



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA**

**ÁREA AGROPECUARIA Y DE RECURSOS NATURALES  
RENOVABLES**

**CARRERA DE INGENIERIA AGRONÓMICA**

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS  
ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL BABACO (*Vasconcella  
heilbornii* var. pentagona) EN LA PROVINCIA DE LOJA”**

*Tesis de Grado Previa a  
la Obtención del Título de  
Ingeniera Agrónomo*

**AUTORA:** Claudia Irma Chiriapo Guarderas

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

**Loja-Ecuador**

**2016**

*No busques los  
mejores puestos, sino  
los más adecuados,  
aunque no seas genio.*



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

**CERTIFICACIÓN**

Ing. Ángel Robles Carrión M. Sc.

**DIRECTOR DE TESIS.**

**CERTIFICO:**

Que el presente trabajo de investigación titulado “**IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL BABACO (*Vasconcella heilbornii* var. pentagona) EN LA PROVINCIA DE LOJA**” de autoría de la señorita egresada de la Carrera de Ingeniería Agronómica: **CLAUDIA IRMA CHIRIAPO GUARDERAS**, 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 de 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

#### “IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL BABACO (*Vasconcella heilbornii* var. *pentagona*) EN LA PROVINCIA DE LOJA”

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 **CLAUDIA IRMA CHIRIAPO GUARDERAS**, 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:** Claudia Irma Chiriapo Guarderas

**Cedula:** 1900453612

**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 **Claudia Irma Chiriapo Guarderas**, declaro ser autor, de la tesis titulada **“IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL BABACO (*Vasconcella heilbornii* var. pentagona) EN LA PROVINCIA DE LOJA”**, como requisito para optar al grado de **INGENIERO 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:** Claudia Irma Chiriapo Guarderas

**Numero de Cedula:** 1900453612

**Dirección:** Loja, calle Argentina y México.

**Teléfono:** 0981550134

**E-mail:** claudys\_cg@hotmail.com

**DATOS COMPLEMENTARIOS.**

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

<b>Tribunal de Grado:</b>	Ing. Edmigio Valdivieso Caraguay	PRESIDENTE
	Ing. Bolívar Peña Merino	VOCAL
	Dr. Tulio Solano Castillo	VOCAL

## **AGRADECIMIENTO**

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

Al Ing. Ángel Robles Carrión M Sc. Director de tesis, por su apoyo y asesoramiento brindado durante todo el proceso de investigación, agradezco al Centro de Biotecnología e investigadores que se desempeñan en esta institución en especial al Dr. Roldan Torres por su apoyo, amistad y confianza, quien con su experiencia me guio en el desarrollo de la fase de laboratorio.

Finalmente, expreso un infinito y profundo agradecimiento a mi familia, amigas y compañeros por convertirse en un pilar fundamental en mi formación académica.

***La Autora***

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor y cariño dedico uno de mis más grandes sueños:

“A Dios por darme la libertad de vivir, a mi madre Lucia quien con su hermoso ejemplo de honestidad y fortaleza alienta siempre mi corazón, por su amor de madre y comprensión infinita, a mi padre Carlos, por sus sabios consejos que fortalecieron mi alma y encaminaron mi vida a Mariela, Narcisa y Gabriel por su aliento de hermanos y por el hermoso regalo de existir en mi vida.

A mi enamorado por su apoyo incondicional y por estar conmigo en las buenas y en las malas mil gracias..... ”

***Claudia C.G.***

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Pag.
CERTIFICACIÓN .....	¡Error! Marcador no definido.
AUTORÍA .....	¡Error! Marcador no definido.
CARTA DE AUTORIZACIÓN DE TESIS POR PARTE DEL AUTOR, PARA LA CONSULTA, REPRODUCCIÓN PARCIAL O TOTAL Y PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA Y TEXTO COMPLETO. ....	¡Error! Marcador no definido.
AGRADECIMIENTO .....	v
DEDICATORIA .....	vii
ÍNDICE GENERAL.....	viii
ÍNDICE DE CUADROS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	xii
ÍNDICE DE ANEXOS .....	xiii
RESUMEN .....	xv
SUMMARY .....	xvi
I. INTRODUCCIÓN .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	3
2.1. Cultivo de Babaco .....	3
2.2. Importancia y Distribución de la Marchitez Vascolar del Babaco (MVB) .....	4
2.3. Síntomas Causados por <i>Fusarium</i> .....	5
2.4. Características Morfológicas de <i>Fusarium</i> .....	5
2.5. El Suelo como Hábitat de los Microorganismos .....	6
2.6. La Rizósfera .....	7
2.6.1. División de la rizósfera.....	7
2.6.2. Interacciones microbianas de la rizósfera.....	8
2.7. Los Microorganismos del Suelo.....	9
2.7.1. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal.....	9
2.7.2. Microorganismos con potencial biocontrolador de enfermedades en cultivos.....	10
2.7.3. Hongos .....	10
2.7.4. Bacterias.....	10

2.8.	Métodos para el estudio de la diversidad de los microorganismos de la rizósfera .....	11
2.9.	Estudios sobre Microorganismos Asociados a la Rizósfera en Cultivos .....	12
2.10.	Biocontrol de <i>Fusarium</i> en babaco .....	13
2.10.1.	Hongos como agentes de control biológico .....	14
2.10.2.	Bacterias como agentes de control.....	17
2.10.3.	Mecanismos de acción de los antagonistas .....	20
III.	MATERIALES Y METODOS .....	22
3.1.	Ubicación general .....	22
3.2.	Ubicación Político – Geográfica.....	22
3.2.1.	Laboratorio de Biotecnología .....	22
3.2.2.	Georreferenciación de los cantones estudiados .....	22
3.2.3.	Cantón Loja .....	22
3.2.4.	Parroquia Chuquiribamba (Sector el Carmelo) .....	22
3.2.5.	Cantón Saraguro .....	23
3.2.6.	Comunidad Cochapamba .....	23
3.3.	Clima y ecología .....	23
3.4.	Materiales .....	23
3.4.1.	Material de Laboratorio .....	23
3.4.2.	Materiales de Campo.....	24
3.4.3.	Materiales de escritorio.....	24
3.4.4.	Medios de Cultivos .....	24
3.4.5.	Materiales Biológicos.....	24
3.5.	Metodología .....	25
3.5.1.	Metodología del Primer Objetivo “Caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizósfera del Babaco” .....	25
3.5.1.1.	Colecta de muestra.....	25
3.5.1.2.	Aislamiento de microorganismos .....	26
3.5.1.3.	Caracterización morfológica de microorganismos antagonistas .....	27
3.5.2.	Metodología del Segundo Objetivo “Determinar la presencia de posibles microorganismos (hongos y bacterias) con capacidad antagonista de la Marchitez Vascular del Babaco” .....	29

3.5.2.1. Reactivación de los hongos y bacterias fitopatógenos .....	29
3.5.2.2. Pruebas cualitativas de antagonismo hongo – hongo por el método del cultivo dual .....	29
3.5.2.3. Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Bacteria .....	30
IV. RESULTADOS .....	31
4.1. Caracterización de las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizósfera del Babaco. ....	31
4.1.1. Aislamiento y caracterización morfológica de microorganismos antagonistas. ....	31
4.2. Determinación de la Presencia de Posibles Microorganismos (hongos y bacterias) con Capacidad Antagonista de la Marchitez Vascular del Babaco. ....	34
4.1.2. Pruebas cualitativas de antagonismo hongo-hongo por el método del cultivo dual. ....	34
4.1.3. Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Bacteria por método de cultivo dual. ....	35
V. DISCUSIONES .....	36
5.1. Caracterización de las Comunidades Fúngicas y Bacterianas de la Rizósfera del Babaco. ....	36
5.1.1. Aislamiento y caracterización morfológica de microorganismos Antagonistas. ....	36
5.2. Determinar la Presencia de Posibles Microorganismos (Hongos y Bacterias) con Capacidad Antagonistas de la Marchitez Vascular del Babaco. ....	37
5.2.1. Pruebas cualitativas del antagonismo hongo-hongo por el método del cultivo dual. ....	37
5.2.2. Pruebas cualitativas de antagonismo hongo – bacteria. ....	38
VI. CONCLUSIONES .....	40
VII. RECOMENDACIONES .....	41
VIII. BIBLIOGRAFIA .....	42
IX. ANEXOS .....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Identificación morfológica y molecularmente de aislados de <i>Fusarium oxysporum</i> .....	24
<b>Cuadro 2.</b> Origen de las muestras de suelos rizosféricos del Babaco para el aislamiento de microorganismos fúngicos y bacterianos en los cantones de Loja y Saraguro. ....	26
<b>Cuadro 3.</b> Características morfo-culturales de aislados fúngicos posibles antagonistas de <i>Fusarium oxysporum</i> , procedentes del suelo rizosférico del Babaco. ....	31
<b>Cuadro 4.</b> Pruebas realizadas en diferentes medios de cultivos, prueba enzimática y prueba química (tinción gram). ....	33

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa del cantón Loja y de Saraguro (2012). .....	25
<b>Figura 2.</b> Procedimiento para diluciones seriadas <b>a)</b> muestras de suelo, <b>b)</b> pesar el suelo, <b>c)</b> colocar 9 mL de agua en el tubo, <b>d)</b> gramo de suelo en el tubo, <b>e)</b> vortex por 5 min, <b>f)</b> diluciones de suelos, <b>g)</b> colonia de hongo en medio PDA (papa dextrosa agar).....	27
<b>Figura 3.</b> Crecimiento radial de <i>Fusarium oxysporum</i> frente al aislado seleccionado género <i>Penicillium sp</i> utilizadas en ensayos durante 168 horas de evaluación. <b>Leyenda:</b> <b>T1:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> ALM2 + <i>Penicillium sp</i> <b>T2:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> QUI2 + <i>Penicillium sp</i> <b>T3:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> ALM2 <b>T4:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> QUI2.....	34
<b>Figura 4.</b> Crecimiento radial en cultivos duales de <i>Fusarium oxysporum</i> (AML2), con género <i>Bacillus sp</i> (COC2), durante 168 horas de evaluación. <b>Leyenda:</b> <b>T1:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> ALM2 + <i>Bacillus sp</i> AL2 <b>T2:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> QUI2 + <i>Bacillus</i> AL2 <b>T3:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> ALM2 <b>T4:</b> <i>Fusarium oxysporum</i> QUI2.....	35

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Identificación de microorganismos mediante pruebas químicas, enzimáticas y en medios de cultivos .....	53
<b>Anexo 2.</b> Evaluación de enfrentamiento dual <i>Penicillium sp</i> frente a <i>Fusarium Oxysporum</i> aislados (AML2 y QU2).....	55
<b>Anexo 3.</b> Evaluación de enfrentamiento dual <i>Bacillus sp</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i> aislados (AML y QU2).....	55
<b>Anexo 4.</b> Procedimiento para realizar en conteo de conidios .....	55
<b>Anexo 5.</b> Número de conidios de cada uno de los aislados de los suelos del cultivo de Babaco.....	56
<b>Anexo 6.</b> Registro utilizado para Conteo de Conidios en Cámara de Neubauer.....	57
<b>Anexo 7.</b> Datos de Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Hongo .....	58
<b>Anexo 8.</b> Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Bacteria.....	58
<b>Anexo 9.</b> Conteo de número de conidios para cada uno de los aislados.....	59
<b>Anexo 10.</b> Tríptico elaborado para el día de campo.....	60

**“IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ASOCIADOS  
A LA RIZOSFERA DEL BABACO (*Vasconcella heilbornii* var.  
pentagona) EN LA PROVINCIA DE LOJA.”**

## RESUMEN

La actividad agrícola y la seguridad alimentaria se proyectan como actividades principales dentro de la economía nacional, en el Ecuador ha cobrado mucha importancia en los últimos años, se destaca actualmente el auge que existe en la producción de cultivos agrícolas no tradicionales y ancestrales, uno de estos es el cultivo de babaco, su origen está en los valles de la provincia de Loja.

La presente investigación tuvo como objetivo identificar los microorganismos asociados a la rizósfera del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona) en la provincia de Loja, mediante métodos tradicionales. Para ello se realizaron muestreos en suelos con plantaciones de babaco en las localidades Chuquiribamba y Saraguro para obtener aislados, con la finalidad de realizar caracterización morfológica y conocer su efectividad biológica como antagonista contra *Fusarium oxysporum*. Los aislamientos se realizaron de un total de nueve muestras de suelo por medio de diluciones seriadas. Posteriormente, a partir de los aislados purificados se procedió a la identificación morfométrica de cada aislado fúngico posibles antagonista de la MVB, en base a sus características morfológicas y macroscópicas, tomando en cuenta su aspecto, color y superficie de la colonia desarrollada en medio PDA, para la caracterización de bacterias se realizó pruebas en medio Kliger, Mackonkey, catalasa, tinción gram, medio LPGA y Agar inclinado, Finalmente se realizaron pruebas cuantitativas de antagonismo Hongo-Hongo, donde se utilizó dos aislados de *Fusarium oxysporum* (ALM2 y QUI2), frente a *Penicillium sp* por su alto contenido de conidios y para el enfrentamiento Bacteria-Hongo, se utilizaron los mismos aislados de *Fusarium oxysporum*, frente al aislado de *Bacillus sp*, por presentar mejores características macro, microscópicas y bioquímicas. La relevancia de este trabajo, se enmarca en crear pautas para la determinación de microorganismos rizosféricos antagonistas de hongos del suelo causante de enfermedades en cultivos de importancia económica, tal como el Babaco.

**Palabras claves:** Babaco, Microorganismos, Antagonista, *Bacillus sp*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp*,

## SUMMARY

Agricultural activity and food security stand out as main activities within the national economy and have become increasingly important in recent years within Ecuador. There is a boom in the production of non-traditional and ancestral crops and one of these is Babaco from the valleys of the province of Loja.

This research aimed to identify the microorganisms in the rhizosphere of Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. *pentagona*) in the province of Loja, using traditional methods. For this purpose, soil samples were taken from Babaco plantations in Chuquiribamba and Saraguro to obtain isolates in order to conduct morphological characterization and ascertain their biological effectiveness as an antagonist against *Fusarium oxysporum*. Isolates were extracted from a total of nine soil samples using serial dilution. Subsequently, from the purified isolates the morphometric identification of each fungal potential antagonist MVB was conducted. Based on their morphological and macroscopic characteristics, taking into account their appearance, color and surface of the colony grown on a PDA medium, bacteria testing was performed for characterization identification in Kliger, MacConkey, catalase, gram staining agars, LPGA agar and slant agar. Eventually quantitative tests of fungal antagonism using two isolates of *Fusarium oxysporum* (ALM2 and QUI2) were performed against *Penicillium sp* for its high content of conidia and for the Fungal Bacterium confrontation, the same isolates of *Fusarium oxysporum* against the *Bacillus sp* isolates were used to demonstrate the best macro, microscopic and biochemical characteristics. The relevance of this work is part of creating guidelines for the determination of rhizosphere microorganisms' antagonists causing soil fungi diseases in economically important crops such as Babaco.

**Keywords:** Babaco, Microorganisms, Antagonist, *Bacillus sp*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium sp*.

## I. INTRODUCCIÓN

El suelo es considerado como un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa o atmósfera del suelo (Nogales, 2005). Además, el suelo es un ecosistema de enorme riqueza microbiana, con una alta biodiversidad de microorganismos, pertenecientes a los tres dominios de la vida que son: Bacterias, *Archaea* y *Eukarya* (Clavijo *et al.*, 2011; Pisa *et al.*, 2011). Estos microorganismos conforman una gran fuente de diversidad genética. La amplia diversidad y el potencial que representan están muy lejos de ser conocida y explorada totalmente (Dayakar *et al.*, 2009). Cabe recalcar, que estos microorganismos están en constante interacción multitrófica y muchas de estas interacciones se dan gracias a la generación de algunos compuestos o exudados que generan las raíces e interfieren activamente en la comunidad microbiana de la rizósfera (Cooper y Rao, 2006).

La rizósfera de las plantas, se refiere la zona biológicamente activa del suelo alrededor de la raíz en donde se llevan a cabo la interacción de las plantas con muchos microorganismos entre los que se incluyen bacterias y hongos (Maldonado, 2013). Varios autores han clasificado a los microorganismos como: microorganismos promotores del crecimiento vegetal y microorganismos promotores del crecimiento vegetal con capacidad antagonista (Mondino y Vero, 2006).

Bajo condiciones naturales, la presión de los microorganismos fitopatógenos que atacan las raíces del Babaco es muy alta debido a que la actividad microbiana asociada a la descomposición de la hojarasca que es un ambiente propicio para la proliferación de los hongos patógenos. Las raíces de Babaco, son muy susceptibles a los encharcamientos y a la proliferación de microorganismos fitopatógenos. Sin embargo, la rizósfera es una zona donde interactúan diversos microorganismos (hongos y bacterias), los cuales se los podría potenciar y utilizarlos como controladores biológicos de enfermedades en el Babaco (Fatima, 2012). Por esta razón se hace necesario conocer la biodiversidad de microorganismos existentes en la rizósfera del Babaco en la provincia de Loja.

Los microorganismos del suelo son un esencial componente de la comunidad biótica de las áreas naturales y las cuales son altamente responsables del funcionamiento de ecosistemas porque ellas participan en la mayoría de las transformaciones de nutrientes. Por lo tanto, la principal diversidad de un ecosistema son las comunidades de microorganismos. La gran mayoría de las bacterias y hongos del suelo de origen natural aún se desconocen debido a que solamente un porcentaje reducido de los microorganismos del medio natural pueden ser cultivados (Pace, 1997; Hackl *et al.*, 2004).

Uno de los retos que enfrenta la ecología microbiana como ciencia es el reconocer o identificar individuos o grupos de la comunidad microbiana que cumplan una función determinada en el ecosistema (Torsvik y Ovreas, 2002).

Los objetivos de esta investigación fueron:

### **Objetivo General**

- Conocer mediante métodos tradicionales los microorganismos asociados a la rizósfera del Babaco (*Vasconcellea heilbornii* var. pentagona) en la provincia de Loja.

### **Objetivos Específicos**

- Caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizósfera del Babaco.
- Determinar la presencia de posibles microorganismos (hongos y bacterias) con capacidad antagonista de la marchitez vascular del babaco.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Cultivo de Babaco

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

Es así que el Ecuador es uno de los pocos lugares del planeta donde aún es posible descubrir y describir plantas vasculares nuevas para la ciencia. En ese contexto el Babaco, es considerado como un híbrido natural partenocárpico originario de la hibridación interespecífica de *las V. stipulata* (Toronche) y *V. pubescen* (Chamburo) y su origen radica en los valles de la provincia de Loja (Scheldeman, 2002).

La propagación del Babaco, dado que no produce semillas, se la hace de manera asexual utilizando partes de las plantas como: brotes tiernos, estacas o por injertos, dando lugar a típicos problemas fitopatológicos y a la degeneración de la especie (Scheldeman, 2002; AAIC, 2003).

Los problemas fitosanitarios constituyen la principal limitante del cultivo del Babaco en el mundo y en Ecuador destacándose las enfermedades causadas por hongos, *Phytophthora* y *Fusarium*, son los principales hongos causantes de la marchitez vascular en diferentes cultivos y ocasionan graves daños (Agrios, 2005).

La marchitez vascular del babaco (MVB), en un estadio inicial las hojas pierden su turgencia, se debilitan y adquieren una tonalidad que va de verde claro a amarillo verdoso, decaen y finalmente se marchitan tomando una coloración clorótica total. En un estadio tardío se necrosan y mueren. Las hojas pueden enrollarse o permanecer extendidas (Estupiñan, *et al.*, 2007).

## 2.2. Importancia y Distribución de la Marchitez Vascular del Babaco (MVB)

El Babaco en el país se ha convertido en uno de los principales cultivos generadores de divisas, dado el creciente aumento de las exportaciones de esta fruta exótica a la Unión Europea, principalmente a Alemania y Holanda con un volumen de exportación de 2 351.43 toneladas de babaco y sus derivados, con un ingreso de 4 161.12 millones de dólares, lo cual ha permitido el desarrollo social en regiones donde esta fruta es cultivada por pequeños productores (Vivanco, 2013).

La (MVB) se la define como un complejo de trastornos vasculares que causan un estado general de la planta que casi siempre termina con la muerte de la misma. Además, las enfermedades vasculares se producen por la invasión del fitoparásito en el sistema vascular de las plantas (xilema y floema), los cuales provocan necrosis de las células que conforman los tejidos conductores; la necrosis es originada por la acción directa del fitoparásito o por las toxinas que este libera. (Agrios, 2005).

Bajo estos antecedentes la enfermedad de la marchitez vascular del babaco (MVB), se origina en los años de 1990 con el auge en la producción y exportación del Babaco hacia mercados internacionales (Ochoa, 2000; Tobar, 2008).

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

En el año 2000, los investigadores del INIAP, Ochoa y Fonseca, lograron aislar y caracterizar morfológicamente el microorganismo causante de la MVB, designándole el nombre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Caricae*, los mismos investigadores en el año 2004 cambian el nombre del microorganismo *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasconcellae*, debido a que los taxónomos reorganizaron el nombre del Babaco que anteriormente se llamaba *Carica heilbornii* var. *pentagona* en *Vasconcella heilbornii* var. *pentagona* (Badillo, 2000; Argotti *et al*, 2011)

### **2.3. Síntomas Causados por *Fusarium***

Los primeros síntomas provocan 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 toma de un color café que conforme avanza la enfermedad su consistencia se torna acuosa. 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 (Bravo *et al.*, 2012).

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

### **2.4. Características Morfológicas de *Fusarium***

El micelio del hongo se propaga dentro de las células de la planta en la corteza de la raíz, cuando llega a los vasos xilémicos, entra y se mantiene exclusivamente en estos, viaja en sentido ascendente 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 cesa su movimiento ascendente. El micelio del hongo avanza dañando las células vegetales, impidiendo el paso de agua y savia. Por la escasez de agua 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 abundantemente (Sarasola y Rocca 2005).

Los marchitamientos vasculares causados por este patógeno son más comunes y destructivos en las regiones templadas más cálidas y en los trópicos y subtrópicos, llegando a ser menos dañinos o raros en climas más fríos, excepto en el caso de los cultivos de invernaderos en estas áreas (Bravo *et al.*, 2012).

La tasa de velocidad de la infección depende de factores tales como el tiempo de la infección inicial, la virulencia y condiciones climáticas. Dependiendo de la tasa de

velocidad de infección, el hongo puede ocasionar pudrición radicular y muerte, incluso en plantas muy jóvenes (Agrios, 2005).

## **2.5. El Suelo como Hábitat de los Microorganismos**

El suelo es un sistema de interacción entre tres fases bien definidas, una fase sólida, líquida, y gaseosa, este sistema complejo que constituye el suelo, característicamente heterogéneo espacial y temporalmente, alberga una gran riqueza de especies vegetales, animales y microbianas. El tipo y composición de la materia mineral depende las características de las rocas del subsuelo, como de los procesos edáficos en su formación, la porción inorgánica es muy importante por su influencia en la disponibilidad de nutrientes, aireación, retención de agua, la materia orgánica procede de la actividad de los distintos organismos vivos del suelo y su composición principalmente en función del tipo de cubierta vegetal (Insam, 2001).

El suelo es un ambiente muy apropiado para el desarrollo de los microorganismos tanto eucariotas y procariotas. Todos estos organismos establecen relaciones entre ellos en formas muy variadas y complejas, tanto el contenido en agua como la composición de la atmósfera del suelo son factores que fluctúan ampliamente (Ettema, 2002). Las bacterias se organizan en microcolonias compuestas de pocas células que pueden pertenecer a diferentes morfotipos, factores como la presencia de raíces, pequeños agregados, nutrientes y poros parecen gobernar la distribución de bacterias en microhábitats (Nunan, *et al.*, 2003).

El suelo es uno de los hábitats microbianos que presenta mayor diversidad, se estima que alberga  $1 \times 10^9$  UFC/gramo de suelo y un estimado de  $1 \times 10^4$  especies microbianas diferentes por gramo de suelo, estos microorganismos pueden interactuar en la rizósfera, con las raíces de las plantas, de modo que los exudados radicales, ricos en compuestos orgánicos les aportan gran variedad de nutrientes para llevar a cabo sus actividades metabólicas (Franco, 2008).

En un gramo de suelo hay millones de bacterias cultivables, entre las cuales se encuentra una gran diversidad metabólica para transformar los elementos que forman parte de los nutrientes necesarios para todos los seres vivos (Roling, 2007), Su presencia no indica que todos los microorganismos participen activamente en la dinámica de esos elementos, ya que su contribución depende de su estado fisiológico, de su actividad

enzimática y de la concentración y disponibilidad de los compuestos a utilizar, (Amora-Lazcano, *et al.*, 2010). El crecimiento microbiano más importante en el suelo tiene lugar en la superficie de las partículas del suelo, normalmente en la rizósfera (Madigan *et al.*, 2006).

Una de las características importantes para lograr determinar la disponibilidad de nutrientes para los organismos es la textura y porosidad del suelo (Odum, 2001). Estos microorganismos del suelo modifican la estructura del suelo mediante la producción de exudados con propiedades adhesivas, que permiten la agregación de minerales y compuestos orgánicos (Kibblewhite *et al.*, 2008).

La calidad del suelo está fuertemente influenciada por los procesos microbianos ocurren en el mismo, y éstos, relacionados con la diversidad; por tanto, es muy probable que el mantenimiento de la estructura de la comunidad microbiana tenga la capacidad de servir como indicador temprano y de gran sensibilidad de la degradación o empobrecimiento del suelo (Abril, 2003).

## **2.6. La Rizósfera**

Es la zona biológicamente activa alrededor de las raíces de las plantas que contiene microorganismos, tales como bacterias y hongos, los cuales interactúan entre sí, con la planta y con el suelo. En este sitio se genera una serie de interacciones complejas, debido a una actividad biológica intensa y a una transferencia de agua y nutrientes, que pueden resultar benéficas o dañinas a las plantas (Honorato, 2000). Esto se debe a la existencia en la rizósfera de una amplia gama de compuestos orgánicos tales como exudados radicales de bajo peso molecular como: secreciones, mucígeles, lisados celulares y metabolitos (Franco, 2008).

### **2.6.1. División de la rizósfera**

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

**Ectorizósfera:** correspondiente a la parte más externa de la raíz en donde se encuentran mucílagos de la raíz y de microorganismos, células desprendidas de la raíz y células

bacterianas (intactas y lisadas) que al mezclarse entre sí y con las partículas de suelo forman un complejo denominado mucigel. El **Rizoplano** o parte superficial (coincidente con la Epidermis de la raíz) y la **Endorizósfera** que comprende el área desde el rizoplano hasta la región cortical. (Prashar, *et al.*, 2014).

### **2.6.2. Interacciones microbianas de la rizósfera**

Una gran cantidad de microorganismos se encuentran interaccionando activamente junto con los demás componentes del ecosistema de la rizósfera. Las interacciones más importantes se clasifican en tres grupos principales:

- **Interacciones planta-planta:** Causadas por el contacto de los sistemas radicales, lo cual puede resultar en la competencia por nutrientes e intercambio de señales de importancia a nivel poblacional en un ecosistema.
- **Interacciones planta-microorganismo:** Determinadas por las actividades de las plantas que estimulan el crecimiento de los microorganismos alrededor de las raíces (efecto rizósfera) y por las actividades microbianas que afectan el desarrollo de las plantas ya sea en beneficio de éstas o induciéndoles enfermedades. (Martínez-Álvarez, 2003).
- **Interacciones microorganismo-microorganismo:** Las cuales incluyen actividades de sinergismo y antagonismo (Martínez-Álvarez, 2003).

Las interacciones negativas o nocivas producen daño o enfermedades a la raíz de la planta, por medio de microorganismos patógenos que infectan a la raíz a través de heridas o aberturas superficiales, como resultado de esta infección, se pueden observar malformaciones, daños a los tejidos o incluso la muerte de la planta (Lambers *et al.*, 2009).

Estas interacciones dan como resultado, la sanidad de la planta y la fertilidad del suelo, así como en la biodegradación de contaminantes, también conocido como biorremediación (Stefanis *et al.*, 2013).

## **2.7. Los Microorganismos del Suelo**

Una gran cantidad de microorganismos se encuentran interaccionando activamente junto con los demás componentes del ecosistema de la rizósfera. Las bacterias y hongos, tienen muchos diferentes niveles tróficos y hábitos de vida y una variedad de relaciones saprófitas y simbióticas, incluyendo relaciones que pueden ser perjudiciales o benéficas para las plantas (Mohandas *et al.*, 2010). Los microorganismos perjudiciales incluyen tanto las bacterias y hongos patógenos de las plantas, los parásitos y no parásitos de la rizósfera. Los saprófitos benéficos, de una diversidad de grupos microbianos, son capaces de promover el crecimiento vegetal y la salud de las plantas incluyen las (PGPR) (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) y los antagonistas de hongos y bacterias patógenos de raíz (Barea *et al.*, 2005).

Los microorganismos de la rizósfera contribuyen al crecimiento vegetal aumentando la disponibilidad de nutrientes limitantes como el fósforo y el nitrógeno, y a su vez, la composición y actividad de la comunidad bacteriana, está fuertemente influenciada por el tipo de vegetación presente en el suelo (Thomson *et al.*, 2010)

### **2.7.1. Microorganismos promotores del crecimiento vegetal**

Las PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) participan en muchos procesos importantes de ecosistemas, tales como el control biológico de patógenos de plantas, ciclos de nutrientes y desarrollo de semillas (Perssello; Cartieaux *et al.*, 2003; Barea *et al.*, 2004; Zahir *et al.*, 2003). *Pseudomonas* y *Bacillus* son los géneros más comúnmente descritos que pertenecen a las PGPR, pero otros también contienen PGPR. (Barea *et al.*, 2005).

La intensidad de la asociación planta-bacteria revela la capacidad de esos microorganismos de adaptarse selectivamente al nicho ecológico específico determinado por la planta y su entorno. (Saikia y Vanita, 2007). Esta capacidad determina que las PGPB puedan ocupar y (algunas veces) desplazar por competencia a otros organismos patógenos o generar una respuesta de inmunidad o resistencia que aumente las defensas de la planta hacia la invasión de patógenos (Pardo *et al.*, 2009).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal o (PGPB), se asocian en el nicho rizosférico con plantas de interés agronómico y en ciertos casos producen efectos

benéficos directos sobre su crecimiento y nutrición tanto nitrogenada como fosforada. Así se constituyen en una alternativa económica y ecológica para aumentar la producción de alimentos (Bashan *et al.*, 2004; Caballero-mellado, 2004; Díaz-Zorita y Fernández, 2008; Ferraris y Courerot, 2004; naiman *et al.*, 2009).

Las especies de plantas son importantes en determinar la estructura de las comunidades de bacterias y hongos de la rizósfera, con efectos tanto positivos y negativos sobre diferentes grupos microbianos (Cardon y Whitbeck, 2007).

### **2.7.2. Microorganismos con potencial biocontrolador de enfermedades en cultivos.**

Los microorganismos en la rizósfera están sujetos a un ambiente donde la suplementación del agua, oxígeno y nutrientes es altamente influenciada por la actividad de las plantas (Cordero, 2008). En la rizósfera existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de microorganismos patógenos vegetales (Jiménez *et al.*, 2009).

### **2.7.3. Hongos**

Se ha reportado en estudios de microbiología del suelo en la zona de preservación ecológica de centro de población “la Uva” en Sinaloa, la presencia de hongos micorrízicos arbusculares del Phylum *Glomeromycota* y pertenecientes a los géneros *Glomus*, *Scutellospora* y *Gigaspora*. Además, se ha reportado la identificación de diferentes tipos de hongos del suelo patógenos para plantas, como la especie *Cercospora caricis* además se identificaron organismos saprófitos tales como *Gloephyllum ceparium* y *Aporoethelavia leptoderma* (López, 2011).

### **2.7.4. Bacterias**

Las rizobacterias son bacterias que colonizan y habilitan la zona de la rizósfera, y 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, y además la cantidad de bacterias disminuye con la profundidad del suelo (Prashar *et al.*, 2014).

Estas bacterias solo colonizan del 4 al 10% de la superficie de la raíz, sin embargo, estas no se encuentran distribuidas en toda la raíz (Frioni, 2008).

Es importante *Trichoderma spp.*, porque se puede afirmar que es la especie más utilizada para el control biológico de diversos patógenos vegetales, ya que tiene características de colonizar diversos nichos ecológicos y posee diversos mecanismos de acción, esto impide que los microorganismos fitopatógenos puedan generar (Michel-Aceves, 2006).

Las bacterias que se encuentran colonizando las raíces de las plantas son denominadas comúnmente como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR), Estas bacterias de vida libre presentes en el suelo, son capaces de adaptarse, colonizar y persistir en la rizósfera de las especies de plantas que están presentes en la mayoría de los ambientes (Compant *et al.*, 2005).

## **2.8. Métodos para el estudio de la diversidad de los microorganismos de la rizósfera**

Las bacterias cultivables del suelo comprenden una fracción menor de las bacterias totales del suelo, se estima que al menos el 1% de los procariotas en la mayoría de los ambientes pueden ser cultivables de forma aislada (Patrick *et al.*, 2005).

Hasta el momento la metodología clásica para el estudio de los microorganismos de la rizósfera del suelo consistía en técnicas convencionales de cultivo en laboratorio, la cual consistía en tomar una muestra del suelo, luego eran sembradas mediante soluciones seriadas en medios de cultivos específicos para cada organismo en estudio. Luego se los caracterizaban a los microorganismos obtenidos morfológica y bioquímicamente por microscopio y por test morfofisiológicos (pruebas bioquímicas).

Dicha metodología sigue siendo válida en la actualidad en muchos casos cuando se trata de estudiar un microorganismo específico. Sin embargo, cuando se requiere conocer en términos reales los porcentajes de microorganismos interactuantes en la rizósfera es necesario recurrir a las técnicas de biología molecular las cuales consisten en extraer el ADN o una fracción determinada del suelo, se amplifica por PCR y se comparan por electroforesis las diferentes secuencias encontradas, construyendo un árbol filogenético. De esta manera podemos tener un valor más real de la biodiversidad de

microorganismos interactuantes en la rizósfera del suelo. Por esta razón se hace necesario conocer la biodiversidad de microorganismos existentes en la rizósfera del Babaco en la provincia de Loja.

Los métodos tradicionales, dentro de los que se encuentran los morfológicos, culturales y bioquímicos son de vital importancia para lograr la integración de los análisis que se llevan a cabo para la identificación y clasificación de microorganismos (Rojas-Triviño, 2011), Estas técnicas se basan en la utilización de genes dianas específicos en organismos eucariontes o procariontes, los cuales se encuentran conservados en el genoma de los géneros o especies a identificar (Schaechter y Lederberg, 2004).

La observación microscópica de la bacteria aislada suele recurrir a la tinción de Gram, a la vez que se determina su forma, determinar la agrupación y la presencia de esporas y otras características morfológicas de interés; crecimiento en diferentes medios donde se observa la morfología de las colonias, producción de pigmentos y la realización de diversas pruebas de identificación, dentro de las más usuales son pruebas bioquímicas para determinar la actividad enzimática y los metabolitos producidos por la bacteria (Madigan, *et al.*, 2003).

## **2.9. Estudios sobre Microorganismos Asociados a la Rizósfera en Cultivos**

La composición de la comunidad microbiana puede ser correlacionada con una serie de factores ambientales, sin embargo, estudios realizados sugieren que, a diferencia de la abundancia bacteriana, la riqueza y la diversidad bacteriana no se ven afectadas por la precipitación en suelos con bajos insumos de carbono a nivel continental (Bachar *et al.*, 2010).

Por otro lado, se ha determinado que el pH del suelo es un mejor parámetro para predecir la diversidad de bacterias del suelo y la riqueza; con los niveles más bajos de diversidad y riqueza observados en los suelos ácidos. En consecuencia, los factores ambientales con frecuencia citados como buenos parámetros para predecir la diversidad vegetal y animal a escala, tienen poco efecto sobre la diversidad bacteriana del suelo. El pH también sirve como un buen parámetro para predecir la composición de las comunidades microbianas en general (Fierer y Jackson, 2006).

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos. Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Wipps 2001).

Las diferentes prácticas agrícolas pueden afectar a la diversidad microbiana del suelo y por lo tanto el nivel de supresividad de enfermedades de las plantas. Los efectos de las prácticas agrícolas en las comunidades de *Bacillus* y *Pseudomonas* han sido estudiadas y se han observado correlaciones entre los niveles de supresividad de enfermedades y la diversidad de estos grupos de bacterias (Garbeva *et al.*, 2006).

## **2.10. Biocontrol de *Fusarium* en babaco**

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 antagonistas del suelo encontramos aislados de géneros de hongos tales como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Gliocladium*, *Laetisaria*, *Sporidesmium* y *Taromyces* así como bacterias de los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Suárez-Estrella y col., 2007).

Estos microorganismos interactúan con los patógenos de plantas de diferentes modos: compitiendo por los nutrientes, generando metabolitos secundarios con efecto antibiótico o parasitando directamente a los organismos fitopatógenos. Además, mejoran el crecimiento de las plantas y generan resistencia inducida en éstas frente a situaciones de estrés (Alabouvette y col., 2006). Estos efectos beneficiosos justifican su uso como alternativas reales a los fungicidas químicos.

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.

### 2.10.1. Hongos como agentes de control biológico

Los hongos fueron los primeros microorganismos que se aplicaron de forma práctica como antagonistas. En la actualidad, los hongos con mayor interés práctico están incluidos dentro del grupo de los Deuteromycotina (hongos imperfectos), destacando los géneros *Beauveria*, *Metarhizium*, La microflora presente en la planta o en el suelo donde se desarrolla el patógeno constituye la fuente idónea de microorganismos con potencial antagonista frente a dicho patógeno (Butt, 2001). Los hongos son aislados abundantemente de la filosfera, pero los microorganismos, incluidos los patógenos vegetales, se presentan en mayor número y con mayor actividad en la rizósfera que en el resto del suelo (Hartmann y col., 2008), debido principalmente a la gran cantidad de aminoácidos, azúcares y otros muchos compuestos que la planta exuda.

Los microorganismos que componen la microflora de la rizosfera son hongos, bacterias y protozoos, siendo los hongos los miembros más activos en las tareas de descomposición. Los hongos microscópicos se encuentran entre los más diversos organismos en el mundo con una estimación de 710 mil a 1,5 millones de especies (Jobard y col., 2010)

La eficacia de muchos antagonistas contra patógenos vegetales y sobre la promoción del crecimiento vegetal está directamente relacionada con la dosis de inoculación del antagonista, por esto una forma de incrementar la efectividad es aumentar la dosis de aplicación del antagonista (Manikandan, 2010). Mandeel y Baker (1991) observaron que la aplicación de cepas no patogénicas de *F. oxysporum* (C5 y C14) a dosis entre  $1,08 \times 10^4$  y  $5 \times 10^4$  UFC g<sup>-1</sup> disminuía considerablemente la incidencia de la marchitez causada por *F. oxysporum* f. sp. *Cucumerinum* en pepino.

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 (Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004; Mondino y Vero, 2006).

### **2.10.1.1. *Trichoderma***

La especie de *Trichoderma* que tiene una gran actividad antagonista sobre patógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii*, *Pythium ultimum* y *Fusarium oxysporum*, causantes de enfermedades importantes en cultivos de rábano, clavel, crisantemo, fríjol, café, haba, tomate, cítricos, vasconcelleas entre otros. Durante los últimos años, varios investigadores y algunas empresas han mostrado gran interés en estudiar el potencial de *Trichoderma* como controlador biológico de patógenos de suelo (Tobar, 2008).

Los aislados del género *Trichoderma* se encuentran entre los agentes de control biológico más utilizados en agricultura, ya que actúan eficazmente contra numerosos hongos fitopatógenos presentes en el suelo Stefanova, M. (2003), efecto en control biológico incluyen *T. atroviride*, *T. hamatum*, *T. asperellum* y *T. harzianum*. Estas especies se caracterizan por presentar un rápido crecimiento, poseer una gran capacidad de esporulación y de adaptación a un amplio rango de suelos agrícolas. Los aislados de *Trichoderma* son sensibles a diferentes condiciones abióticas medioambientales como temperatura, humedad y nutrientes, si bien su gran adaptabilidad les permite sobrevivir en gran cantidad de hábitats (Hjeljord y Tronsmo, 1998). Estos hongos compiten bien en la rizosfera de la planta, como endófitos, siendo capaces de colonizar completamente la superficie radicular. Además, penetran en el tejido de la raíz, normalmente hasta la primera o segunda capa de células, y sólo en los espacios intercelulares, todas estas características hacen de este hongo uno de los principales ACBs utilizados en agricultura. Cerca del 50% de los ACBs fúngicos del mercado pertenecen al género *Trichoderma* (Whipps y Lumsden, 2001).

### **2.10.1.2. *Penicillium***

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Webster 1986).

Los conidióforos erectos tienen las paredes lisas, y en general miden 200-400 x 3,0-3,5  $\mu\text{m}$  (longitud x diámetro), estando formados por una serie de ramas que se orientan paralelamente, Las ramas terminales constituyen las fiálidas de donde nacen las conidias en cadenas abundantes. Las fiálidas son acerosas, y se presentan en grupos de 6-10 por verticilo, de 10 -15 x 3,0-3,5  $\mu\text{m}$ . Las conidias son usualmente elípticas, con paredes lisas o equinuladas, muy largas 5,0-5,5x 3,0-3,5  $\mu\text{m}$  (Samson., 2000).

En cuanto a su crecimiento en medio de cultivo presenta colonias de crecimiento rápido. En medio APD, sus colonias alcanzan un tamaño de 35-60 mm de diámetro en 10días. Son planas o estriadas radialmente y con áreas centrales aterciopeladas o ligeramente algodonosas, de aspecto compacto a causa de la abundante producción de conidias de color verde grisáceo y con gotitas de exudado claro y brillante. Su reverso de color amarillo claro marrón o naranja. (Roselló-Caselles, 2003).

Estudio realizado sobre el uso de una cepa de *Penicillium* PO212es un hongo ecológicamente competitivo ya que es xerotolerante (tolerante a la sequía), mesofílico (con una temperatura óptima de crecimiento entre 15 y 30°C) y que tolera un amplio rango de pHs (desde 4,0 hasta 8,0), por lo que se adapta a diversos tipos de suelo (Pascual y col., 1997a).La germinación de sus conidiasno se reduce hasta que el potencial hídrico alcanza valores muy bajos, permitiendo la entrada de agua hasta niveles de potencial hídrico en el medio de -9.4 (matricial) y 15.7 MPa (osmótico) (Pascual 1997).

De Cal, (1995) demostraron el control de la fusariosis vascular del tomate usando hongos, conocidos productores de enzimas líticos como: *P. oxalicum*, *P.purpurogenumy Aspergillus nidulans*. Esas especies lisaban las hifas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* in vitro y reducían el número de microconidias en el suelo. PO212 fue el más eficaz, reduciendo la gravedad de la enfermedad tanto en suelos no esterilizados (20%) como en suelos estériles (27-50%) (De Cal, 1995). Los tratamientos con PO212no reducían ni las clamidosporas en suelo ni las poblaciones del patógeno en la rizosfera de tomate, por lo que se concluyó que PO212 actuaba por competencia o por inducción de resistencia en el huésped (De Cal . 1995). PO212 también ha sido citado como un agente promotor del crecimiento de plantas de tomate cuando éste es aplicado en semillas (García- Lepe y col 1996; Pascual, 1998; Melgarejo y col., 2005).

Sin embargo en trabajos anteriores Cal (2009), demostró que la gravedad de la enfermedad causada por *F. oxysporum* f. sp. *Melonis* y *F. oxysporum* f. sp. *Niveum* en melón y sandía respectivamente, fue reducida por la aplicación de PO212 en cámaras de cultivo invernadero.

### **2.10.2. Bacterias como agentes de control**

El termino biocontrol es una abreviación de “control biológico”, el uso de éste ha sido probado en varios campos de la biología, pero más notablemente en los campos de entomología y fitopatología (Pal *et al.*, 2006).

En lo que se refiere al uso de microorganismos para el biocontrol de la PCRT, se han utilizado un gran número de cepas de bacterias y hongos que generalmente pertenecen a los géneros: *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*; cepas no patogénicas de *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. de ambos aislados del suelo y de composta (Bolwerk, 2005).

Las bacterias que colonizan la raíz y su zona de influencia son denominadas rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR), desempeñan funciones clave para la planta, tales como control biológico de los patógenos mediante efectos antagonistas o inducción de resistencia sistémica, incremento de la biodisponibilidad de los elementos minerales como la solubilización de fosfatos, fijación de nitrógeno o la fitoestimulación, producción de antibióticos, degradación de fitotóxicos y la producción de sideróforos (Mantilla, 2007).

Las bacterias forman parte de la gran cantidad de microorganismos biológicos que existen como agentes de control de enfermedades fúngicas y bacterianas, tanto en la parte aérea como en la raíz de las plantas hospederas, y están presentes en larizosfera, además favorece en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Mondino y Vero, 2006). A este grupo de bacterias antagonistas de enfermedades se les denomina PGPB (Plant Growth) Promoting Bacteria), es decir aquellas asociadas a las plantas que promueven el crecimiento de ellas. Dentro de los mecanismos para la promoción del crecimiento vegetal podemos encontrar: mecanismos directos, son aquellos en donde los microorganismos actúan sobre la planta, dentro de ellos podemos encontrar a los promotores del crecimiento vegetal (auxinas, giberelinas y citoquininas), y mecanismos indirectos, aquellos en donde el microorganismo es capaz de inhibir diferentes

microorganismo fitopatógenos (hongos y bacterias) que interfieren con el desarrollo de la planta y son neutralizados por diversos mecanismos como: competencia por espacio o nutrientes, producción de metabolitos y antibióticos, secreción de diversas enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular de los microorganismo fitopatógenos, producción de sideróforos (los producidos por estas bacterias tienen mayor afinidad por compuestos de hierro) y el incremento de la capacidad de respuesta sistémica de la planta frente a los microorganismo fitopatógenos.

Dentro de este grupo se puede mencionar a las *Pseudomonas* (aeruginosa, fluorescens, putida), *Bacillus* y *Burkholderia*, que son las más usadas en el control de enfermedades en plantas (Mondino y Vero, 2006; Gato, 2006; Rodríguez et al., 2009).

#### **2.10.2.1. *Bacillus***

Se caracteriza por ser bacterias Gram positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas, son de forma bacilar, aerobias estrictas o anaerobias facultativas, en condiciones estresantes forman una endospora que es termorresistente a los factores físicos (deseccación, radiación, ácidos y desinfectantes químicos), es decir tiene la capacidad de formar esporas que sobreviven y permanecen metabólicamente activas bajo condiciones adversas. (Lisboa, 2003; Chaves, 2007; Rodríguez y Martín, 2009). Muchas especies producen enzimas hidrofílicas extracelulares que descomponen los polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, permitiendo que el organismo emplee estos productos como fuentes de carbono y donadores de electrones. También producen antibióticos (*bacitracina*, *polimixina*, *tirocidina*, *gramicidina* y *circulina*), lipopéptidos que actúan como biosurfactantes y solubilizadores de fosfatos, son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades.

Los mecanismos de acción de *Bacillus* como antagonista de enfermedades fúngicas y bacterianas son: competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, inducción de resistencia y promotores del crecimiento de las plantas (Chaves, 2007; Rodríguez y Martín, 2009).

### **2.10.2.2. *Pseudomonas***

Las rizobacterias del género *Pseudomonas* han sido estudiadas como importantes agentes de biocontrol por su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos fitopatógenos, como bacterias, hongos, nematodos y virus, los cuales pueden llegar a reducir considerablemente la producción de cultivos. Estos organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos como: sideróforos, ácido cianhídrico y antibiótico. Además, se ha comprobado que inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos microorganismos fitopatógenos del suelo (Chaves, 2007). *P. fluorescens* es un bacilo Gram negativo que se encuentra como saprófito en el suelo y es ampliamente conocido por ser una PGPR. Abunda en la superficie de las raíces, y es versátil en su metabolismo, además puede utilizar varios sustratos producidos por ellas mismas, y no establecen una relación simbiótica con la planta. Entre sus mecanismos de acción se encuentran el aumento de la toma de agua y nutrientes por la planta, la solubilización de fosfatos, la producción de reguladores del crecimiento vegetal y el control biológico de microorganismos fitopatógenos, la producción.

### **2.10.2.3. *Burkholderia***

Está compuesto por: bacilos rectos; Gram negativos; oxidasa y catalasa positivos; con una proporción de G+C que oscila entre el 59 y el 69,5 %. Son bacterias móviles con un flagelo polar único o bien con un penacho de flagelos polares según las especies. También son mesófilos y no esporulados. Su metabolismo es aerobio y muy versátil. Como sustancia de reserva utilizan el polihidroxibutirato (Santos et al., 2004; Parra, 2009).

*Burkholderia cepacia* fue descubierta por Walter Burkholder en 1949 en las catáfilas de cebolla y en su epidermis radicular. La identificación y clasificación de la *B. cepacia* es extremadamente complicada; se conoce ahora como un “complejo *Burkholderia cepacia*” y está compuesto por al menos 9 especies distintas que constituyen los denominados “genomovars” o genotipos: *B. cepacia*, *B. multivorans*, *B. cenocepacia*, *B. vietnamienses*, *B. dolosa*, *B. ambifaria*, *B. anthina* y *B. pyrrocinia*; con la excepción de *B. mallei* y *B. pseudomallei*, las que son patógenas de animales y humanos. El género *Burkholderia* ecológicamente es saprófito, es decir que interviene en el reciclaje de

materia orgánica, además es uno de los géneros bacterianos utilizados para biorremediación de herbicidas y plaguicidas recalcitrantes, como agentes de control biológico de hongos fitopatógenos y para promover el crecimiento de las plantas (Parra, 2009).

### **2.10.3. Mecanismos de acción de los antagonistas**

Los mecanismos de acción por medio de los cuales los antagonistas afectan a los fitopatógenos son: la competencia, antibiosis, micoparasitismo e inducción de mecanismos de resistencia. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, y aunque alguno de ellos puede actuar como mecanismo principal, también pueden actuar en conjunto (Michel-Aceves 2001).

#### **2.10.3.1. Competencia**

La competencia se da principalmente por nutrientes y espacio, de ésta manera la causa más común de la muerte de un microorganismo es por inanición (causa más común de muerte para microorganismos), puesto que requieren de nutrientes exógenos, como carbono y hierro para germinar, penetrar e infectar el tejido. Si los sitios de infección están ocupados por el organismo benéfico el hongo fitopatógeno tendrá dificultades para prosperar (Michel, 2006).

La competencia entre agentes de control biológico y el fitopatógeno puede resultar en control biológico por aniquilación de la población perjudicial, y que puede favorecer a *Trichoderma spp.*, debido a su alta frecuencia de crecimiento y desarrollo (Cueva, 2007).

#### **2.10.3.2. Antibiosis**

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o destruye a un organismo, a través de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y de enzimas hidrolíticas, las cuales disuelven o dañan polímeros estructurales de la pared celular en la mayoría de los hongos fitopatógenos; tales como quitina y  $\beta$ -1-3-glucanos, produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo y diferenciación (Michel, 2006).

### **2.10.3.3. *Micoparasitismo***

Este es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas: Crecimiento quimiotrófico donde *Trichoderma* puede detectar a distancia a sus posibles hospedantes y se considera que existe una alta especificidad del antagonista por su sustrato Adhesión y enrollamiento: Ocurre por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno y Actividad lítica: Producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* (Martínez *et al.*, 2013).

En el parasitismo a nivel microscópico no todas estas interacciones son siempre observadas, pues al parecer dependen del aislamiento de *Trichoderma*, del patógeno y de las condiciones del ambiente (Ávila, 2010).

### **2.10.3.4. *Inducción de mecanismos de resistencia***

Muchos microorganismos de la rizósfera pueden inducir una respuesta sistémica en las plantas, resultando en la activación de mecanismos de defensa de las plantas, la resistencia sistémica inducida no confiere a la planta una protección completa, pero si la puede proteger de varios tipos de fitopatógenos, incluidos los patógenos de raíz (Raaijmakers *et al.*, 2008).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Ubicación general**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Vegetal del Centro de Biotecnología de la Universidad Nacional de Loja y la colecta de las muestras de suelo se realizó en tres sectores: Saraguro (Cochapamba), Chuquiribamba (Carmelo) y Loja Alumbre), ya que son sectores donde se desarrolla el cultivo de Babaco.

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

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

El Laboratorio de Biotecnología se encuentra ubicado en la parroquia San Sebastián, al sur de la ciudad y provincia de Loja, geográficamente se encuentra en las siguientes coordenadas: Latitud  $04^{\circ} 08' 00''$  S. Longitud  $79^{\circ} 12' 00''$  W Altitud de 2.134 msnm (CINFA, 2012).

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

##### **3.2.3. Cantón Loja**

Se encuentra ubicado en la provincia de Loja. Entre las coordenadas geográficas  $03^{\circ} 54' 03''$  hasta los  $04^{\circ} 01' 58''$  de latitud sur y  $79^{\circ} 10' 03''$  hasta los  $79^{\circ} 15' 00''$  de longitud oeste, con una altitud que oscila entre 2050 a 2445 msnm (CINFA, 2012).

##### **3.2.4. Parroquia Chuquiribamba (Sector el Carmelo)**

Se encuentra ubicado en la provincia de Loja. Entre las coordenadas geográficas  $3^{\circ} 50' 36,94''$  de latitud sur y de  $79^{\circ} 20' 38,95''$  longitud oeste, con una altitud que oscila entre 2920 a 2150 m.s.n.m.

### **3.2.5. Cantón Saraguro**

El cantón Saraguro se encuentra ubicada al noreste de la provincia de Loja, a 64 km del norte de la ciudad de Loja. Entre las coordenadas 03° 31' 38" a 04° 30' 20" de latitud sur y 79° 43' 41" a 80° 60' 30" de longitud sur, a una altitud de 2000 a 3 500 m.s.n.m. (CINFA, 2012).

### **3.2.6. Comunidad Cochapamba**

Se encuentra ubicada a 9,86 km de la Cabecera Parroquial de Tenta perteneciente a la cabecera cantonal Saraguro. Entre las coordenadas 02°47'41.10" de latitud sur y 79°25'39.10" de longitud oeste, a una altitud de 2 000 a 3 500 msnm (CINFA, 2012).

## **3.3. Clima y ecología**

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

## **3.4. Materiales**

### **3.4.1. Material de Laboratorio**

Agua destilada, Hipoclorito de sodio, tubos de ensayo, estufa, baño maría, matraz, varilla de agitación, espátula, cinta masking, algodón, alcohol potable, alcohol industrial, asa microbiológica, balanza analítica, vortex, gradillas para tubos de ensayo, matraz de Erlenmeyer, mango de bisturí, vasos de precipitación, guantes quirúrgicos, mascarillas, papel de filtro, gasa, bisturí, papel aluminio, pipetas, cámara de flujo laminar, mecheros, probetas, autoclave, embudos, microscópicos, equipo personal de laboratorio, cubre y porta objetos, marcadores, Incubadora, tubos eppendoff, vasos plásticos de 1000 ml, vasos plásticos de 250 ml, guantes plásticos, fundas plásticas, parafina, etiquetas, marcadores, navajas, tijeras, pipetas, probetas y cámara Neubauer.

### 3.4.2. Materiales de Campo

GPS, Libreta, Cámara, Palas, Fundas plásticas y Tierra.

### 3.4.3. Materiales de escritorio

Libreta de campo, registros, documentos digitales y Computadora.

### 3.4.4. Medios de Cultivos

Los medios de cultivos utilizados para los análisis en laboratorio fueron:

- Medio Mac-Conkey Agar
- Medio KIA (Kliger Iron Agar)
- Medio AN (Agar Nutriente)
- Medios PDA (Papa Dextrosa Agar)
- Medio PGA (Peptona, Glucosa, Agar)
- Agar base – Rosa de Bengala (Difco) (ARB)

### 3.4.5. Materiales Biológicos

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

**Cuadro 1.** Identificación morfológica y molecularmente de aislados de *Fusarium oxysporum*

Código de Aislado	Pares de bases	Identidad (Blastn)	Especie
AML2	360	99 %	<i>Fusarium oxysporum</i>
QUI2	366	100 %	<i>Fusarium oxysporum</i>

**Leyenda:** AML2 (Amable Maria) y QUI2 (Quishquinchir)

### 3.5. Metodología

#### 3.5.1. Metodología del Primer Objetivo “Caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizósfera del Babaco”

##### 3.5.1.1. Colecta de muestra

Las muestras se colectaron durante los meses de marzo-abril del 2015 en las zonas de mayor producción de Babaco en la provincia de Loja (Figura 1). Cada zona se georeferenció con la utilización del Sistema de Posicionamiento Global (GPS). Las muestras se tomaron en los cantones: Loja sector el Alumbre, parroquia Chuquiribamba sector el Carmelo y en el cantón Saraguro, sector Cochapamba. Luego se procedió a recolectar nueve muestras de suelo de un lote seleccionado al azar en cada uno de los lugares descritos, las muestras fueron recolectadas usando un barreno y sacando las muestras de suelo hasta una profundidad de 15 a 20 cm. ya que en esta zona existe mayor presencia de microorganismos, las muestras fueron tomadas en forma de zic-zac, dentro del lote seleccionado las muestras fueron conservadas a -4°C hasta realizar el aislamiento de los microorganismos objeto de estudio.

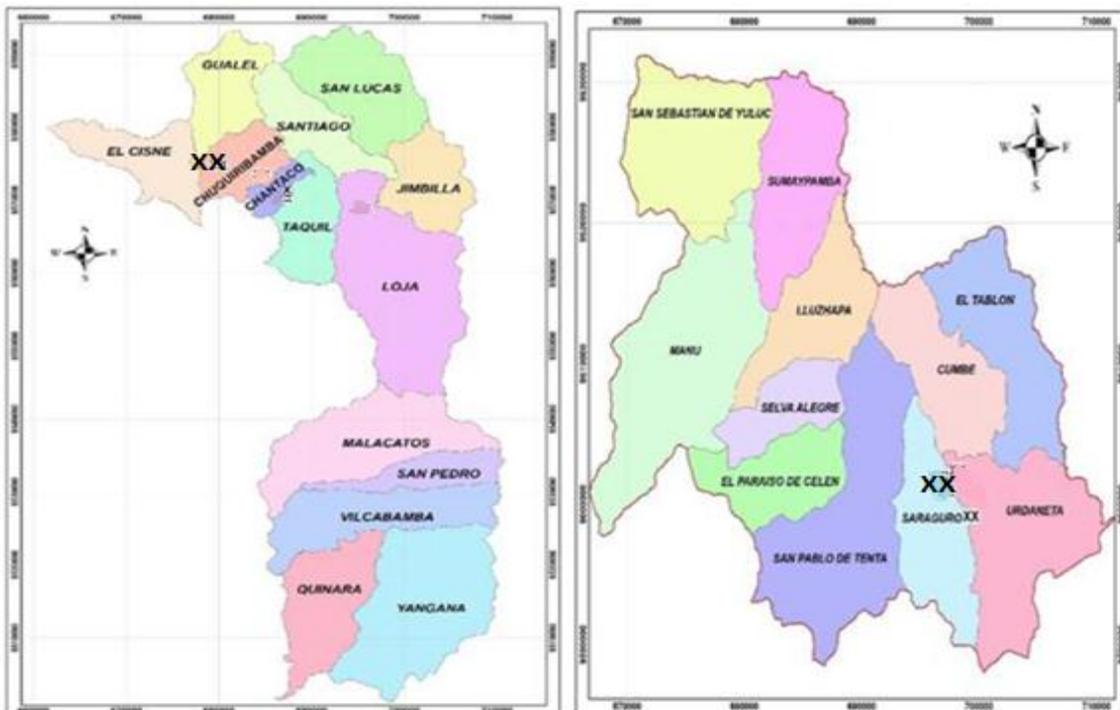


Figura 1. Mapa del cantón Loja y de Saraguro (2012).

**Cuadro 2.** Origen de las muestras de suelos rizosféricos del Babaco para el aislamiento de microorganismos fúngicos y bacterianos en los cantones de Loja y Saraguro.

Cantón	Localidad	Código	Coordenadas Geográficas		
			Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud
Saraguro	Cochapamba	COC1	02°47'41.10" S	79° 25' 39.10"	2694
		COC2	02°47'41.10" S	79° 25' 39.10"	2694
		COC3	02°47'41.10" S	79° 25' 39.10"	2694
		COC4	02°47'41.10" S	79° 25' 39.10"	2694
		COC5	02°47'41.10" S	79° 25'39.10"	2694
Loja	Carmelo	ECM1	3° 50' 36,94" S	79° 20'38.95"	2474
		ECM2	3° 50' 36,94" S	79° 20' 38.95"	2474
	Alumbre	AL1	3° 56' 88,9" S	79°12' 68.50"	2072
		AL2	3° 56' 85,9" S	79°12' 68.50"	2072

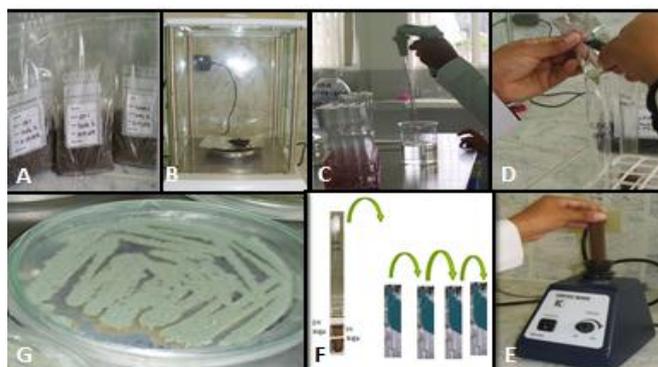
**Leyenda:** Cochapamba (COC), ECM (Carmelo), AL (Alumbre)

### 3.5.1.2. Aislamiento de microorganismos

Para el aislamiento de los hongos antagonistas, se realizó la técnica de diluciones seriadas, la cual consistió en diluir 1 g de suelo en un tubo de ensayo de 20 cm con 9 mL de agua destilada estéril, a continuación, se agitó con el vórtex durante cinco minutos. De la primera dilución se tomó 1 mL y se depositó en un tubo de ensayo con tapa rosca que contenía 9 mL de agua destilada estéril, se agitó durante un minuto aproximadamente en un agitador vórtex. De esta suspensión del segundo tubo de ensayo, se realiza una serie de diluciones hasta llegar a la dilución cuatro y cinco: De ahí se tomó con una micropipeta 0.3 mL y se colocaron en una caja Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) acidificado con ácido láctico al 85%, enseguida se incubó durante cuatro días a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . (Figura 2).

Para el aislamiento en caso de las bacterias se realizó la misma metodología descrita anteriormente, con la única diferencia que el medio de cultivo ideal para bacterias del suelo es Agar nutriente (AN), se utilizó de acuerdo con las especificaciones del fabricante (28g por 1000 mL de agua destilada estéril). y se las incubaron durante tres días a una temperatura  $30^\circ\text{C}$ ., cabe recalcar que el grado de temperatura utilizada es

diferente tanto para bacterias y hongos debido a que cada uno de estos microorganismos se desarrollan a cierta temperatura.



**Figura 2.** Procedimiento para diluciones seriadas **a)** muestras de suelo, **b)** pesar el suelo, **c)** colocar 9 mL de agua en el tubo, **d)** gramo de suelo en el tubo, **e)** vortex por 5 min, **f)** diluciones de suelos, **g)** colonia de hongo en medio PDA (papa dextrosa agar).

### 3.5.1.3. Caracterización morfológica de microorganismos antagonistas

La caracterización morfológica y cultural de los aislados fúngicos se realizó mediante las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1987); quienes detallan análisis como: la forma de micelio (FDM), color de la colonia (CDC) y género de especies. Se evidenció que crecieron varias colonias de hongos, todos con características morfológicas propias del género *Penicillium sp.*, como es la coloración verde magenta (Druzhinina *et al.*, 2006).

Además, se realizó el conteo de conidios por cada uno de los aislados, llevándose a cabo mediante el método de conteo por cuadrantes en cámara Neubauer (Depth, Alemania) con un aumento de 40X. El cálculo de la concentración final de unidades formadoras de colonias (UFC) se utilizó la formula descrita por (French y Herbert 1980) y citado por (Rojas-Triviño, 2011).

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

Para la identificación morfológica y bioquímica de bacterias se utilizó 13 aislados que fueron seleccionados por tener características diferentes.

Las colonias obtenidas de la resiembra en medio de cultivo Agar Nutriente (AN), se realizó las pruebas morfológicas y bioquímicas para su identificación tal como describe (Holt *et al.* 2000), se clasificaron las bacterias de acuerdo a las diferentes pruebas que se realizó tanto en medios de cultivos, prueba enzimática (catalasa) y prueba química como tinción gram: en la primera prueba de medio de cultivo se realizó crecimiento en medio kligler, donde es importante establecer la relación de la dosis que se va a necesitar según la dosis recomendada que es 52 gr. en 1000 L., disolver en agua hasta que hierva, esterilizar en la autoclave, colocar en los tubos y dentro de la cámara laminar sembrar en los tubos en forma de estrías, crecimiento de bacteria en medio mcConkey, el soluto se disuelve en agua destilada, esterilizar, travasar en cajas Petri para posteriormente sembrar en forma de estrías. El crecimiento en agar inclinado, se prepara el medio, esterilizar, colocar en los tubos y sembrar en línea recta en cámara de flujo laminar para caracterizar a las 24 horas. La prueba enzimática de catalasa primeramente se siembra las bacterias en medio Agar Nutriente (AN) por un período de 24 horas, debidamente identificados con el nombre de cada una de las muestras, en la cámara de flujo laminar se saca con el asa una muestra de la bacteria, la cual va a ser frotada en el porta objetos, se añade con la micropipeta 50 ml de agua oxigenada y esperar hasta que presente reacción. Finalmente la prueba química de tinción gram, se realiza el frotis con la técnica realizada en esta guía y fíjelo al calor, vierta sobre el frotis cristal y déjelo actuar por 1 minuto, lave con agua de la llave y escurra el exceso, cubra ahora con solución decolorante (alcohol-acetona), por 30 minutos, lave con agua de la llave y escurra el exceso, cubra ahora con colorante de contraste (safranina o fuschina), y deje actuar por 45 segundos, lave con agua de la llave y escurra el exceso, permita que la preparación teñida se seque al aire, dejando la lámina en posición inclinada y por último observe al microscopio.

Finalmente, la caracterización morfológica y bioquímica se realizó mediante las claves extraídas de los manuales de (Bergey's, 2000).

### **3.5.2. Metodología del Segundo Objetivo “Determinar la presencia de posibles microorganismos (hongos y bacterias) con capacidad antagonista de la Marchitez Vasculare del Babaco”**

#### **3.5.2.1. Reactivación de los hongos y bacterias fitopatógenos**

A partir de los aislados obtenidos se cultivaron colonias puras de *Penicillium sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Bacillus sp.*, en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) y Agar Nutriente (AN), Las estructuras del patógeno *Fusarium oxysporum* fueron transferidas para inocular en cajas de Petri que contenían PDA, a continuación, cada caja fue rotulada, registrada y sellada con papel de parafilm en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente almacenado a 28°C por dos semanas en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias.

Luego estos aislados fueron utilizados para realizar las pruebas de antagonismo mediante la técnica de enfrentamiento dual.

#### **3.5.2.2. Pruebas cualitativas de antagonismo hongo – hongo por el método del cultivo dual**

Las pruebas de enfrentamiento se realizaron empleando la técnica de cultivo dual en cajas de Petri, que contenían 20 mL de medio de cultivo PDA. Esta prueba de antagonismo hongo-hongo consistió en la siembra de hongo patógeno (*Fusarium oxysporum*) y antagonista (*Penicillium sp.*), en estas cajas se depositaron en un extremo discos de micelio de 5 mm de diámetro de las cepas de *Fusarium oxysporum.*, y al otro extremo se colocaron discos de micelio de 5 mm de diámetro de *Penicillium sp.*, tanto las cepas y el aislado estaban en crecimiento activo. Una vez colocados ambos hongos en las cajas se incubaron a  $28 \pm 1$  °C y se observaron cada 24 h.

El tratamiento testigo consistió en sembrar en el centro de la caja un disco de 5 mm de cada cepa de *Fusarium oxysporum* en medio PDA.

Cada tratamiento incluido los tratamientos testigos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con diez repeticiones. Finalmente se rotularon cuidadosamente cada una de las cajas, se sellaron con papel parafilm y se incubaron a  $28 \pm 1$  °C. Tanto el

crecimiento del antagonista como el crecimiento del patógeno fueron registrados cada 24 horas con un calibrador digital tipo pie de rey y los valores se expresaron en milímetros. (Anexo 2). La toma de datos finalizó hasta que el patógeno colonizó toda la caja en el tratamiento control. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) usando la fórmula:

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

Donde **R1** es el radio del patógeno testigo y **R2** es el radio del patógeno con el antagonista.

### 3.5.2.3. Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Bacteria

Para la prueba del enfrentamiento dual hongo-bacteria se utilizó cepas de *Fusarium oxysporum* como patógeno y *Bacillus sp*, como antagonista. En primer lugar, se repicó el aislado de la bacteria en medio de cultivo agar nutriente (AN), con el objetivo de saber si tenía un crecimiento óptimo para realizar las pruebas del enfrentamiento dual. Seguidamente, con un hisopo estéril, se realizó el incremento del inóculo bacteriano en cajas de Petri con medio de cultivo AN. Posteriormente, en el centro de la caja se procedió a colocar un disco de 5 mm de cada una de las cepas fúngicas de *Fusarium oxysporum* (AML2 y QUI2). El tratamiento testigo consistió en sembrar un disco de 5 mm de cada una cepa de *Fusarium oxysporum* en medio AN.

Cada tratamiento incluido los tratamientos testigos se realizaron bajo un diseño completamente al azar con 10 repeticiones. Finalmente se rotularon cuidadosamente cada una de las cajas, se sellaron con papel parafilm y se incubaron a  $28 \pm 1$  °C. El crecimiento del patógeno fue registrado cada 24 horas con un calibrador digital tipo pie de rey y los valores se expresaron en milímetros (Anexo 3). La toma de datos finalizó hasta que el patógeno colonizó toda la caja en el tratamiento control. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) usando la fórmula:

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

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

#### IV. RESULTADOS

##### 4.1. Caracterización de las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizósfera del Babaco.

###### 4.1.1. Aislamiento y caracterización morfológica de microorganismos antagonistas.

La forma de micelios de los hongos antagonistas, inicialmente presentó colonias planas o estriadas y finalmente a los últimos días de observación presento una forma globosa, el color de la colonia de cada uno de los aislados fue claro-brillante o verde magenta. El micelio es inconspicuo, de color blanco o amarillo claro en las áreas algodonosas, pero la superficie de crecimiento fundamental está coloreada de verde. El reverso de la colonia es amarillo claro, marrón o naranja. Según el análisis estadístico el aislado procedente del cantón Saraguro obtuvo un alto porcentaje de cantidad de conidios, como se observa en el siguiente cuadro.

**Cuadro 3.** Características morfo-culturales de aislados fúngicos posibles antagonistas de *Fusarium oxysporum.*, procedentes del suelo rizosférico del Babaco.

Aislado	Forma de micelio	Color de colonia	Género	Número de conidios
COC1	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	2,5702x10 <sup>6</sup>
COC2	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	5,4096x 10 <sup>6</sup>
COC3	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	4,4064x 10 <sup>6</sup>
COC4	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	4,8740x 10 <sup>6</sup>
COC5	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	4,1950x10 <sup>6</sup>
AL1	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	4,3744x10 <sup>6</sup>
AL2	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	2,4846x10 <sup>6</sup>
ECM1	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	4,1520x 10 <sup>6</sup>
ECM2	Globosa	Verde magenta	<i>Penicillium sp</i>	4,3210x10 <sup>6</sup>

**Leyenda:** Codificación de los aislados de COC: (Cochapamba) ECM: (Carmelo) y AL: (Alumbre).

La identificación morfológica y bioquímica de cada una de las muestras realizadas en los aislados de bacterias revelaron lo siguiente.

En las pruebas de medios de cultivo, el crecimiento en medio Kligler, representó un 100 % de crecimiento para cada una de las pruebas realizadas, en medio McConkey solo el aislado COC3 (2) tuvo crecimiento negativo, crecimiento en medio agar nutriente se evaluó tres parámetros como la forma, elevación y borde de la colonia, obteniendo formas filamentosas, irregular, circular y puntiforme, elevación convexa baja, plana o aplastada y elevada y finalmente presentaron bordes enteros o continuos y ondulados. En medio LPGA y caldo nutriente donde presentaron un crecimiento de los 100% positivos a diferencia de los aislados que se sembraron en medio agar nutriente inclinado se obtuvieron características barbaudas y difusas en algunas cepas. La prueba enzimática (catalasa), todos los aislados presentaron crecimiento positivo y la prueba química (Tinción gram), se obtuvo reacción positiva en cada uno de los aislados y 12 muestras mostraron forma de *coccus sp* y el aislado AL2 (2) mostró forma de *Bacillus sp*, (Cuadro 4 y 5).

**Cuadro 4.** Pruebas realizadas en diferentes medios de cultivos, prueba enzimática y prueba química (tinción gram).

MUESTRAS	MEDIOS CULTIVOS								PRUEBA ENZIMÁTICA	PRUEBA QUÍMICA		Bacterias
	KLIGER	MacConkey	LPGA	Agar inclinado	Caldo nutriente (CN)	Agar Nutritivo (AN)			Catalasa	Tinción gram		
						Forma de la colonia	Elevación	Borde		Reacción	Forma	
COC 1 (2)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Cocus	
COC2 (1)	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	Cocus	
COC3(2)	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	Cocus	
COC3 (1)	+	-	+	++	+	++	++	++	+	+	Cocus	
COC 4 (1)	+	+	+	++	+	++	+	++	+	+	Cocus	
COC 4 (2)	+	+	+	+	+	+++	++	++	+	+	Cocus	
Al2 (3)	+	+	+	++	+	+	++	+	+	+	Cocus	
Al 2 (1)	+	+	+	++	+	++++	+	++	+	+	Cocus	
Al2 (2)	+	+	+	+	+	+	+	++	+	++	Bacillus	
Al1 (1)	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	Cocus	
Ecm (1)	+	+	+	++	+	+	+++	++	+	+	Cocus	
ECM 2 (1)	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	Cocus	
ECM 2 (2)	+	+	+	++	+	+	+	++	+	+	Cocus	

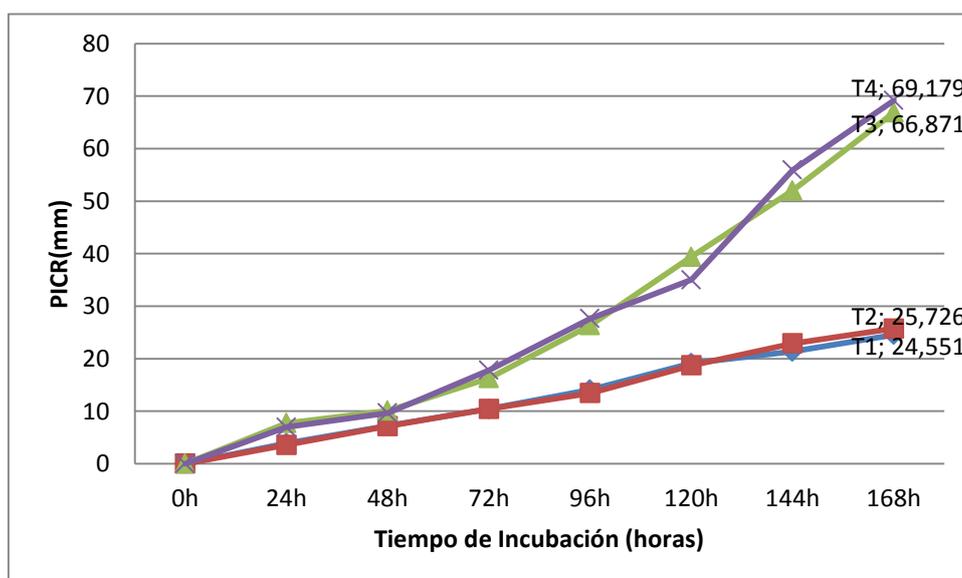
**Leyenda:** Abreviaturas de las localidades de aislamientos: Cochapamba COC1, CO2, COC3, COC4, COC5, Alumbre: AL1 y AL2 y El Carmelo: ECM 1y ECM2. pruebas en medios: Kliger (+) positivo, crecimiento en McConkey: (+) positivo, (-) negativo. En medio LPGA (Levadura Papa Glucosa): (+) Positivo, Agar inclinado: (+) Barbado (++) Difuso (+++). Caldo nutriente: (+) positivo, agar nutriente a/ Forma de la colonia (+) Filamentosa (++) Irregular (+++) circular (++++) Puntiforme b/ Elevación de la colonia (+)convexa baja (++) plana o aplastada (+++) Elevada c/ Bordes de la colonia (+) entero o continuo (++) ondulado prueba de Calatasa (+) positivo, formación de gas, Tinción Gram (+) Coco (++) Bacilo.

## 4.2. Determinación de la Presencia de Posibles Microorganismos (hongos y bacterias) con Capacidad Antagonista de la Marchitez Vascular del Babaco.

### 4.1.2. Pruebas cualitativas de antagonismo hongo-hongo por el método del cultivo dual.

La cinética del porcentaje de crecimiento radial (PICR), al final del periodo de evaluación, se observa que el tratamiento T1 (*Fusarium oxysporum* ALM2 + *Penicillium* sp, se obtiene un valor 24,55%; frente al testigo T3 *Fusarium oxysporum* aislado ALM2), con un valor de 66,87%. Claramente se observa un porcentaje de reducción de *Fusarium* del 42,32%. Mientras que el tratamiento T2 *Fusarium oxysporum* aislado QUI2 + *Penicillium* sp, se obtiene un valor de 25,72; frente al testigo T4 (*Fusarium oxysporum* aislado QUI2) con un valor de 69,17%; donde se observa un porcentaje de reducción de *Fusarium oxysporum* del 43,45%.

Los resultados obtenidos mediante la evaluación de la cinética de inhibición del crecimiento radial de los aislados de *Fusarium oxysporum* aislados ALM2 y QUI2 frente a *Penicillium* sp mostraron diferencias significativas, según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) desde las 24 hasta las 168 horas de incubación.

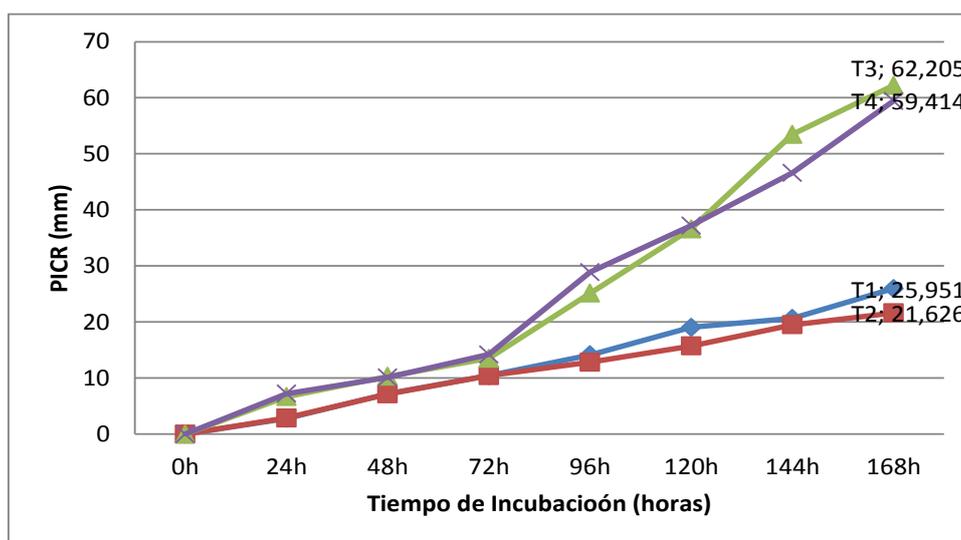


**Figura 3.** Crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* frente al aislado seleccionado género *Penicillium* sp utilizadas en ensayos durante 168 horas de evaluación. **Leyenda:** T1: *Fusarium oxysporum* ALM2 + *Penicillium* sp T2: *Fusarium oxysporum* QUI2 + *Penicillium* sp T3: *Fusarium oxysporum* ALM2 T4: *Fusarium oxysporum* QUI2.

#### 4.1.3. Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Bacteria por método de cultivo dual.

De los 13 aislados bacterianos posibles antagonistas de *Fusarium oxysporum*, causante de la MVB, se seleccionó el aislado AL2, por cumplir las características deseadas, en base de los resultados obtenidos de las pruebas macro, microscópicas y bioquímicas podemos afirmar la presencia del género *Bacillus sp*, la misma que es utilizado como agente antagonista frente a *Fusarium oxysporum*,

La cinética del porcentaje de crecimiento radial (PICR), al final del periodo de evaluación, se observa que el tratamiento T1 (*Fusarium oxysporum* ALM2 + *Bacillus sp*) se obtiene un valor 25,95%; frente al testigo T3 *Fusarium* ALM2), con un valor de 62,20%. Claramente se observa un porcentaje de reducción de *Fusarium oxysporum* del 36,25%. Mientras que el tratamiento T2 (*Fusarium oxysporum* QUI2 + *Bacillus sp*) se obtiene un valor de 21,62; frente al testigo T4 (*Fusarium oxysporum* QUI2) con un valor de 59,41%; donde se observa un porcentaje de reducción de *Fusarium* del 37,79%. Los resultados obtenidos mediante la evaluación de la cinética de la inhibición del crecimiento radial (PICR), en cultivos duales de *Fusarium oxysporum oxysporum* ALM2 y QUI2 frente a *Bacillus sp* mostraron diferencias significativas, según la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ) desde las 24 hasta las 168 horas de incubación.



**Figura 4.** Crecimiento radial en cultivos duales de *Fusarium oxysporum* (AML2), con género *Bacillus sp* (COC2), durante 168 horas de evaluación. **Leyenda:** T1: *Fusarium oxysporum* ALM2 + *Bacillus* AL2 T2: *Fusarium oxysporum* QUI2 + *Bacillus sp* T3: *Fusarium oxysporum* ALM2 T4: *Fusarium oxysporum* QUI2

## V. DISCUSION

### 5.1. Caracterización de las Comunidades Fúngicas y Bacterianas de la Rizósfera del Babaco

#### 5.1.1. Aislamiento y caracterización morfológica de microorganismos

##### Antagonistas

En las muestras de suelos de la rizósfera del Babaco colectados en los cantones de Loja y Saraguro está presente en forma natural los microorganismos *Pencillium sp*, *Bacillus sp* y *Cocus sp*, observándose que no existe una relación entre el género y el origen en donde están presentes, debido que las condiciones ambientales favorecen que estos microorganismos se desarrollen, lo cual coincide con lo reportado por Mar *et al.*, (2014), quienes menciona que se pueden obtener cepas fúngicas y bacterianas tanto en praderas, bosques, desiertos, en suelos de diferentes zonas climáticas, en materia vegetal muerta y raíces.

Además en las zonas de estudio existe mucha humedad y es considerada como una variable que incide mucho para el desarrollo de la marchitez en diferentes cultivos lo que concuerda con Naseri (2014), quien afirma que la humedad en los suelos ocasiona la destrucción de las plantas y como consecuencia incrementa la incidencia de la enfermedad. Es importante recalcar que en los sectores de estudio la calidad de los suelos esta fuertemente influenciada por los procesos microbianos que ocurren en los mismos, lo cual coincide con lo expresado por Martínez-Álvarez y Abril (2003), quienes menciona que una gran cantidad de microorganismos se encuentran interaccionando activamente junto con los demás componentes del ecosistema de la rizósfera lo cual permite mejorar la calidad de los suelos.

Dentro de los resultados obtenidos sobre la caracterización de los diferentes aislados fúngicos se observó que todas las muestras colectadas presentaron un micelio de forma globosa y color verde magenta lo que coincide con Campoverde M. y González F. (2012), quien manifiesta que las colonias de *Penicillium sp*, se observa en tonalidades de verde, azul verde o verde marrón y con una densa producción de conidios.

La caracterización del aislado AL2, en la prueba bioquímica de tinción gram, se observó la forma de bacilo y resaltaron características como forma de la colonia,

filamentosa, una elevación convexa baja, lo cual coincide con lo reportado por Triviño (2011), quien menciona que las colonias bacterianas son de tamaños medianas a grandes, convexas bajas, blanquecinas de forma fusiforme o irregular y bordes lobulados, también se suele observar una protuberancia en el centro de las colonias lo cual le da una apariencia de huevo estrellado. Los aislados restantes presentaron forma de coco, con características de forma circular, filamentosa y puntiforme, con una elevación plana o aplastada y bordes entero o continuo, lo cual concuerda con lo que manifiesta López y Torres, (2006).

## **5.2. Determinar la Presencia de Posibles Microorganismos (Hongos y Bacterias) con Capacidad Antagonistas de la Marchitez Vascular del Babaco.**

### **5.2.1. Pruebas cualitativas del antagonismo hongo-hongo por el método del cultivo dual**

En los suelos de los sectores estudiados se identificó la presencia del género *Penicillium sp*, lo cual concuerda con Suárez-Estrella (2007), quien manifiesta que en aislados de suelos existen microorganismos antagonistas como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* y *Gliocladium*, *Laetisaria*, *Sporidesmium* y *Taromyces*. En los resultados obtenidos se observa que los dos aislados de *Fusarium oxysporum* AL2 y QUI2 en solitario, su crecimiento sobresale desde el primer día de evaluación, esto concuerda con Garcés *et al.* (2001), afirman que *F. oxysporum* se caracteriza por presentar colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa dextrosa agar (PDA). Además Dubey *et al.* (2010) y López (2004), muestra que *F. oxysporum* posee una rápida TCR de crecimiento de colonias.

Para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento radial se consideró tomar datos cada 24 horas, esto coincide con lo expuesto por Agrios (2005), quien manifiesta que el crecimiento diario del hongo es un parámetro muy importante a la hora de identificar los aislados y determinar la variabilidad de especies, además es importante recalcar que son pocas las evidencias científicas del uso de la especie de *Penicillium sp* en el control biológico de la fusariosis en diversos cultivos.

El aislado de *Penicillium sp*, logro inhibir el crecimiento del aislado de *Fusarium oxysporum* ALM2 y QUI2, con un porcentaje reducción del 42,32% y 43,45%, siendo

estos valores superiores a los obtenidos por Cal, (1995), quien expuso que la cepa PO212 de *Penicillium oxalicum*, fue el más eficaz, reduciendo la gravedad de la enfermedad tanto en suelos no esterilizados (20%) como en suelos estériles (27-50%), en su estudio sobre la eficacia de la cepa PO212 como agente biocontrolador logro demostrar la reducción de *fusariosis* vascular del tomate usando hongos, conocidos productores de enzimas líticas como: *P. oxalicum*, *P. purpurogenum* y *Aspergillus nidulans*. Esas especies degradan las hifas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *in vitro* y reducían el número de microconidias en el suelo.

### **5.2.2. Pruebas cualitativas de antagonismo hongo – bacteria**

En los sectores donde se realizó el muestreo de suelos, se identificó la presencia de microorganismos bacterianos perteneciente al género *Bacillus sp*, lo que concuerda con Prashar *et al.* (2014) y Saharan y Nehra (2011), quienes manifiestan que los géneros bacterianos más comunes que han sido reportados en la rizósfera de diferentes plantas son: *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Rhizobia*, *Mycobacterium*, *Flavobacter*, *Burkholderia*, *Serratia*, *Cellulomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Agrobacterium*. Chaves (2007), expresa que *Bacillus sp*, están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son fácilmente aisladas desde el suelo y restos de materia orgánica.

En este ensayo *Bacillus sp*, tuvo efecto biocontrolador bajo condiciones controladas frente a dos aislados de *Fusarium sp*, debido a que este genero produce antibióticos esto concuerda con estudios realizados Gutiérrez (2006), quien afirma que las especies del género *Bacillus sp*, presentan la capacidad producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngicas que impiden el establecimiento de patógenos vegetales, así mismo Chaves (2007), expresa que *Bacillus* son bacterias buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades. Tal como lo describe Orbera *et al* (2014), *Bacillus* es una especie que comúnmente se presenta en los suelos, además, esta bacteria ya fue estudiada, aislada e investigada por su producción de antibióticos y la capacidad de inhibir un gran número de fitopatógenos.

En los resultados obtenidos sobre la prueba de enfrentamiento dual, el aislado de *Bacillus sp*, logro inhibir el crecimiento de los aislados de *Fusarium oxysporum* aislados AL2 y QUI2, con un porcentaje de reducción de 36,25% y 37,79% siendo estos valores ligeramente inferiores a los obtenidos por Cristian *et al.* (2011), quien demostró que aislamientos de *Bacillus sp.*, presentaron actividad antagónica in vitro frente a *Fusarium sp.*, con un porcentaje de inhibición mayor al 45%, mediada por la secreción de sustancias antifúngicas propias del género, además este mismo género se utilizó en condiciones de invernadero donde presentaron efecto al disminuir un 50% la severidad de la marchitez vascular en las plántulas de romero.

Constanza *et al.* (2011), quien manifiesta que realizaron experimentos para seleccionar y observar el efecto de biocontrolador de *Bacillus sp*, frente a *Fusarium sp*, causante del marchitamiento vascular en plantas de cultivo de Tomillo (*Thymus vulgaris L.*) en condiciones de laboratorio e invernadero obteniendo que la cepa B1 Y B2 presentaron halos de inhibición del crecimiento del hongo tanto hacia lo ancho como a lo largo de la colonia.

## VI. CONCLUSIONES

- En los suelos rizosféricos del cultivo de babaco, de la provincia de Loja se encontraron microorganismos fúngicos y bacterianos como *Penicillium sp*, *Bacillum sp* y *Cocus sp*.
- El enfrentamiento dual de microorganismos de *Penicillium sp*, frente a *Fusarium oxyporum* aislado *QUI2*, en condiciones de laboratorio, este antagonista logró inhibir el 43,45%, del crecimiento del patógeno, mientras que en el aislado ALM2, logró disminuir un 42,32%.
- *Bacillus sp*, inhibió el crecimiento de *Fusarium oxyporum* aislado *QUI2*, donde se observa que a partir del quinto día de evaluación se da un mayor porcentaje de reducción del crecimiento.

## **VII. RECOMENDACIONES**

- Realizar pruebas de antagonismo utilizando al género *Penicillium sp* y *bacillus sp* para observar su efectividad con otros microorganismos de importancia agrícola, para identificar las posibles interacciones y antagonismos.
- Realizar la caracterización molecular de los 9 aislados de suelos rizosféricos del Babaco, para reconocer su especie y género.

## VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, G. 2005. Plant Pathology. Published Elsevier. 5 ed. United States of America. 948 p.
2. Abril A. 2003. ¿Son los microorganismos edáficos buenos indicadores de impacto productivo en los ecosistemas? *Ecología Austral* 13:195-204
3. Amora-Lazcano E, Guerrero-Zúñiga L.A, Rodriguez-Tovar A, Rodriguez-Dorantes A. and Vasquez-Murrieta M.S.2010. Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soils. Microbiology Department, National Biological Sciences School, National Polytechnic Institute, 11340, D.F., México.
4. Asociación de Agrónomos Indígenas de Cañar (AAIC). 2003. El cultivo de Babaco en invernadero. Editorial Abya Yala. Quito, Ecuador. 45 p.
5. Armijos W. y Salinas D.. 2013. Identificación taxonómica y caracterización molecular de los agentes causales de la marchitez vascular del babaco *Vasconcellea heilbornii* Badillo. var. *pentagona*, en los cantones Loja y Saraguro. Tesis. Universidad nacional de Loja. Loja- Ecuador.
6. Alabouvette, (2006). PCR identification of *Fusarium* genus based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journals African Journal of Biotechnology*. 2(4): 82 – 85.
7. Argotti, E.; Cazar, M.; Motte, E.; Cedeño, V. 2011. Análisis molecular de la región ITS de *Fusarium* spp., agente causal de la marchitez vascular de *Vasconcellea heilbornii* y *Solanum quiotense* en Ecuador. *Revista ESPE Ciencia y Tecnología*. 3(1): 25 – 36. Ávila M. 2010. Situación fitosanitaria y evaluación de productos alternativos y convencionales para manejar *Fusarium oxysporum* en *Vasconcella* sp. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del Azuay. 89 p.
8. Ávila M. 2010. Situación fitosanitaria y evaluación de productos alternativos y convencionales para manejar *Fusarium oxysporum* en *Vasconcella* sp. Facultad de Ciencia y Tecnología. Universidad del Azuay. 89 p
9. Bashan Y, Holguin G, de-Bashan LE. 2004. Azospirillum plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Canadian Journal of Microbiology* 50:521-577.
10. Barnett, H.; Hunter, B. 1987. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. (4th ed.). Publishing, MacMillan Publishing Company. United States of America. 218 p.

11. Badillo, V.M. 2000. *Carica L.* vs. *Vasconcella* St.-Hil. (*Caricaceae*) con la rehabilitación de este último. *Ernstia*, 10(2): 74-79.
12. supresion de enfermedades del suelo." 1-10 pag.
13. Bachar, A., Al-Ashhab, A., Soares, M., Sklarz, M., Angel, R., Ungar, E. y Gillor, O. 2010. Soil Microbial Abundance and Diversity Along a Low Precipitation Gradient. *Microbial Ecology*. 60:453–461.
14. Barea, JM. 2004. Impacto de las micorrizas en la calidad del suelo y la productividad vegetal en sistemas agrícolas y espacios naturales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone, IE, Miyazaki SS (eds.). *Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos*. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 7-11.
15. Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005. Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. En: Buscot F, Varma A (eds.). *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag, Berlin. pp. 195-212.
16. Bergey H', Jonhn Holts 2002 Manual of determinative bacteriology contains much information derived from the four volumes of Bergey's manual of systematic bacteriology United States of America 257p.
17. Becker, J.O., Zavaleta-Mejía, E., Colbert, S.F., Schroth, M.N., Weinhold, A.R., Hancock, J.G., van Gundy, S.D., 1988. Effect of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathol.* 78,1466–1469
18. Bolveerk 2005, Antagonistic activity of *Penicillium oxalicum* Currie and Thom, *Penicillium decumbens* Thom and *Trichoderma harzianum* Rifai isolates against fungi, bacteria and insects in vitro. *Rev Iberoam Micol* 19: 99-103
19. Butt, T.M.; Jackson, C., Magan, N. 2001. Introduction Fungal biological Control Agent: Progress, Problems and Potencial. CABI International. *Fungi as Biocontrol Agents*. Edts T.M. Butt, C. Jackson and N. Magan (pag 1-8).
20. Bravo Alejandra; Ibarra J.; Castro M.; Galindo E.; Patiño M.; Serrano L.; García R.; Pereyra B.; Pizaña A.; Luna H.; Galán Wong L.; Pardo L.; Muñoz C.; Gómez I. y Soberón M. 2005. Los microorganismos en el control de insectos y patógenos. Cuernavaca, México. *Revista, Latinoamericana de Microbiología*. 48(2). 113 -120 pp.

21. Bravo C, Larriva W. y Minchala L. 2012. Manejo Integrado de la Marchitez Vascular o Fusariosis (*Fusarium oxysporum*) en el cultivo de babaco. Cuenca Ecuador pag 17.
22. Caballero Mellado, J. 2004. Uso de Azospirillum como alternativa tecnológica viable para cultivos de cereales. En: Monzón de Asconegui MA, García de Salamone, IE, Miyazaki SS (eds.). Biología del suelo. Transformaciones de la materia orgánica, usos y biodiversidad de los organismos edáficos. Editorial FAUBA, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. pp. 45-49.
23. Cardon, Z. G. y Whitbeck, J. L. 2007. The Rhizosphere An Ecological Perspective. Primera edición. Academic Press. USA. Pag. 212.
24. Campoverde M y Gonzalez F. 2012 Determinación de mohos y levaduras del sistema de agua de la junta administradora de agua potable de la parroquia Baños. Universidad de Cuenca. Cuenca. Pag.178.
25. CINFA. 2012. Centro Integrado de Geomática Ambiental. Área Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables de la Universidad Nacional de Loja.
26. Cordero-Ramirez J. 2008. Microorganismos de la rizosfera del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) como antagonistas de *Fusarium oxysporum* f. sp. radialis – lycopersici. Tesis. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa. Guasave, Sinaloa, México.188p
27. Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C, Barka A. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by a plant growth-promoting bacterium, *Burkholderia* sp. Strain PsJN. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(4):1685-1693. Doi: 10.1128/AEM.71.4.1685-1693.2005.
28. Cooper y Rao, (2006). “Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal”, *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria.* 12:159-166.
29. Correa, M. F. (2014). Evaluación de caracteres PGPR en actinomicetos e interacciones de estas rizobacterias con hongos formadores de micorrizas, Editorial de la Universidad de Granada.
30. Corrales, L. C. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium spp.*, bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *NOVA*, 8(13).
31. Cueva D. 2007. Producción de inoculantes a base de *Trichoderma spp.* Para el control de *Fusarium oxysporum* sp. *caricae* en injertos de babaco (*Vasconcellea*

- heilbornii* cv. babaco). Tesis de Ingeniería Agropecuaria. Escuela Politécnica del Ejército-ESPE. Sangolquí-Quito-Ecuador. 114 p.
32. Chaves Méndez Nancy Patricia (2007): Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis presentada en opción al Título Académico de Magister Scientiae en Agricultura Ecológica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 85 pp
  33. Clavijo R, Gutiérrez-Girón A, Rubio A, Gavilán (2011). Estudio de las poblaciones microbianas asociadas a la rizósfera de *Pinus patula*. Tópicos edafológicos de actualidad. SMCS y UAZ. 53-58
  34. Dayakar VB, Vivanco JM (2009). Regulation and function of root exudates. *Plant Cell Environ.* 32(6): 666 – 681.
  35. Díaz-Zorita M, Fernández CMV. 2008. Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. En: Cassán F, Garcia de Salamone IE (eds.). *Azospirillum sp.: cell physiology, plant interactions and agronomic research in Argentina*. Asociación Argentina de Microbiología. Buenos Aires. pp.155-166.
  36. Doctoral. Instituto de Microbiología Bioquímica, C.S.I.C./Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, España.
  37. Druzhinina IS, Kopchinskiy AG, Kubicek CP. The first one hundred of *Trichoderma* species is characterised by molecular data. *Mycoscience*. 2006;47:55–64. doi: 10.1007/S10267-006-0279-7.
  38. De Cal, A., Szejnberg, A., Sabuquillo, P., Melgarejo, P. 2009b. Management *Fusarium* wilt on melon and watermelon by *Penicillium oxalicum*. *Biological Control* 51, 480-486
  39. Cal A, García Lepe R, Pascual S, Melgarejo P. 1995. Effects of timing and method of application of *Penicillium oxalicum* on efficacy and duration of control of *Fusarium* wilt of tomato. *Plant Pathology* 48: 260-266.
  40. De Prager, M., et al. (2012). "El suelo, su metabolismo, ciclaje de nutrientes y prácticas agroecológicas.
  41. Dubey L, Pierre D, y Martínez P. (2010) A Pictorial Guide to the Identification of *Fusarium Species*. Pennsylvania State University Press, University Park. Pag 154
  42. Eguiarte, L. E. (2007). Ecología molecular, Instituto Nacional de Ecología.

43. Escalante L. A., Gosset L. G., Martínez J.A., Bolivar Z. F, 2004, Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas, *Agrociencia* 38: 583-592.
44. Ettema, C. H. y Wardle, D. A. 2002. Spatial soil ecology. *Trends Ecol. Evol.* 17: 177-183.
45. Estupiñan, H.; Ossa, J. 2007. Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruviana* L.) El hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo. Tesis de Microbiólogo Agrícola y Veterinario. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Colombia. 89 p.
46. Fátima M. S. Moreira, E. Jeroen Huising y David E. Bignell (2012). Manual de biología de suelos tropicales Mexico. 360. pag.
47. Ferraris G, Courerot L. 2004. Evaluación de la utilización de bacterias solubilizadoras de fósforo (*Pseudomonas spp*) en trigo. *Revista de Tecnología Agropecuaria* 9:37-39.
48. Fierer, N.y Jackson, R. B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 626-631.
49. Frioni L., 2008, Microbiología: básica, ambiental y agrícola, Universidad de la república-Facultad de agronomía, Uruguay, 93-103, 121-141, 231-239
50. French, E.R.; Hebert, T.T. Métodos de investigación fitopatológica Turrialba (San José): IICA, 1980. 289p.
51. Garbeva, P., Postma, J., Van Veen, J. A. y Van Alstada, J. D. 2006. Effect of above-ground plant species on soil microbial community structure and its impact on suppression of *Rhizoctonia solani* AG3. *Environmental Microbiology.* 8:233.
52. Gómez R. y Macas F. (2013). Estudios de las interacciones patógeno – patógeno que se establecen durante el desarrollo de la enfermedad de la Marchitez Vascular del Babaco.
53. Garcés De Granada, C.; Orozco De Amézquita M.; Bautista, R. 2001. *Fusarium oxysporum*: El Hongo Que Nos Falta Conocer. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 6 No. 1.
54. Gutiérrez, 2006. Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtili*. *Lett Appl Microbiol.* Enero 2011] 47(3):180-6..

55. Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L. y Sessitsch, A. 2004. Comparison Applied and Environmental Microbiology. 70: 5057–5065.
56. Hartman, W. H. Richardson J. C. Vilgalys, R. y Bruland, G. L. 2008. Environmental and anthropogenic controls over bacterial communities in wetland soil. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 105:17842-17847.
57. Honorato W, 2000. Carbon cycling and formation of soil organic matter. En: Paul, EA (ed.). Soil microbiology, ecology, and biochemistry. Academic Press New York, USA. pp. 303-339
58. Insam, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma* 100: 389-402.
59. Jiménez, M. A., Ulacio, D., Perdomo, W., & Briceño, E. (2009). Micobiota y nematodos asociados con la rizósfera y raíz en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.). *Bioagro*, 21(3), 209-216.
60. Kyndt, T. 2005. Molecular Genetic Analysis Of The Genera *Carica* L. And *Vasconcellea* Saint Hilaire (Caricaceae). Thesis submitted in fulfilment of the requirement for the degree of doctor (Phd.) in applied biological sciences. Faculteit bio-ingenieurswetenschappen.
61. Kibblewhite, M. G., Ritz, K. y Swift, M. J. 2008. Soil health in agricultural systems. *Transacciones filosóficas de la Sociedad Real B: Ciencias Biológicas*. 363: 685-701
62. Lambers H., Mougel C., Jaillard B., Hinsinger P., 2009, Plant-microbe-soil interactions in the rhizosphere: an evolutionary perspective, *Plant Soil*, 321:83–115.
63. Layton, C. (2011). *Bacillus* spp.: perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *NOVA*, 9(16).
64. Lisboa Minguzzi M. A. (2003): Efectividad de *Bacillus subtilis* y de una cepa nativa de *Trichoderma harzianum* sobre la incidencia y severidad de pudrición gris (*Botrytis cinerea*) en Vid (*Vitis vinífera*). Tesis presentada en opción al Título Académico de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Talca, Talca, Chile. 38 pp
65. López L y Torres C. 2006. Microbiología general. Universidad nacional de nordeste. Argentina. Pag.120
66. López R, 2011. Biodiversidad de la microbiota rizosférica de sos especies de solanaceas: *Solanum lycopersicum*, L. y *Datura* spp. (tomate y toloache). Tesis

para maestría en recursos naturales y medio ambiente. Centro interdisciplinario de investigación para el desarrollo integral regional unidad Sinaloa. Guasave, Sinaloa, México.

67. Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J, 2006. Biología de los Microorganismos. Decima edición. Editorial Pearson Prentice Hall. España. Pp. 986.
68. Madigan, M.; Martinko, J; Parker, J. 2003. Brock Biología de los Microorganismos. Editorial Prentice Hall. México DF. 1089 p.
69. Manikandan, R., Saravanakumar, D., Rajendran, L., Raguchander, T., Samiyappan, R. 2010. Standardization of liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* Pf1 for its efficacy against *Fusarium* wilt of tomato. *Biological Control*. 54 (2): 83-89.
70. Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal*. 28(1): 1-11 pp.
71. Mar. A., Aganon, C. P., & Juico, P. P. (2014). Isolation of *Trichoderma* species from carabao manure and evaluation of its beneficial uses. *International Journal Of Scientific & Technology Research*, 3(8), 190-199.
72. Maldonado B, Pham HG, Kumari R, Prasad R, Varma A. 2013. Microbial diversity in soils. En: Buscot F, Varma A (eds.). *Soil biology*. Volume 3. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Springer-Verlag. Berlin.
73. Martínez-Álvarez, J. C. 2003. Identificación molecular de hongos micorrízicos arbusculares en el municipio de Guasave, Sinaloa. Tesis de Maestría en Ciencias en Recursos Naturales y Medio Ambiente. CIIDIR-IPN Unidad Sinaloa
74. Mandeel, Q., Baker, R. 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology, Disease Control and Pest Management*. 81 (4). 462-469.
75. Mantilla, E. 2007. Evaluación de la acción de un bioinoculante sobre un cultivo de crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* var. yoco ono) en periodo de enraizamiento. Colombia. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Agrícola y Veterinaria. 127 p
76. Michel-Aceves. 2001. Cepas nativas de *Trichoderma* spp euascomycetes: Hypocreales), su Antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* (Hyphomycetes:Hyphales). Universidad De Colima. México. 176 p.

77. Mondino, P., Silvana Vero (2006): Control biológico de patógenos en plantas. Editorial. Facultad de Agronomía Universidad de la República. Montevideo, Uruguay. 158 pp.
78. Mohandas, 2010. Importance of microorganisms and invertebrates as components of biodiversity. pp. 7-15. In: D.L. Hawksworth (ed.). The biodiversity of microorganisms and invertebrates: Its role in sustainable agriculture. Redwood Press, Melksham, UK.
79. Naiman AD, Latronico AE, García de Salamone IE. 2009. Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and rhizospheric microflora. *European Journal of Soil Biology* 45:44-51.
80. Nasari A. 2014. Physicochemical analysis of soil in relation to Panama disease (*Fusarium wilt*) in banana. *IJP*. Vol. 5. No. 1. pp. 15-24.
81. Nogales, B., Moore, E. R. B., Abraham, W. R. y Timmis, K. N. 2005. Soil microbiology at the age of molecular biology: discovering the tip iceberg, *Rev Environ. Microbiol.* 1: 199-212.
82. Nunan, N., Wu, K., Young, I. M., Crawford, J. W. y Ritz, K. 2003. Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-structure of soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 44: 203-215.
83. Ochoa, J.; Fonseca, G. 2000. First Report of *Fusarium Wilt* of Babaco (*Carica × heilbornii* var. *pentagona*) in Ecuador. *Revista Plant Disease.* 84(2): 190.
84. Odum, E. P. 2001. *Ecología*. Tercera edición. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. P. 639.
85. Orbera L, Wiley J y Arguelles A. (2014). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol Rev Environ. Microbiol* 1:123.210
86. Pace, N. R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science.* 276:734–740
87. Pal, K. K., & McSpadpen, G. B. 2006. Biological control of plant pathogens. The Plant Health Instructor. APS Net Press. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02.1-25.
88. Patrick, D., Schloss, P. D., y Handelsman, J. 2005. Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biology.* 6:229

89. Pardo G, Cavero J, Aibar J, Zaragoza C. 2009. Nutrient evolution in soil and cereal yield under different fertilization type in dryland. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 84:267-279.
90. Parra González E. (2009), Actividad antifúngica de *Burkholderia cepacia* aislada de maíz amarillo (*Zea mays* L.) bajo diferentes condiciones de cultivo. Tesis presentada en opción al Título Académico de Magister Scientiarum en Biología Aplicada mención: Microbiología Aplicada. Universidad de Oriente. Cumaná, Venezuela. 74 pp.
91. Pisa p, Lipson A, Schadt W y Schmidt K (2011). Changes in Soil Microbial Community Structure and Function in an Alpine Dry Meadow Following Spring Snow Melt. *Microbial Ecol* 43: 307-314
92. Prashar P., Kapoor N., Sachdeva S., 2014, Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance (Review), *Rev Environ Sci Biotechnol*, 13: 63-77.
93. Raaijmakers j., Paulitz T., Steinberg C., alabouvette C., Moëgne-Loccoz, Y. 2008. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* 321: 341-361.
94. Rojas - Triviño, A. 2011. *Conceptos y Práctica de Microbiología General*. Palmira, Colombia. Editorial: Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. 161 p.
95. Rodríguez C. V.; María José Martín Hernández. (2009): Aislamiento y selección de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal en cultivos de uchuva (*Physalis peruviana* L.) con capacidad antagónica frente a *Fusarium* sp. Tesis presentada en opción a los Títulos Académicos de Microbiólogo Agrícola-Veterinario y Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Pag. 61.
96. Roling W. 2007. Do microbial numbers count? Quantifying the regulation of biogeochemical fluxes by population size and cellular activity. *FEMS Microbiology and Ecology* 62:202-210
97. Stefanis C., Alexopoulos A., Voidarou C., Vavias S., Bezirtzoglou E., 2013, Principal methods for isolation and identification of soil microbial communities, *Folia Microbiol*, 58: 61–68
98. Santos A.; Dillon R; Viv Dillon; Reynolds S. y Samuels R. (2004). Occurrence of the antibiotic producing bacterium *Burkholderia* sp. in colonies of the leaf-cutting

- ant *Atta sexdens rubropilosa*. Fluminense, Brazil. *Journals Microbiology Letters*. 239. 319-323 pp.
99. Saharan y Nehra. 2000. Application of *Bacillus* as a biocontroller against tomato wilt disease caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Egyptian Journal of Microbiology* 34 (2): 347-376.
  100. Samson R, Hoekstra E, Frisvad J, Filtenborg O (Eds). 2000. Introduction to food- and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures. Utrecht.
  101. Sarasola y Rocca (2005). *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. University Park: Pennsylvania State University Press.
  102. Saikia SP, Vanita J. 2007. Biological nitrogen fixation with non-legumes: an achievable target or a dogma. *Current science* 92(3):317-322.
  103. Sucuzhañay, C., et al. (2010). "Evaluación del comportamiento del babaco (*Vasconcella x heilbornii* nm. pentagona) en tres tipos de alturas de podas en plantas de seis años de producción en la Parroquia Bulán, cantón Paute, Provincia del Azuay."
  104. Suárez-Estrella, F., Vargas-García, C., López, M. J., Capel, C., y Moreno, J. (2007). Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection*, 26(1), 46-53.
  105. Smit E., Leeflang P., Gommans S., van den Broek J., van Mil S. y Wernars K. 2001 Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. *Applied Environmental Microbiology*. 67: 2284-2291.
  106. 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.
  107. Schaechter, M.; Lederberg, J. 2004. *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. China. Editorial: Elsevier, 1169 p.
  108. Stefanova, M. (2003), Producción y aplicación de *Trichoderma sp* como antagonistas de hongos fitopatógenos. Pag.154
  109. 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

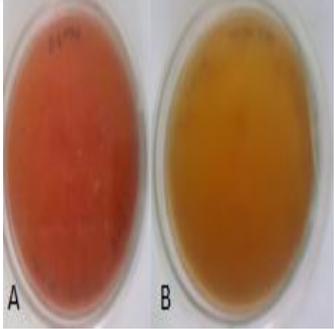
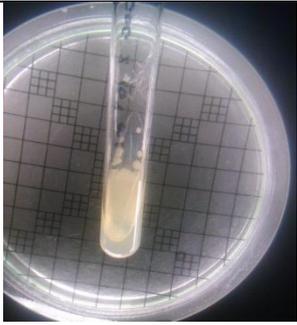
Estudios Sociales y Globales. Programa de Estudios Latinoamericanos Mención en Estudios Agrarios Universidad Andina Simón Bolívar, Ecuador. 109 p.

110. Torsvik ,V. and Ovreas L. 2002. Microbial diversity and function in soil: From genes to ecosystems. *Curr Opin Microbiol* 5(3):240-245.
111. Thomson B, Ostle N, McNmara N, Bailey M, Whiteley A, Griffiths R. 2010. Vegetation affects the relative abundances of dominant soil bacterial taxa and soil respiration rates in an upland grassland soil. *Microbial Ecology* 59:335-343.
112. Uzcátegui C. 2007. Estudio de factibilidad para la implementación de una empresa dedicada a la industrialización del babaco. Tesis de Ingeniería Empresarial. Escuela Politécnica Nacional, Ecuador. 185 p.
113. Vivanco G. 2013. Estudio de Factibilidad para la producción y exportación de Babaco a Canadá. Tesis de Ingeniería Comercial. Facultad de Ciencias Económicas, Universidad Tecnológica Equinoccial. Ecuador. 151 p.
114. Whipps, J. M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52: 487-511.
115. Zahir, Z.A., Arshad, M. y Frankenberger, W.T. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy* 81: 97-168

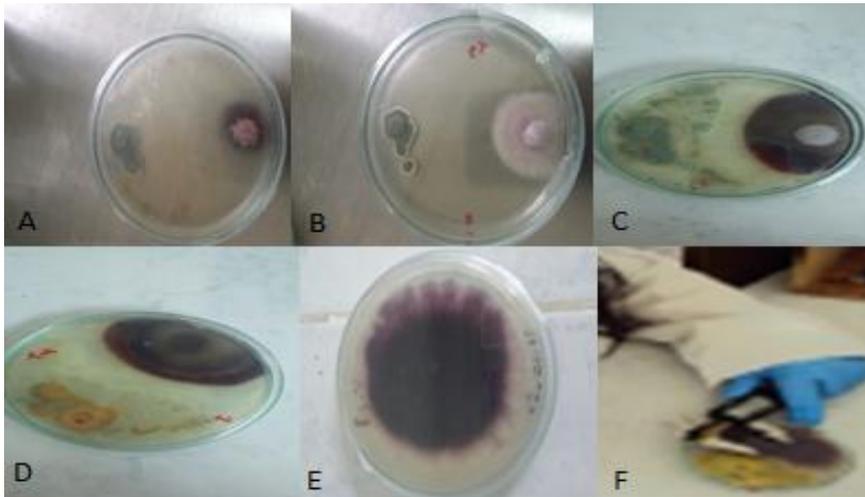
## IX. ANEXOS

**Anexo 1.** Identificación de microorganismos mediante pruebas químicas, enzimáticas y en medios de cultivos

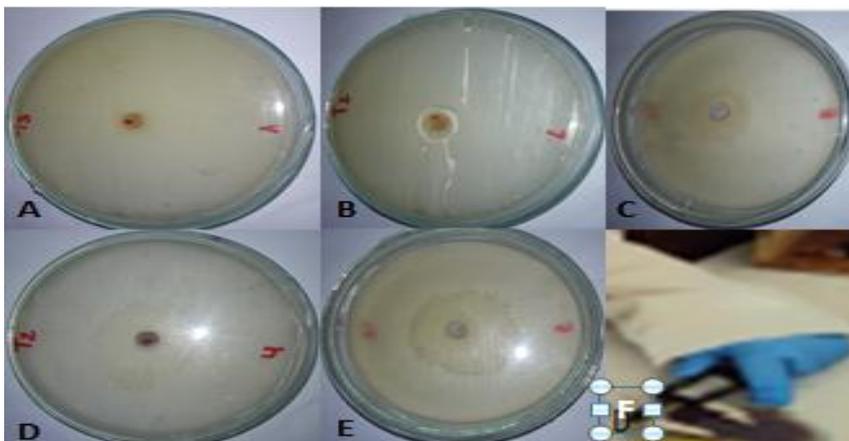
<b>IDENTIFICACION MORFO- CULTURAL Y BIOQIMICA DE BACTERIAS</b>		
<b>PRUEBAS</b>	<b>DESCRIPCION</b>	<b>IMAGEN</b>
1	Crecimiento de bacteria en medio LPGA (Levadura Papa Glucosa Agar)	
2	Tinción Gram para determinar la reacción y la forma.	
3	Crecimiento en medio (CN) de cultivo caldo nutriente las muestras presentaron crecimiento de sedimentos es decir crecimiento en el fondo del caldo que puede ser granular.	
4	Crecimiento en medio Agar Nutritivo (AN). donde se caracterizó: forma, elevación y bordes de la colonia observable macroscópicamente.	
5	Crecimiento en medio KLIGER resultado positivo en todas las muestras bacterianas.	

6	Crecimiento en medio MacConkey A) resultado positivo y B) resultado negativo	
7	Crecimiento bacteriano en medio agar nutritivo inclinado sembrado en una sola línea se obtuvo crecimiento barbado, difuso y arborescente.	
8	Prueba de catalasa en colonias de bacterias se obtuvo resultado positivo en todas las 13 muestras bacterianas.	

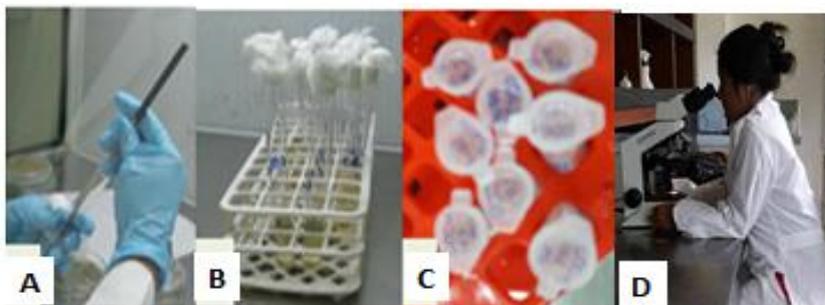
**Anexo 2.** Evaluación de enfrentamiento dual *Penicillium sp* frente a *Fusarium Oxysporum* aislados (AML2 y QU2).



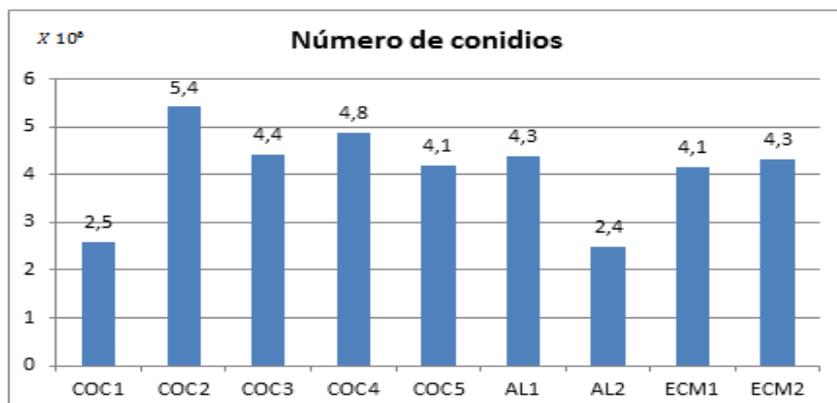
**Anexo 3.** Evaluación de enfrentamiento dual *Bacillus sp* frente a *Fusarium oxysporum* aislados (AML y QU2).



**Anexo 4.** Procedimiento para realizar en conteo de conidios



**Anexo 5.** Número de conidios de cada uno de los aislados de los suelos del cultivo de Babaco.



**Anexo 6.** Registro utilizado para Conteo de Conidios en Cámara de Neubauer.

PARTE SUPERIOR										PARTE INFERIOR									
Muestra:										Muestra:									
Fecha:										Fecha:									
Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5	Cuadrante 1	Cuadrante 2	Cuadrante 3	Cuadrante 4	Cuadrante 5
1.1		2.1		3.1		4.1		5.1		1.1		2.1		3.1		4.1		5.1	
1.2		1.2		3.2		4.2		5.2		1.2		1.2		3.2		4.2		5.2	
1.3		2.3		3.3		4.3		5.3		1.3		2.3		3.3		4.3		5.3	
1.4		2.4		3.4		4.4		5.4		1.4		2.4		3.4		4.4		5.4	
1.5		2.5		3.5		4.5		5.5		1.5		2.5		3.5		4.5		5.5	
1.6		2.6		3.6		4.6		5.6		1.6		2.6		3.6		4.6		5.6	
1.7		2.7		3.7		4.7		5.7		1.7		2.7		3.7		4.7		5.7	
1.8		2.8		3.8		4.8		5.8		1.8		2.8		3.8		4.8		5.8	
1.9		2.9		3.9		4.9		5.9		1.9		2.9		3.9		4.9		5.9	
1.10		2.10		3.10		4.10		5.10		1.10		2.10		3.10		4.10		5.10	
1.11		2.11		3.11		4.11		5.11		1.11		2.11		3.11		4.11		5.11	
1.12		2.12		3.12		4.12		5.12		1.12		2.12		3.12		4.12		5.12	
1.13		2.13		3.13		4.13		5.13		1.13		2.13		3.13		4.13		5.13	
1.14		2.14		3.14		4.14		5.14		1.14		2.14		3.14		4.14		5.14	
1.15		2.15		3.15		4.15		5.15		1.15		2.15		3.15		4.15		5.15	
1.16		2.16		3.16		4.16		5.16		1.16		2.16		3.16		4.16		5.16	
Total		Total		Total		Total		5.17		Total		Total		Total		Total		5.17	
								5.18										5.18	
								5.19										5.19	
								5.20										5.20	
								5.21										5.21	
								5.22										5.22	
								5.23										5.23	
								5.24										5.24	
								5.25										5.25	
								Total										Total	

**Anexo 7.** Datos de Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Hongo

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>	<b>120h</b>	<b>144h</b>	<b>168h</b>
<b>T1</b>	0	3,8920 b	7,20 b	10,4130 b	14,1120 b	19,140 b	21,3450 b	24,5510 c
<b>T2</b>	0	3,5620 b	7,14 b	10,4330 b	13,4250 b	18,7260 b	22,8920 b	25,7260 b c
<b>T3</b>	0	7,7190 a	10,0910 a	13,2750 a	16,3750 a	39,3910a	52,0230 a	66,8710 a
<b>T4</b>	0	6,970 a	9,6560 a	13,7990 a	17,6510 a	32,0190 a	55,9370 a	69,1790 a

**Anexo 8.** Pruebas cualitativas de antagonismo Hongo-Bacteria

<b>TRATAMIENTO</b>	<b>0h</b>	<b>24h</b>	<b>48h</b>	<b>72h</b>	<b>96h</b>	<b>120h</b>	<b>144h</b>	<b>168h</b>
<b>T1</b>	0	2,7920 b	7,2000 b	10,4310 b	14,1120 b c	19,0400 b	20,6450 c	21,9510 b
<b>T2</b>	0	2,8620 b	7,1420 b	10,4330 b	12,8250 c	18,7260 b	19,4920 c	20,6260 b
<b>T3</b>	0	6,6830 a	10,2970 a	13,4980 a	25,1280 b	36,5950 b	53,4620 b	68,2050 a
<b>T4</b>	0	7,2000 a	10,1020 a	14,1880 a	28,8920 a	37,1980 a	46,6120 a	59,4140 a

**Anexo 9.** Conteo de número de conidios para cada uno de los aislados.

<b>Muestras</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>
<b>COC1</b>	3802000	3798000	532000	290000	1908000	1948000	468000	3222000	4936000	4798000
<b>COC2</b>	3500000	5562000	6860000	5500000	5200000	2658000	5754000	5352000	5688000	8016000
<b>COC3</b>	1952000	1934000	9874000	11550000	3022000	2614000	1378000	1870000	2990000	6880000
<b>COC4</b>	3278000	2290000	8778000	4816000	10036000	2188000	1432000	2516000	6790000	6616000
<b>COC5</b>	6540000	3682000	5230000	6148000	2476000	2478000	4050000	1914000	4348000	5084000
<b>AL1</b>	6268000	2316000	1346000	3336000	3534000	2020000	7006000	7488000	8032000	2398000
<b>AL2</b>	1616000	2084000	2820000	2868000	3132000	2888000	2568000	3500000	1704000	1666000
<b>ECM2</b>	1626000	1544000	3716000	2128000	3238000	9174000	5756000	2292000	6638000	5408000

Para determinar la sepa que tiene mayor número de conidios, se utilizó los datos descritos en la tabla y se sometió a un análisis de varianza y prueba de significancia, obteniendo un resultado que la sepa con mayor número de conidios fue la sepa **COC2**.

# Anexo 10. Tríptico elaborado para el día de campo.

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LOJA  
CARRERA DE INGENIERIA A GRONOMICA

“IDENTIFICACIÓN DE LOS MICRO-ORGANISMOS ASOCIADOS A LA RIZOSFERA DEL BABACO (*Vasconella heilbornii* var. *pentagona*) EN LA PROVINCIA DE LOJA.”



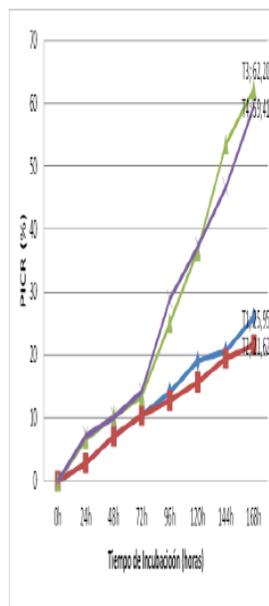
TEESIS: Claudia Chiriapo Guarderas  
Director: Ing. Ángel Robles Carrión Mg. Sc

## PRUEBAS QUÍMICAS DE LOS AISLADOS BACTERIANOS.

LABORIO	PRUEBAS QUÍMICAS									
	1.200	1.201	1.202	1.203	1.204	1.205	1.206	1.207	1.208	1.209
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
001(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
002(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
003(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
004(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
005(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
006(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
007(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
008(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
009(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
010(1)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

LEYENDA: + (Positivo) - (Negativo) ++ (existe crecimiento) -- (no existe crecimiento)

## ENFRENTAMIENTO DUAL HONGO-BACTERIA



## INTRODUCCIÓN

El suelo es considerado como un sistema de interacción entre tres fases bien definidas: una fase sólida, constituida por materia mineral y orgánica, una fase líquida, y una fase gaseosa. La ausencia del estudio sobre la diversidad de microorganismos (hongos, bacterias) de la rizosfera del Babaco ha impedido conocer a posibles microorganismos antagonista, para diseñar una estrategia de Biocontrol de la marchitez vascular del Babaco.

### OBJETIVO GENERAL

- Conocer mediante métodos tradicionales los microorganismos asociados a la rizosfera del Babaco (*Vasconella heilbornii* var. *pentagona*) en la provincia de Loja.

### OBJETIVOS ESPECIFICOS

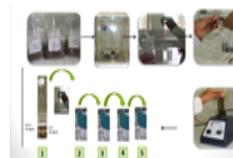
- Caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizosfera del Babaco.
- Determinar la presencia de posibles microorganismos (hongos y bacterias) con capacidad antagonista de la Marchitez Vascular del Babaco.

## METODOLOGIA

“Caracterizar las comunidades fúngicas y bacterianas de la rizosfera del Babaco”



### Extracción y Obtención de los microorganismos objeto de estudio



### Enfrentamiento dual (Hongo-Hongo)

Se depositaron discos de micelio de 5 mm de diámetro de colonias de 10 días de edad, de una de las 2 especies de *Fusarium* causantes de la MVB con crecimiento activo.

### Enfrentamiento dual (Bacteria-Hongo)

En cajas de Petri, con medio Agar, se inocularon bacterias posibles antagonistas. Una vez colocado el hongo en las cajas se incubaron a 25°C y se observaron cada 24 h si hay presencia de crecimiento o no.

## RESULTADOS

### EXTRACCIÓN Y OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Cuadro 1. Características morfológicas y culturales de los aislados de *Fusarium* spp., recolectados de suelos rizosféricos del Babaco en la provincia de Loja.

ASILADO	ORIGEN	FORMA	COLOR DE COLONIA	NÚMERO DE CONIDIOS
0001	Cochapamba	Elipsoida	Verde magenta	2,7602x10 <sup>7</sup>
0002	Cochapamba	Elipsoida	Verde magenta	5,4395x10 <sup>7</sup>
0003	Cochapamba	Elipsoida	Verde magenta	4,4094x10 <sup>7</sup>
0004	Cochapamba	Elipsoida	Verde magenta	4,8740x10 <sup>7</sup>
0005	Cochapamba	Elipsoida	Verde magenta	4,1890x10 <sup>7</sup>
0006	Camalito	Elipsoida	Verde magenta	4,3744x10 <sup>7</sup>
0007	Alumbra	Elipsoida	Verde magenta	2,4664x10 <sup>7</sup>
0008	Alumbra	Elipsoida	Verde magenta	4,1520x10 <sup>7</sup>

### ENFRENTAMIENTO DUAL HONGO-HONGO

