieron en la siembra de los hongos patógeno (*Fusarium*) y antagonista (*Trichoderma*) en cajas Petri con medio de cultivo PDA. En estas cajas se sembró previamente las bacterias aisladas y se depositaron en un extremo discos de micelio de 4 mm de diámetro de las especies de *Fusarium* spp., con crecimiento activo, y al otro extremo se colocaron discos de 4 mm de diámetro de *Trichoderma* spp. en crecimiento activo. Una vez colocados ambos hongos en las cajas se incubaron a 28°C y se observaron cada 24 h para cuantificar el número de días al primer contacto entre el antagonista y el patógeno y el diámetro de la zona de intersección.

- Determinar la eficiencia antagonista de los mejores aislados bacterianos en condiciones controladas.

Para cumplir este objetivo se obtuvieron 55 plantas de babaco del Cantón Saraguro, se utilizó sustrato de proporción 2-1-1 (turba-arena-tierra) previamente desinfectado a vapor. Se sometieron las plantas a una etapa de cuarentena.

Se realizó el inóculo tanto del hongo causante de la Marchitez Vascular del Babaco como los posibles antagonistas en este caso *Trichoderma* y la cepa de bacterias

Para la inoculación se sacaron todas las plantas del sustrato y se sacudieron en agua común para evitar daños mecánicos al sistema radicular. Posteriormente se efectuaron pequeños cortes con la ayuda de tijeras a las raíces para crear la vía de ingreso del agente causal de la Marchitez Vascular. Seguidamente las plantas se sumergieron por 5 minutos en la solución fúngica de 400 ml (según el tratamiento), ajustada a una concentración de 1×10^6 UFC. Este paso se realizó para los 4 tratamientos. Para el tratamiento control (T0), las plantas fueron sumergidas durante el mismo tiempo en agua destilada estéril. Subsecuentemente, se sembraron las plantas inoculadas en el mismo sustrato y funda del cual se extrajeron (Gómez y Macas, 2014). Finalmente, todas las fundas se regaron con 400 ml de agua estéril.

La evaluación se realizó mediante observación directa durante cuarenta días después de la inoculación.

Nivel	Síntomas
0	Planta sana
1	Clorosis inicial de las primeras hojas bajas.
2	Clorosis intensa de aproximadamente el 50 % del follaje. Defoliación moderada.
3	Clorosis total del follaje. Defoliación severa. Bandas oliváceas longitudinales y deprimidas en el tallo.
4	Plantas completamente defoliadas. Necrosis descendente desde el ápice del tallo (muerte de la planta).

La severidad fue calculada con la siguiente fórmula:

$$S (\%) = \frac{\sum(a \times b)}{N \times K} \times 100$$

Dónde: S (%) = incidencia, a = total de plantas en cada grado de la escala; b = grado de la escala correspondiente; N = número de plantas total evaluadas K= grado máximo de la escala (K=5) (Townsend y Heuberger 1943)

Anexos 5. Registro de asistencia, de la socialización de resultados.

SEMINARIO TALLER DE SOCIALIZACIÓN DE RESULTADOS DE TESIS (TERCERA VISITA)



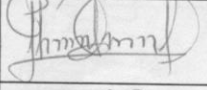


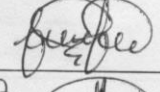

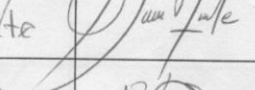

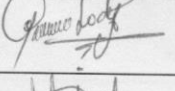

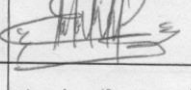
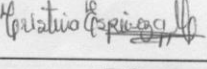

TÍTULO: "BIOCONTROL DE LA MARCHITEZ VASCULAR DEL BABACO (*Vasconcellea heilbornii*. var. pentágona) EMPLEANDO MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS."

Autora: Ruth Raquel Espinoza Buele.


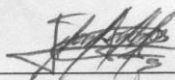


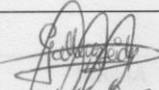
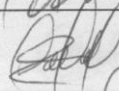
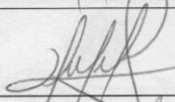
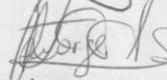
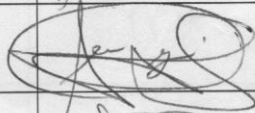

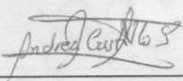
Director: Ing. Angel Robles, Mg. Sc.

Ciclo: Quinto Ciclo de Ingeniería Agronómica.

REGISTRO DE ASISTENCIA.

N°	NOMBRES Y APELLIDOS	CATEGORÍA	FIRMA
1	Janelh Margarita Carrion León	Estudiante	
2	José Lucio González Armijos	Estudiante.	
3	Jhoanna Maribel Silva Suárez	Estudiante	
4	Melissa Alexandra Romero Zambano	Estudiante.	
5	Jhuleana Maribel Colva Suárez	Estudiante.	
6	Daniela Cecibel Farez Armijos	Estudiante	
7	Rebeca Ximena Herrera .M.	Estudiante	
8	Kevin Joel Fialde Sanchez	Estudiante	
9	Verónica del Cisne Castillo Jaramillo	Estudiante	
10	Leydi Alexandra Guerrero Abad.	Estudiante.	
11	Andreina Mariela Lima Balcazar	Estudiante	
12	PAULO CÉSAR ESPINOZA CORDERA	Estudiante	
13	Cristina Nathaly Espinoza Mautrez	Estudiante	
14	Gustavo Israel Cordero Vivanco	Estudiante.	

Anexo 5. Continuación....

15	Junior Alejandro Samillo Robera	Estudiante.	
16	Juan Andres Buri Buri	Estudiante	
17	Diego Fernando Labanda Lajomica	Estudiante	
18	Luis Felicitó	Egresado	
19	Leidy Esthefani Callejos Sanger	Estudiante	
20	Cynthia Katherine Ortiz Valdez	Estudiante.	
21	Angel Pablos	Estudiante.	
22	Jorge Antonio Aréjos Soto	Egresado	
23	Spurn Carlos Corpio	Egresado	
24	Gloria Chiripa Guarderas	Egresada	
25	Andrea Carolina Castillo Yaguana	Egresada	
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			