



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

### TEMA:

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DEL COMPLEJO DE HONGOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN BASAL EN GYPSOPHILA (*Gypsophila paniculata*), PARROQUIA CHÁVEZPAMBA, SAN JOSÉ DE MINAS.

**Trabajo de grado previa a la obtención del Título de Ingeniero Agropecuario**

### AUTOR/A:

Marco Antonio Varela Recalde

### DIRECTOR/A:

Lic. Ima Sánchez, MSc.

**Ibarra-Ecuador**

# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS

AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA INGENIERÍA AGROPECUARIA

EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DEL COMPLEJO DE HONGOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN BASAL EN GYPSOPHILA (*Gypsophila paniculata*), PARROQUIA CHÁVEZPAMBA, SAN JOSÉ DE MINAS.

Trabajo de grado revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su presentación como requisito parcial para obtener Título de:

**INGENIERO AGROPECUARIO**

APROBADO:

Lic. Ima Sánchez, MSc.

**DIRECTORA**

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

Ing. Franklin Sánchez, MSc.

**MIEMBRO TRIBUNAL**

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA

Ing. Juan Pablo Aragón, MSc.

**MIEMBRO TRIBUNAL**

  
\_\_\_\_\_  
FIRMA



# UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

## BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

### AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

#### 1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
<b>CÉDULA DE IDENTIDAD:</b>	100393696-8		
<b>APELLIDOS Y NOMBRES:</b>	Varela Recalde Marco Antonio		
<b>DIRECCIÓN:</b>	Atuntaqui		
<b>EMAIL:</b>	marco_vr94@hotmail.com/mavarela@utn.edu.ec		
<b>TELÉFONO FIJO:</b>		<b>TELÉFONO MÓVIL:</b>	(593)968830607

DATOS DE LA OBRA	
<b>TÍTULO:</b>	EFFECTIVIDAD DE <i>Trichoderma</i> sp. EN EL CONTROL DE HONGOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN BASAL EN <i>Gypsophila</i> ( <i>Gypsophila paniculata</i> ) EN CHÁVEZPAMBA.
<b>AUTOR (ES):</b>	Varela Recalde Marco Antonio
<b>FECHA: DD/MM/AAAA</b>	17 de noviembre del 2020
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
<b>PROGRAMA:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> <b>PREGRADO</b> <input type="checkbox"/> <b>POSGRADO</b>
<b>TITULO POR EL QUE OPTA:</b>	Ingeniero agropecuario
<b>ASESOR /DIRECTOR:</b>	Lic. Ima Sánchez, MSc.

## 2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrollo, sin los derechos de autores terceros, por lo tanto, la obra es original y es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 14 días del mes de mayo del 2021

EL AUTOR



Marco Antonio Varela Recalde

C.I.: 100393696-8

## CERTIFICACIÓN DE AUTORÍA

Certifico que el presente trabajo fue desarrollado por Marco Antonio Varela Recalde, bajo mi supervisión.

Ibarra, a los 14 días del mes de mayo de 2021



---

Lic. Ima Sánchez, MSc.

DIRECTORA DE TESIS

## REGISTRO BIBLIOGRÁFICO

**Guía:** FICAYA-UTN

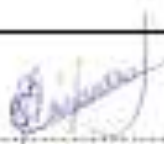
**Fecha:** Ibarra, a los 14 días del mes de mayo del 2021

Marco Antonio Varela Recalde: "EFECTIVIDAD DE *Trichoderma* sp. EN EL CONTROL DE HONGOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN BASAL EN *Gypsophila* (*Gypsophila paniculata*) EN CHÁVEZPAMBA" /Trabajo de titulación. Ingeniero Agropecuario.

Universidad Técnica del Norte. Carrera de Ingeniería Agropecuaria. Ibarra, a los 15 días del mes de mayo del 2021, 91 páginas.

**DIRECTOR (A):** Lic. Ima Sánchez, MSc.

- El objetivo principal de la presente investigación fue: Determinar la eficacia de *Trichoderma* sp. en el control del complejo de hongos causantes de la pudrición basal en *Gypsophila paniculata*.
- Entre los objetivos específicos se encuentran: Identificar la diversidad de hongos fitopatógenos causantes de la enfermedad pudrición basal, Evaluar la severidad de la pudrición basal causada por el complejo de hongos fitopatógenos en plantas de *Gypsophila*, Determinar el antagonismo de *Trichoderma* sp. hacia los patógenos causantes de la pudrición basal.



Lic. Ima Sánchez MSc.

**Directora de Trabajo de Grado**



Marco Antonio Varela Recalde

**Autor**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Técnica del Norte por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A la empresa florícola Florisol, que de alguna manera contribuyeron a facilitarme el acceso a la información necesaria para alcanzar las metas trazadas en esta tesis.

A los Docentes, que marcaron sus instrucciones y conocimientos, gracias por prepararnos para un futuro competitivo como los buenos profesionales.

A mi directora de tesis, Lcda. Ima Sánchez, por la confianza depositada en mi persona, por sus consejos e ideas para que la tesis se llevara a cabo.

A mi familia, fuente de apoyo constante, sin su apoyo habría sido imposible culminar este trabajo de grado.

A mis amigos, por su amistad sincera, con los que he compartido gratos momentos, sacrificios, alegrías y tristezas durante esta larga estadía en la Universidad, el tiempo compartido con ustedes ha sido muy valioso.

## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme la vida, quien ha sido la luz de guía durante todo este largo proceso, permitiéndome cumplir mis objetivos.

A mis padres, Guadalupe y Edmundo por guiarme en cada meta planteada, por brindarme su apoyo incondicional e inculcarme valores que me han permitido ser la persona que soy y por su apoyo emocional.

A mis hermanos, Erika y Felipe por estar presentes no sólo aportándome buenas cosas, sino también por su gran apoyo en esta etapa de mi vida. Recuerden que hay mucho camino por recorrer.

A mi sobrina Elena Sophía por brindarme su afecto y energías cada día de mi vida.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS .....	XI
RESUMEN .....	XIV
ABSTRACT .....	XV
1 INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes.....	1
1.2 Problema de investigación.....	2
1.3 Justificación.....	3
1.4 Objetivos.....	5
1.4.1 Objetivo general.....	5
1.4.2 Objetivos específicos.....	5
1.5 Hipótesis.....	5
1.5.1 Aislamiento de microorganismos.....	5
1.5.2 Fase experimental.....	5
2 MARCO TEÓRICO .....	6
2.1 <i>Gypsophila paniculata</i> Linneo.....	6
2.1.1 Morfología.....	6
2.1.2 Fase de desarrollo del cultivo de <i>Gypsophila</i> .....	9
2.1.3 Enfermedades.....	9
2.1.4 <i>Pythium</i> .....	10
2.1.5 <i>Rhizoctonia</i> .....	11
2.1.6 <i>Phytophthora</i> .....	12
2.1.7 <i>Fusarium</i> .....	13
2.2 Control Biológico.....	17
2.3 <i>Trichoderma</i> .....	17
2.4 Postulados de Koch.....	21
2.5 Marco legal.....	22
3 MARCO METODOLÓGICO .....	23
3.1 Descripción del área de estudio.....	23

3.2	Condiciones climáticas.....	23
3.3	Materiales y métodos.....	24
3.4	Métodos .....	24
3.4.1	Aislamiento de Microorganismos .....	25
3.5	Fase experimental.....	25
3.5.1	Factor de estudio.....	25
3.5.2	Tratamientos.....	25
3.5.3	Diseño experimental.....	25
3.5.4	Análisis estadístico.....	26
3.6	Variables para evaluarse.....	27
3.7	Manejo específico del experimento.....	31
3.7.1	Aislamientos de Microorganismos .....	31
3.7.2	Fase experimental .....	41
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
4.1	Obtención de cultivos del controlador biológico y el fitopatógeno.....	44
4.2	Identificación, caracterización de aislados fitopatógenos de <i>Gypsophila</i> “Million Dos”. 44	
4.3	Identificación, caracterización de aislados biocontrolador de <i>Gypsophila</i> “Million Dos”. 46	
4.4	Porcentaje de marchitez.....	48
4.5	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> sp. frente a <i>Fusarium</i> sp.....	50
4.6	Diferencia de longitud.....	53
4.7	Peso fresco del cultivo <i>Gypsophila</i> .....	56
5	CONCLUSIONES.....	60
6	RECOMENDACIONES .....	61
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	62

## 1 ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> <i>Raíz de Gypsophila.</i> .....	7
<b>Figura 2</b> <i>Tallo de Gypsophila.</i> .....	7
<b>Figura 3</b> <i>Hojas de plántulas de gypsophila bajo condiciones de invernadero.</i> .....	8
<b>Figura 4</b> <i>Distribución botánica de la inflorescencia del cultivo de Gypsophila.</i> .....	8
<b>Figura 5</b> <i>Microconidios del fitopatógeno de Fusarium oxysporum Di Prieto con aumento 40x.</i> .....	16
<b>Figura 6</b> <i>Macroconidios del fitopatógeno de Fusarium oxysporum Di prieto, con aumento 40x.</i> .....	16
<b>Figura 7</b> <i>Aspectos para considerar al momento de usar un control biológico.</i> .....	19
<b>Figura 8</b> <i>Conidios y conidióforos de Trichoderma sp. (40x).</i> .....	20
<b>Figura 9</b> <i>Mapa base de ubicación del área de estudio</i> .....	23
<b>Figura 10</b> <i>Representación de la unidad experimental.</i> .....	27
<b>Figura 11</b> <i>Distribución de las dosificaciones para los aislados fitopatógenos.</i> .....	29
<b>Figura 12</b> <i>Activación de conservados previo a la inoculación del fitopatógeno.</i> .....	29
<b>Figura 13</b> <i>Inoculación del patógeno en gypsophila “Million Dos”</i> .....	30
<b>Figura 14</b> <i>Medición de longitud de la planta infectada por el patógeno.</i> .....	30
<b>Figura 15</b> <i>Peso fresco del material vegetal infestado con el patógeno.</i> .....	31
<b>Figura 16</b> <i>Muestreo del cultivo afectado por pudrición basal.</i> .....	32
<b>Figura 17</b> <i>Corte transversal del material vegetal.</i> .....	33
<b>Figura 18</b> <i>Explantos utilizados en la cámara de flujo laminar.</i> .....	34
<b>Figura 19</b> <i>Explantos de gypsophila “Million dos” en platos Petr.</i> .....	35
<b>Figura 20</b> <i>Identificación morfológica de los Posibles hongos fitopatógenos.</i> .....	36
<b>Figura 21</b> <i>Preparación de soluciones para la conservación de cepas.</i> .....	37
<b>Figura 22</b> <i>Conservación de aislados fitopatógenos.</i> .....	37

<b>Figura 23</b> <i>Multiplicación de cultivos monospóricos de los microorganismos fitopatógenos.</i> .....	38
<b>Figura 24</b> <i>Siembra del material de gypsophila “Million Dos”.</i> .....	39
<b>Figura 25</b> <i>Aislamiento del posible controlador biológico.</i> .....	40
<b>Figura 26</b> <i>Cultivos monospóricos controlador biológico y el fitopatógeno.</i> .....	40
<b>Figura 27</b> <i>Proceso por seguir para la siembra de Gypsophila “Million Dos”.</i> .....	42
<b>Figura 28</b> <i>Esterilización de suelo, previo a la siembra de esquejes de Gypsophila.</i> ....	42
<b>Figura 29</b> <i>Inoculación del patógeno y evaluación de variables.</i> .....	43
<b>Figura 30</b> <i>Características macroscópicas y microscópicas presentadas por Fusarium sp. en cultivos PDA.</i> .....	45
<b>Figura 31</b> <i>Características macroscópicas y microscópicas presentadas por Trichoderma sp. en medio PDA.</i> .....	47
<b>Figura 32</b> <i>Cultivo dual entre Trichoderma sp. frente a Fusarium sp.</i> .....	51
<b>Figura 33</b> <i>Competencia por nutrientes y espacio, durante cinco días.</i> .....	51
<b>Figura 34</b> <i>Acción antagónica del controlador biológico Trichoderma sp. vs. el fitopatógeno Fusarium sp.</i> .....	52
<b>Figura 35</b> <i>Diferencia de longitud de cultivo de gypsophila en relación con las concentraciones de Trichoderma sp.</i> .....	54
<b>Figura 36</b> <i>Longitud del cultivo Gypsophila a diferentes concentraciones.</i> .....	55
<b>Figura 37</b> <i>Peso fresco del cultivo de gypsophila en función de las concentraciones de Trichoderma sp.</i> .....	57
<b>Figura 38</b> <i>Condición morfológica del cultivo de Gypsophila aplicado el biocontrolador y el fitopatógeno Fusarium sp.</i> .....	58
<b>Figura 39</b> <i>Concentraciones de Trichoderma sp. aplicadas para la variable peso fresco del cultivo de Gypsophila.</i> .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b> <i>Clasificación taxonómica de Gypsophila paniculata.</i> .....	6
<b>Tabla 2</b> <i>Clasificación taxonómica de Pythium.</i> .....	10
<b>Tabla 3</b> <i>Clasificación taxonómica de Rhizoctonia.</i> .....	11
<b>Tabla 4</b> <i>Clasificación taxonómica de Phytophthora.</i> .....	12
<b>Tabla 5</b> <i>Clasificación taxonómica de Fusarium.</i> .....	14
<b>Tabla 6</b> <i>Clasificación taxonómica de Trichoderma sp.</i> .....	18
<b>Tabla 7</b> <i>Materiales y equipos utilizados en la investigación.</i> .....	24
<b>Tabla 8</b> <i>Concentraciones de Trichoderma sp.</i> .....	26
<b>Tabla 9</b> <i>Medidas de la unidad experimental.</i> .....	26
<b>Tabla 10</b> <i>Análisis de varianza (ADEVA) para el factor efectividad de Trichoderma sp.</i> .....	27
<b>Tabla 11</b> <i>Análisis de varianza (ADEVA) para la interacción entre concentración de Trichoderma sp. y la parte de la planta Gypsophila.</i> .....	28
<b>Tabla 12</b> <i>Número de microorganismos aislados del muestro en el cultivo de Gypsophila.</i> .....	44
<b>Tabla 13</b> <i>ADEVA para la variable porcentaje de marchitez</i> .....	48
<b>Tabla 14</b> <i>Efecto de concentración de Trichoderma sp. en porcentaje de marchitez.</i> ....	49
<b>Tabla 15</b> <i>ADEVA para la variable diferencia de longitud.</i> .....	53
<b>Tabla 16</b> <i>ADEVA para la variable peso fresco del cultivo.</i> .....	56

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DEL COMPLEJO DE HONGOS CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN BASAL EN GYPSOPHILA (*Gypsophila paniculata*), PARROQUIA CHÁVEZPAMBA, SAN JOSÉ DE MINAS.**

Autor: Varela Recalde Marco Antonio

Directora: Lic. Ima Sánchez, MSc.

Universidad Técnica del Norte

Correo: marco\_vr94@hotmail.com

**RESUMEN**

La pudrición basal causada por varios fitopatógenos afecta gravemente la base del tallo y su zona radical, en el cultivo de *Gypsophila*. El objetivo del presente estudio fue determinar la eficacia de *Trichoderma* sp. en el control de hongos causantes de la pudrición basal, la diversidad y severidad de fitopatógenos causantes de la enfermedad. Se utilizó un DBCA con tres bloques, cuatro concentraciones de controlador biológico y 10 macetas por unidad experimental. El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de varianza en el software INFOSTAT versión 2018, se aplicó el modelo lineal general y mixto y para las pruebas de media LSD Fisher al 5%. Para la conservación de los microorganismos se realizaron cultivos monospóricos y posteriormente la identificación morfológica. Se plantaron 120 esquejes del cultivo, donde se realizó dos aplicaciones de ocho ml de las diluciones con concentraciones de *Trichoderma* sp. ( $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  esporas/ml), cuatro días después se inocularon dos ml  $1 \times 10^7$  esporas/ml del patógeno a la corona de cada planta. Se evaluó el peso fresco, porcentaje de marchitez y longitud del cultivo. Los resultados indican que las concentraciones de *Trichoderma* spp.  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^8$  esporas/ml, tuvieron mayor incremento en el porcentaje de mortalidad, sin embargo, la cepa nativa T.R.G.E. de *Trichoderma* sp. de la empresa florícola “Clarivel”  $1 \times 10^6$  esporas/ml, mostró mayor longitud en cultivo de *Gypsophila*, No obstante, para el peso seco hubo interacción entre concentración de *Trichoderma* sp. y la parte de la planta. Por otro lado, para la parte de la planta existió diferencia significativa independientemente de la concentración. En contraste, no existe diferencia significativa entre concentraciones independientemente de la parte de la planta.

**Palabras clave:** microorganismos, antagonistas, patogenicidad

## ABSTRACT

The basal rot caused by several phytopathogens severely affects the base of the stem and its root zone, in Gypsophila crop. The objective of the present study was to determine the efficacy of *Trichoderma* sp. in the control of fungi causing basal rot, the diversity and severity of phytopathogens causing the disease. A DBCA with three blocks, four concentrations of biological controller and 10 pots per experimental unit was used. Statistical analysis was performed by analysis of variance in INFOSTAT software version 2018, the general linear and mixed model was applied and for mean tests LSD Fisher at 5%. For the preservation of the microorganisms, monosporic cultures were performed followed by morphological identification. A total of 120 cuttings of the culture were planted, where two applications of eight ml of the dilutions with concentrations of *Trichoderma* sp. ( $1 \times 10^0$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  and  $1 \times 10^8$  spores/ml), four days later two ml  $1 \times 10^7$  spores/ml of the pathogen were inoculated to the crown of each plant. Fresh weight, wilting percentage and crop length were evaluated. The results indicate that the concentrations of *Trichoderma* sp.  $1 \times 10^4$  and  $1 \times 10^8$  spores/ml, had greater increase in the percentage of mortality, however, the native strain T.R.G.E. of *Trichoderma* sp. of the floricultural company "Clarivel"  $1 \times 10^6$  spores/ml, showed greater length in Gypsophila crop, Nevertheless, for the dry weight there was interaction between concentration of *Trichoderma* sp. and the part of the plant. On the other hand, for the part of the plant there was significant difference independently of the concentration. In contrast, there was no significant difference between concentrations independently of the part of the plant.

**Key words:** microorganisms, antagonists, pathogenicity.

# 1 INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes

El sector floricultor en Ecuador, posee una de las industrias más importantes destacándose en varios países desarrollados y en vías de desarrollo debido a su diversidad de flores de verano, rosas, entre otras (Castro, 2017). Al respecto conviene decir que la exportación en el Ecuador ha incursionado mayoritariamente en el cultivo florícola hacia Estados Unidos, Canadá, Alemania, Italia, Finlandia y Rusia (Izquierdo *et al.*, 2018). Cabe mencionar que las flores ecuatorianas están consideradas entre las mejores del mundo, no solo por su calidad y belleza, sino que también tienen una vida útil más larga después del corte, en comparación con las de otras regiones (Encalada, 2017).

*Gypsophila* es originario de Europa y Asia, pertenece a las Caryophyllaceae y está compuesto por más de 125 especies que pueden ser anuales, bianuales o perennes, en su mayoría, ornamentales; por otra parte, *Gypsophila paniculata* L. se cultiva comercialmente en Holanda, California, Ecuador, Perú y Colombia (Garcés de Granada *et al.*, 1994).

Es un cultivo que demanda gran cantidad de elementos, por lo que la producción en forma de monocultivo provoca que el suelo se vea afectado en la reducción de nutrientes, por consiguiente, producciones bajas en cosechas posteriores, lo que podría indicar como causa la degradación del suelo (Vázquez *et al.*, 2020). Por otra parte, la presencia de plagas y enfermedades es superior, amenazando a la comercialización de numerosas flores de verano, rosas, entre otras (Rengifo, 2010). No obstante, el cultivo mencionado se ha visto afectado por fitopatógenos que también pueden perjudicar a una gran variedad de especies vegetales de importancia comercial (Rodríguez y Ossa, 2007), esto se puede notar en partes de la planta como: raíz, tallo, hojas y/o semillas causando un marchitamiento vascular (Revelo, 1991).

El emplear productos químicos, ha constituido la alternativa más común para la protección de los cultivos, sin embargo, su aplicación constante, contamina el medio ambiente, así como también genera problemas en la salud de los productores (Benítez-Díaz y Miranda-Contreras, 2013). Con la finalidad de evitar los problemas mencionados anteriormente, el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIPE) es una de las herramientas que mantiene el nivel del daño por debajo del límite económico aceptable.



Esta forma de control comprende varias técnicas (físicas, mecánicas, químicas, biológicas, genéticas, legales y culturales) (Montoro *et al.*, 2009). Los agentes del control biológico son organismos vivos que tienen como finalidad reducir la población de patógenos que afectan a los cultivos (Izzeddin y Medina, 2011). Por otra parte, aportan nutrientes a la planta por medios biológicos (Motta-Delgado y Murcia-Ordoñez, 2011), intensificando los recursos microbiológicos del suelo permitiendo que los hongos entomopatógenos ejerzan múltiples mecanismos de acción para evitar resistencia de plagas y enfermedades (Rodríguez *et al.*, 2006).

En la actualidad, se conocen una serie de microorganismos con el potencial de ser usados como controladores biológicos; entre ellos el hongo del género *Trichoderma*, un ejemplar ampliamente utilizado dentro de los biocontroladores, capaz de producir enzimas extracelulares, sustancias antibióticas de naturaleza volátil y no volátil y compuestos antifúngicos, a su vez es un fuerte antagonista de otros fitopatógenos por la competencia por espacio y nutrientes, además promueve el crecimiento de las plantas induciéndoles resistencia sistémica (Puño *et al.*, 2011).

## **1.2 Problema de investigación.**

La alternativa más usada para la prevención de enfermedades en flores de corte, es la aplicación de agroquímicos (Hanford *et al.*, 2015) como un método relativamente confiable de protección de malestares transmitidos a través del suelo (Huang *et al.*, 2011); no obstante, su aplicación ha favorecido el desarrollo de patógenos resistentes a los productos químicos como también la acumulación de residuos tóxicos en agua y suelo debido al irrespeto, dosis excesivas e incorrecto uso en un cultivo determinado (Benítez *et al.*, 2004).

A pesar de las alternativas tomadas por los floricultores, la producción intensiva (monocultivo) no es una excepción, el propósito de obtener mejor rentabilidad de esta flor provoca el incremento de enfermedades, el proceso acelerado de la erosión del suelo contaminación por el uso de agroquímicos, entre otros, generando pérdidas no solo en el cultivo, sino también el comercio internacional (Yong y Leyva, 2010).

La pudrición basal del tallo es causada por uno o la combinación de varias especies de hongos fitopatógenos, los cuales ocasionan un daño en la base del tallo y raíces que conduce con posterioridad a la muerte de la planta. Algunas de las enfermedades que

pueden sufrir las plantas de Gypsophila son las siguientes: La pudrición blanda (*Pythium* sp. R. Hesse) (*Fusarium oxysporum* Di Prieto), también se ha reportado la roya blanca del crisantemo (*Puccinia horiana* Henn), la agalla de corona en crisantemo y rosa (*Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend, 1907 Conn, 1942), pudrición basal del tallo en clavel y crisantemo (*Sclerotinia sclerotiorum* Lib. y *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Curzi) Tu & Kimbr)), grupo que presenta mayor la incidencia de enfermedades en las flores de corte, siendo infectada y dañada por más de una especie de hongos fitopatógenos (Solano-Báez *et al.*, 2013).

Por lo mencionado anteriormente, las florícolas buscan alternativas para disminuir no solo el uso de productos químicos en el manejo de enfermedades sino también la contaminación ambiental.

### **1.3 Justificación.**

A pesar de los procedimientos rotativos de desinfecciones del suelo con productos químicos antes de cada plantación, el uso de esquejes de plantas madre libre de enfermedades procedentes del meristemo, no se conoce una forma eficaz de control de enfermedades en la floricultura (Garibaldi y Gullino, 1988).

Investigaciones han demostrado que la pudrición basal no es producida únicamente por fitopatógenos del género *Fusarium*, por ejemplo, en Colombia se identificaron daños de pudrición basal causada por el hongo *Pythium* sp. dañando la base del tallo, inclusive raíces, con la posterior muerte de la planta, logrando disminuir con algunos aislamientos de *Trichoderma* sp., demostrando que tiene una gran actividad antagonista sobre especies patogénicas de *Pythium* sp. (Wolcan *et al.*, 2007).

Escobar *et al.*, (2004), realizaron ensayos en Chile para determinar el grado de efectividad *in vitro* mediante antagonismo metabolitos volátiles y difusibles, así como la respuesta a  $Fe^{3+}$ , salinidad, pH, y temperatura de cuatro cepas de *Trichoderma harzianum* Rifai, como alternativa de control biológico para *Rizoctonia solani* Kühn y *Fusarium solani* Mart, demostrando ser más efectiva la cepa antagonista a *T. harzianum* Rifai T. h 630, al obtener un mejor control sobre las cepas de *R. solani* Kühn y *F. solani* Mart.

En investigaciones realizadas por Galindo y Arbeláez (1995) bajo condiciones comerciales en la empresa Flores La Valvanera, Colombia, se evaluó la actividad

antagónica de los aislamientos T13, T17 y T95 de *Trichoderma harzianum* Rifai para la incidencia de la pudrición basal del tallo causada por el hongo patógeno *Pythium* sp. en *Gypsophila paniculata* L., los tratamientos fueron aplicados durante el enraizamiento de los esquejes dando resultados positivos en contrarrestar la enfermedad con el aislamiento T17 de *Trichoderma harzianum* Rifai, reduciendo de 18.5% a 5.0% la incidencia de la enfermedad.

Algo similar ocurre con el cultivo del tomate (*Solanum lycopersicum* L.) de la familia Solanáceas, donde Sundaramoorthy y Balabaskar (2013), evaluaron la efectividad de *Trichoderma* spp. para controlar la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (FOL) tanto *in vitro* como *in vivo*, se ensayó con 15 hongos antagonistas nativos del género *Trichoderma* del suelo sano del cultivo; en condiciones *in vitro*, los resultados determinaron que el aislado *Trichoderma harzianum* Rifai (ANR-1) inhibió eficazmente el desarrollo micelial radial del patógeno en un 53% a diferencia con todos los demás aislados. Por otra parte, en condiciones de invernadero, pudieron comprobar, aplicación del hongo antagonista del género *Trichoderma* (ANR-1) reveló la menor incidencia de la enfermedad en un 15,33%, sin embargo, la aplicación del mismo mostró un efecto estimulante significativo en altura de la planta (73,62cm) y peso seco (288,38 g) en relación con otros aislados y el control no tratado.

Los problemas de seguridad y salud pública han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas de manejo de plagas y enfermedades que sean más amigables con el ambiente. De esta manera surge el interés por el control biológico al utilizar microorganismos antagonistas que representan una herramienta amigable con los cultivos y el medio ambiente.

Muchas de las enfermedades en las plantas son causadas por bacterias, virus y hongos; Sin embargo, en esta investigación nos centramos en analizar las enfermedades causadas por uno o varios microorganismos que tienen una asociación parasitaria con sus hospederos llevándolos a la muerte.

## **1.4 Objetivos.**

### **1.4.1 Objetivo general**

- Determinar la eficacia de *Trichoderma* sp. en el control del complejo de hongos causantes de la pudrición basal en *Gypsophila paniculata*.

### **1.4.2 Objetivos específicos.**

- Identificar la diversidad de hongos fitopatógenos causantes de la enfermedad pudrición basal.
- Evaluar la severidad de la pudrición basal causada por el complejo de hongos fitopatógenos en plantas de *Gypsophila*.
- Determinar el antagonismo de *Trichoderma* sp. hacia los patógenos causantes de la pudrición basal.

## **1.5 Hipótesis.**

### **1.5.1 Aislamiento de microorganismos.**

Ho: Los hongos fitopatógenos aislados no provocarán diferentes grados de severidad en *Gypsophila*.

Ha: Los hongos fitopatógenos aislados provocarán diferentes grados de severidad en *Gypsophila*. Aislamiento de Microorganismos

### **1.5.2 Fase experimental.**

Ho: Los aislados de *Trichoderma* spp. no tendrán efecto en la inhibición en la pudrición basal.

Ha: Los aislados de *Trichoderma* spp. tendrán efecto en la inhibición en la pudrición basal.

## 2 MARCO TEÓRICO

### 2.1 *Gypsophila paniculata* Linneo.

Es una planta herbácea de duración anual, originaria de Europa y Asia occidental, regiones donde predomina el clima templado. Las especies importantes son *Gypsophila elegans* L. y *Gypsophila paniculata* L. (Casierra-Posada *et al.*, 2010), la cual es tradicionalmente como flor de complemento en arreglos florales y, en menor medida en nuestro medio, también se cultiva como flor de jardín y maceta. (Ávila y Pereyra, 2016).

La altura y el peso de los tallos son parámetros importantes para su comercialización, requiere de suelo con buen contenido de materia orgánica, demanda altas cantidades de calcio, potasio y cantidades normales de fósforo (Vásquez y Loli, 2018).

En la tabla 1 se muestra la clasificación de *Gypsophila paniculata* L.

**Tabla 1**

*Clasificación taxonómica de Gypsophila paniculata.*

<b>Descripción Taxonómica</b>	
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Caryophyllales
Familia	Caryophyllaceae
Género	<i>Gypsophila</i>
Especie	<i>G. paniculata</i>
Nombre común	Velo de novia, Nube, Aliento de bebé.
Nombre científico	<i>Gypsophila paniculata</i> L.

Fuente: Infoagro; (2012).

#### 2.1.1 Morfología.

La información presentada por los autores Posada *et al.* (2010), referente a las partes de *Gypsophila*, se puede describir a continuación:

- **Raíz:** principal y gruesa y ramificaciones secundarias del cultivo de *Gypsophila paniculata* (Figura 1).

### Figura 1

*Raíz de Gypsophila.*



Fuente: Ávila y Pereyra (2016).

- **Tallo:** Leñoso con ramificaciones en su fase de reproducción (Figura 2).

### Figura

*2 Tallo de Gypsophila.*



- **Hojas:** De colores verdes, lanceolados y glaucos (Figura 3).

### Figura 3

*Hojas de plántulas de gypsophila bajo condiciones de invernadero.*

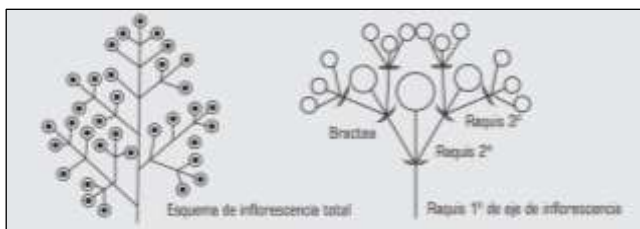


*Nota: plántulas de gypsophila en: a.- Condiciones de invernadero y b.- Maceta para los ensayos preliminares.*

- **Inflorescencia:** Dispuesta en panículas, sus flores son pequeñas de 4-8 mm (Figura 4).

### Figura 4

*Distribución botánica de la inflorescencia del cultivo de Gypsophila.*



Fuente: Ávila y Pereyra (2016).

### **2.1.2 Fase de desarrollo del cultivo de *Gypsophila*.**

Blanco y Barrera; (1992), determinan fases de desarrollo en *Gypsophila paniculata* L. con la finalidad de facilitar el análisis de crecimiento, a continuación, se describen cada una de estas fases.

- *Fase vegetativa.*

Comprende desde la siembra de los esquejes en los invernaderos de enraizamiento hasta la inducción floral de las plantas, se toma muy en cuenta en esta fase el potencial fotosintético porque la planta debe generar área foliar y el sistema radical que soporten el máximo desarrollo de flores bajo cualquier condición de cultivo.

- *Fase reproductiva.*

Corresponde desde la inducción floral hasta el fin de la cosecha, puede variar esta fase de acuerdo con las condiciones agroclimáticas, cabe mencionar que durante la misma se alargan los entrenudos, con la finalidad de tener uniformidad en la distribución de la luz, aquí dependerá la formación y consolidación del número de florecillas (Heslop-Harrison, 1969).

- *Fase de cosecha.*

Pertenece al transcurso de tiempo de producción (primer y último corte de flores) aquí la capacidad de rendimiento dependerá de la cantidad de tallos florales por planta y tamaño.

### **2.1.3 Enfermedades.**

El ataque de enfermedades influye de manera negativa en diversas especies de plantas cultivadas, provocando graves problemas de reducción de productividad y sobrevivencia de los cultivos (López, 2009), generando pérdidas económicas para los agricultores (Cough *et al.*, 2015).

Es conveniente reconocer el impacto por una deficiencia hídrica en las hojas o en tallos y por las enfermedades, así lo aseguran Velasco *et al.* (2003), ellos consideran una limitante para la producción de la misma, debido a que registra daños por marchitez o pudrición basal, de la misma manera, afirman que los inductores de la afección son provocados, tales como: *Verticillium albo-atrum* Reinke y Berthier, *Fusarium oxysporum* (Schlecht.)



Zinder y Hansen., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp., *Sclerotinia* spp. y *Phytophthora cryptogea* Pethybr. y Laff.

Entre las enfermedades más frecuentes que atacan al cultivo de *Gypsophila* está la pudrición blanda en *Gypsophila* causada por *Fusarium* sp. y *Pythium* sp., que produce síntomas de manchas húmedas (Wolcan, *et al.*, 2007). En ese mismo contexto, Ávila y Pereyra (2016), de muestran en sus investigaciones que el decrecimiento del tallo o la pudrición de la corona del mismo, también se puede ver afectado por *Erwinia herbicola* (Burril) patógeno que produce agalla en raíces y corona en el cultivo de *Gypsophila*.

#### 2.1.4 *Pythium*.

El género *Pythium* constituye aproximadamente 120 especies, distribuidas alrededor del mundo, pueden vivir de manera saprófita sobre restos de plantas muertas, a su vez, genera daños tales como pudriciones en raíces, frutos y ahogamiento en plántulas en sistemas de producción, invernaderos, viveros, campos agrícolas; la descripción taxonómica del patógeno correspondiente al género *Pythium* se describe a continuación, de acuerdo con el reporte de Díaz-Celaya *et al.*, (2011) (Tabla 2):

**Tabla 2**

*Clasificación taxonómica de Pythium.*

<b>Descripción Taxonómica</b>	
Reino	Protista
Phylum	Heterokontophyta
Clase	Oomycetes
Orden	Pythiales
Familia	Pythiaceae
Género	<i>Pythium</i>

Entre diversos cultivos que ataca el fitopatógeno, se encuentra en el pepino (*Cucumis sativus* L.), Villanueva, (2018) determina que la producción de cultivo hortícola es perjudicada por el fitopatógeno, ocasionando ahogamiento de semillas y la caída de plántulas, daña frutos, raíces y bases del tallo en plántulas jóvenes.

Por otra parte, los hongos del género *Pythium* juntos a otros microorganismos patógenos, causan síntomas descritos como podredumbre basal, es decir, pudrición en raíces, tallos, hojas, Van-Beneden *et al.*, (2009), aseguran que las prácticas agrícolas como el monocultivo continuo y la fumigación con productos químicos como el bromuro de metilo, son los principales factores para que varios patógenos como (*Sclerotinia* spp.) (*Rhizoctonia solani* Kühn, 1858) (podredumbre de fondo), (*Botrytis cinerea* Whertzel, 1945) (moho gris) y *Pythium* spp. generen resistencia, de esta manera, el rendimiento del cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) disminuyó, generando pérdidas económicas.

En cultivos ornamentales está presente este género, tal es el caso en el cultivo oreja de elefante (*Caladium* Vent, 1858) que son llamativas por sus hojas de colores brillantes. Tras aislamientos del patógeno, Deng *et al.*, (2005) determinaron que la reducción severa del crecimiento del cultivo, rendimiento de tubérculos y valor estético, era provocado por (*Pythium myriotylum* Drechesler, 1930).

### 2.1.5 *Rhizoctonia*.

El género *Rhizoctonia* comprende hongos de importancia agrícola, distribuyéndose al alrededor del mundo, por su compleja taxonomía, se ha hecho confusa su clasificación, esto se debe a que su morfología es muy sencilla y los rasgos fisiológicos y patológicos que usan para su clasificación, varían mucho (González-Hernández, 2002). La descripción taxonómica del patógeno correspondiente al género *Rhizoctonia* se detalla a continuación, de acuerdo con lo señalado por Groenewald, (2006) (Tabla 3):

**Tabla 3**

*Clasificación taxonómica de Rhizoctonia.*

<b>Descripción Taxonómica</b>	
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Hyphomycetes
Orden	Agonomycetales
Familia	Agonomycetaceae
Género	<i>Rhizoctonia</i>

Las enfermedades provocadas por el suelo son el problema económicamente más revelador que enfrentan los productores de invernaderos. Cuando las condiciones favorecen al fitopatógeno, pueden generar resistencia y ocasionar graves daños en cultivos hortícolas, ornamentales, Baysal-Gurel *et al.*, (2019), informaron Las pérdidas de cultivos de esquejes enraizados de cerezo en flor en camas de propagación pueden exceder el 60% debido a la pudrición de la raíz por hongos del género *Rhizoctonia*. Las enfermedades transmitidas por el suelo se han controlado a través de la fumigación del suelo con bromuro de metilo, reduciendo temporalmente la incidencia de la enfermedad, pero generando pérdidas económicas en producciones futuras.

En cultivos florícolas, un control de enfermedades es difícil de determinar, siendo inevitable la investigación específica para la gran variedad de flores existentes. Alvarez *et al.*, (1995), aseguran que, en los invernaderos de Bogotá, son afectados severamente por los hongos del género *Rhizoctonia* sp. y *Pythium* sp., por lo general han disminuido temporalmente con altas dosis de fungicidas, elevando costos de producción, y a la vez generando niveles tóxicos para el medio ambiente y salud humana.

### 2.1.6 *Phytophthora*.

El género *Phytophthora* incluye especies patógenas, provocando enfermedades tanto en ecosistemas naturales como agrícolas, generando daños irreversibles y pérdidas económicas. La descripción taxonómica del patógeno correspondiente al género *Phytophthora* se especifica a continuación, de acuerdo con lo argumentado por (Vaillant-Flores y Gómez-Izaquirre, 2009) (Tabla 4):

**Tabla 4**

*Clasificación taxonómica de Phytophthora.*

<b>Descripción Taxonómica</b>	
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Oomycetes
Orden	Peronosporales
Familia	Peronosporaceae
Género	<i>Phytophthora</i>

Estas especies pueden generar infecciones en un sin número de cultivos ornamentales, si apelamos a ejemplos, Hyeonglin *et al.* (1998), tras muestreos de raíces sintomáticas en cultivos de Lirio (*Lilium candidum* L.), Cactus de navidad (*Schlumbergera truncata* Haw. Morán), cultivos del género *Anthurium*, Gypsophila (*Gypsophila paniculata* L.) y Clavel (*Dianthus caryophyllus* L.), mediante sus aislamientos determinaron que el daño en raíces, podredumbre en el tallo, era ocasionado por *Phytophthora nicotianae* var. De manera similar en sus estudios de Ann y Liu (1993), evaluaron la causa de pudrición en cultivos de Aliento de bebé (*Gypsophila paniculata* L.), donde la mayoría de los casos fueron ocasionados por hongos del género *Phytophthora* presentando sus tejidos flácidos, llenos de agua, color blanco y posterior a ello la muerte. A su vez, el fitopatógeno es asociado en cultivos como la soya (*Glycine max* L.) (López-Casallas *et al.*, 2020), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Bruna y Tobar 2004), ornamentales como la Vinca (*Vinca* sp.) (Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2016), demostraron en sus aislamientos un alto grado de patogenicidad con el fitopatógeno (*P. nicotianae* var.).

### 2.1.7 *Fusarium*

El género *Fusarium* comprende una amplia distribución en cuanto a hospederos, tiene una gran capacidad de ocasionar enfermedades en distintos tipos de plantas cultivadas poniendo a los floricultores en alerta (Soto *et al.*, 2012), porque estos patógenos van generando resistencia hacia los productos químicos; sin embargo estudios demuestran que especies del género *Fusarium* que son benéficas pueden ser utilizadas como control biológico de ciertas enfermedades que son ocasionadas por especies patogénicas (Torres, 2000).

Como se ha afirmado en el párrafo anterior, el fitopatógeno del género *Fusarium* induce enfermedades en varios tipos de cultivos, tal es el caso de la cebolla (*Allium cepa* L.), hortaliza que es afectada por pudriciones radicales, causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. provocando síntomas como amarillamiento en el follaje, marchitez y muerte de la planta, de tal modo de la pudrición radical, se puede manifestar con coloración café o rosada (Pulido-Herrera *et al.*, 2012). Por otra parte, Cardona *et al.* (2012) realizaron muestras al azar para determinar el agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla (*Vanilla planifolia* Jacks. ex Andrews) en cultivos bajo cobertizos en Colombia, a partir de tejidos infectados, obtuvieron 20 aislamientos, cinco de ellos fueron seleccionados

para realizar pruebas de patogenicidad, obtuvieron el agente causal corresponde al hongo *F. oxysporum* f. sp. *vanillae*, a su vez logran identificar los hongos *Phoma* sp., *Lasiodiplodia* sp. y *Bionectria* sp.

En relación con la problemática expuesta, Robles *et al.*, (2016) evaluaron en cultivos de Pino (*Pinus* sp.) en donde observaron tales síntomas, amarillamiento en plántulas en un vivero forestal, en México. Mediante la caracterización morfológica, análisis de secuencias ITS del ADNr, pruebas de patogenicidad, determinar la incidencia y severidad, se obtuvieron aislados pertenecientes al género *Fusarium*, perteneciendo a las especies *F. solani* Mart. y *F. oxysporum* Schltdl.

Considerando que el chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) es un cultivo de importancia agrícola con altas posibilidades de comercialización a nivel mundial, al ser introducido en México aproximadamente en siglo XX, por su demanda de consumo como verdura o por sus propiedades químicas y su extensa siembra, Almaraz-Sánchez *et al.*, (2018) argumentan, que el cultivo ha sido afectado por enfermedades, tales como: marchitez del chile manzano, causada por diversos fitopatógenos por ejemplo: *Botrytis fuckeliana* Whetzel, fitopatógenos del género *Fusarium* y *Phytium*, entre otros, los cuales ocasionan pérdidas significativas en la producción.

La descripción taxonómica del patógeno correspondiente al género *Fusarium* se detalla a continuación, de acuerdo con lo señalado por Groenewald (2006) (Tabla 5):

**Tabla 5**

*Clasificación taxonómica de Fusarium.*

<b>Descripción Taxonómica</b>	
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Deuteromycete
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Fusarium</i>

- Aspectos biológicos de *Fusarium*.

Debido al uso excesivo de plaguicidas, provoca efectos negativos en la producción agrícola, desarrollando resistencia y a la distribución de hongos fitopatógenos (Monzón, 2002). Por otra parte, según Jones *et al.* (1997), la especie de *Fusarium oxysporum* Di Pietro, tiene mucha importancia fitopatológica, debido a que cuenta con mayor número de plantas hospedantes y es una de las especies que tiene la capacidad de atacar un gran número de plantas de importancia agrícola y ocasiona principalmente marchitamiento vascular, culminando con la muerte de la planta.

Si apelamos a ejemplificar, varios países y en distintas estaciones del año, han reportado epidemias graves, causadas por distintas formas especiales del género *Fusarium*, tal es el caso de los cultivos de pimiento (*Capsicum annuum* L.) afectado por, *Fusarium oxysporum* f. sp. capsici., tomate (*Solanum lycopersicum* L.) provocado por *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici y en flores de corte como el clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) ocasionado por *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi entre otros, impulsando a los agricultores a usar suelos donde no están infectados por fitopatógenos y aplicación de agroquímicos, algunas de ellas costosas y no muy eficientes, ocasionando pérdidas económicamente muy significativas (Camargo *et al.*, 1994). Asimismo, estudios realizados en cultivos hortícolas en Perú, como es el caso del ají paprika (*Capsicum annumm* L. (Solanaceae)), Hernández-Amasifuen *et al.*, (2019), realizaron aislamientos e identificaron los causantes de las enfermedades son: *Fusarium* spp., *Phytophthora capsici* Leo. y *Rhizoctonia solani* Kühn; siendo el género *Fusarium* el que se presenta con mayor frecuencia.

- Características de *Fusarium*.

- Microconidios

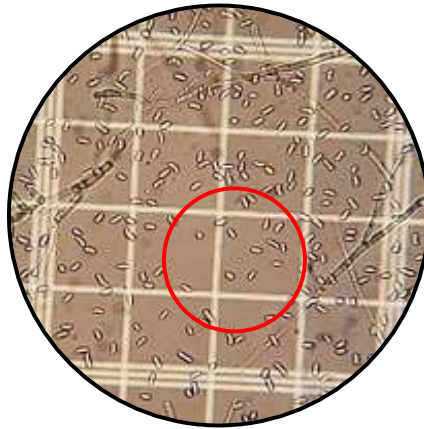
Esporas unicelulares, de pared delgada sin septas, hialinas, de elipsoidales a cilíndricas rectas o curvadas (Figura 5).

- Macroconidios

Esporas de pared delgada, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células y de tres a cinco septas transversales, con la célula basal elongada y la célula basal atenuada (Figura 6).

## Figura 5

*Microconidios del fitopatógeno de Fusarium oxysporum Di Prieto con aumento 40x.*



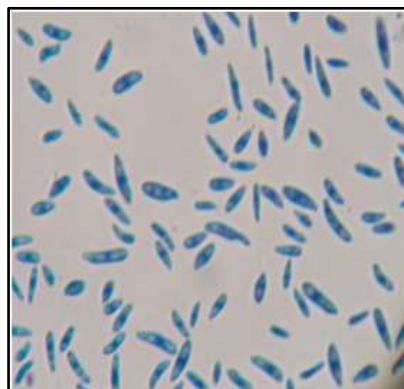
### ➤ Clamidosporas

Esporas formadas de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracterizan por poseer paredes gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes (Torres, 2000).

Los hongos fitopatógenos se encuentran naturalmente en muchos suelos, favorecidos por condiciones climáticas, por exceso de agua, prácticas agrícolas como el monocultivo continuo, se sabe que el cultivo de *Gypsophila* se propaga vegetativamente y con este método pueden mostrarse problemas fitosanitarios, afectando, partes aéreas y partes del suelo, alterando la productividad y calidad.

## Figura 6

*Macroconidios del fitopatógeno de Fusarium oxysporum Di prieto, con aumento 40x.*



Fuente: Barik *et al.* (2010)

## **2.2 Control Biológico.**

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 enfermedades o patógenos (Fernández-Larrea, 2001). Es así que, el control biológico comprende la reducción de la intensidad o las actividades productoras de enfermedades de uno o varios patógenos, lograda, mediante la manipulación del ambiente, del hospedero o de los antagonistas del patógeno o plaga que se quiere controlar (Ezziyani *et al.*, 2006).

Por otra parte, Guerrero y Cadena (2016), cuestionan que, al tener una patogénesis letal de algunos microorganismos patógenos, entre ellos, del género: *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Phytium*, entre otros, el manejo con hongos antagónicos puede afectar a gran especificidad en el control de enfermedades, basándose principalmente en el control/manejo del ambiente y no dañar la biodiversidad (Ortuño *et al.*, 2013).

Debido a la importante necesidad de reducir la incidencia de hongos fitopatógenos, una de las estrategias propuestas para el control de dichas enfermedades es la aplicación de diversos antagonistas biológicos. De esta manera, varias investigaciones han apuntado la posibilidad de empleo (en programas de control integrado de fitopatógenos) de hongos del género, tales como: *Paecilomyces*, *Aschersonia*, *Verticillium*, *Beauveria* y *Metarhizium*. *Lecanicillium*, entre otros (Guédez *et al.*, 2009). Estos agentes pueden ser aplicados de forma inundativa (liberación de enemigos naturales que producen una reducción rápida del daño), con medios convencionales, dado que se multiplican con facilidad y son susceptibles de posterior manejo para la elaboración de formulados insecticidas, donde la eficacia de un producto de estas características reside en la correcta selección de la cepa que formará el ingrediente activo.

Actualmente, entre los efectos más representativos de la aplicación de controles biológicos en la agricultura, se puede mencionar el uso del hongo del género *Trichoderma* para la prevención de enfermedades

## **2.3 *Trichoderma*.**

El género *Trichoderma* es un grupo de hongos ampliamente utilizado por el efecto antagónico contra un amplio rango de fitopatógenos, su eficacia para combatir se ha



convertido en una alternativa para el control biológico debido a sus diferentes modos de acción, además elaboran productos biológicos con características amigables al ambiente (Martínez *et al.*, 2015).

La descripción taxonómica del controlador biológico correspondiente al género *Trichoderma* se especifica a continuación, de acuerdo con lo señalado por Martínez *et al.* (2015) (Tabla 6).

- Aspectos biológicos de *Trichoderma*

Para lograr el control biológico se puede seguir tres vías (Figura 7):

Su efecto como micoparásito natural tiene cualidades para el control de enfermedades en plantas cultivadas en invernadero y en campo, causadas por patógenos fúngicos del suelo. De este modo, la incorporación de materia orgánica, compost y buena humedad con la finalidad de una excelente germinación del hongo a su vez, tiene una velocidad alta de crecimiento, favoreciendo establecimiento en el suelo y control de enfermedades que afectan a los cultivos (Chiriboga *et al.*, 2015).

## Tabla 6

*Clasificación taxonómica de Trichoderma sp.*

Descripción Taxonómica	
Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

- Características de *Trichoderma*

- Fiálide

Lugar en donde se forman las esporas asexuales o conidio, se toma muy en cuenta esta estructura porque sirve para identificación taxonómica a nivel de especies (Infante *et al.*, 2009).

➤ Conidióforos

Aspecto cónico cuando se observa en el microscopio, su gran cantidad de conidios asexuales unicelulares de color verde o hialinos, subglobosos, cilíndricos, oblongos con diámetro de 3 a 5  $\mu\text{m}$  (Martínez *et al.*, 2015).

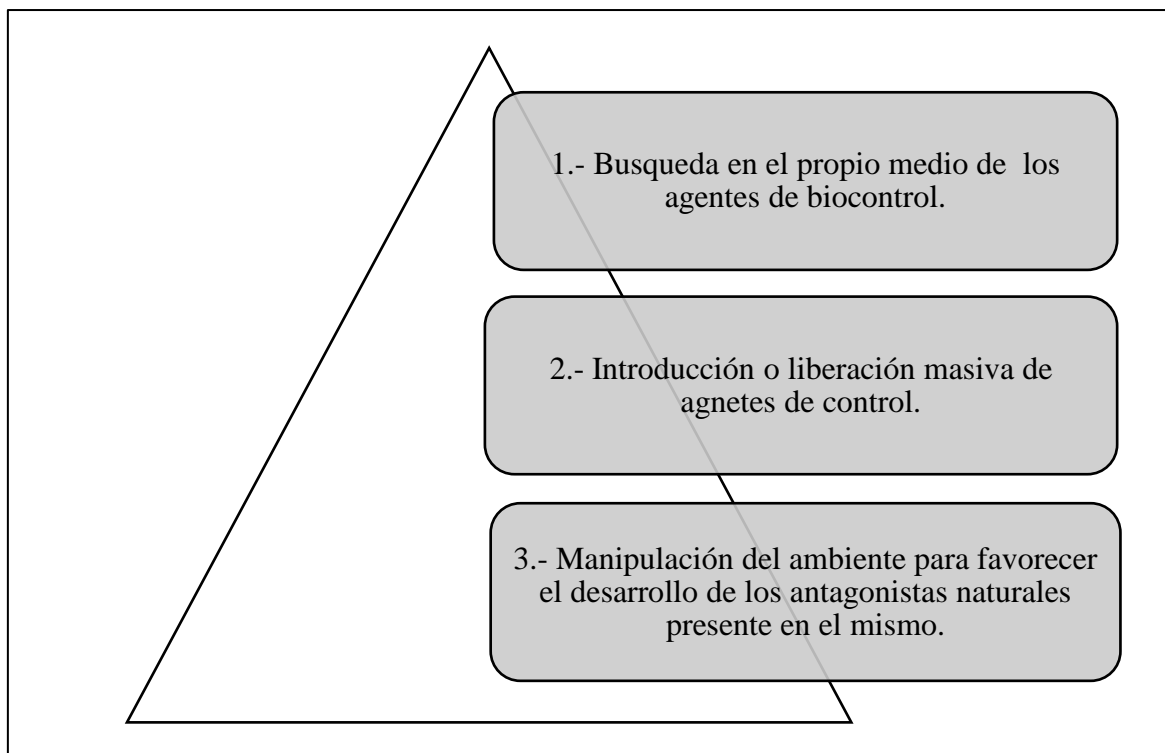
➤ Conidios

De forma globosa a subglobosos, de pared lisa, color verde oliva, una longitud aproximadamente de 3,8 a 4,75 x 2,85 a 3,8  $\mu\text{m}$  (Salazar *et al.*, 2012).

Terminaciones (Conidióforo) donde nace el fiálide, permitiendo el crecimiento de los conidios en el hongo del género *Trichoderma* (Figura 8).

**Figura 7**

*Aspectos para considerar al momento de usar un control biológico.*

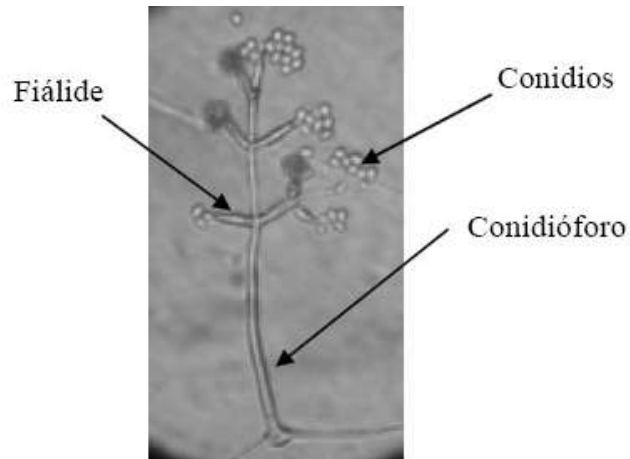


Uno de los efectos positivos de control de las enfermedades ocasionadas por hongos del género *Fusarium*, se ha conseguido con la aplicación de hongos del género *Trichoderma*, por ejemplo, Ruiz y Sánchez (2006) evaluaron en flores de corte como *Gypsophila* (variedades: Million Start y Perfecta) y establecieron que la pudrición basal es provocada

por *F. oxysporum* Di Prieto, *F. solani* Mart. y *F. roseum* (Link.), para ello, probaron la eficacia de productos químicos y el uso de productos biológicos comerciales.

### Figura 8

*Conidios y conidióforos de Trichoderma sp. (40x).*



Fuente: Infante *et al.* (2009)

En cuanto a los tratamientos biológicos, lo más eficaces fueron Fitoderma y T-22 ROOT SHIELD, dando diferencias del 1 y 2 % ante los productos BIOPAK-F y TRUCHI-D, por valores económicos, el adecuado fue BIOPAK-F, teniendo en cuenta su aplicación y eficacia; finalmente, se concluyó que el control *Trichoderma* spp. puede mantener poblaciones estables de patógenos entre 12 y 24 semanas, posibles de controlar a diferencia del control químico que disminuye las poblaciones en 12 semanas, sin embargo, al lapso de 24 semanas, existieron niveles de poblaciones elevados de patógenos.

Por otra parte, se reportan estudios en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Fernández-Herrera *et al.* (2007) realizaron un manejo biológico con un hongo del género *Trichoderma*, para disminuir la incidencia de hongos fitopatógenos de la raíz, *Phytophthora capsici* Leo, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Sacc.). Se inoculó *Phytophthora capsici* ( $5 \times 10^4$  zoosporas  $\text{ml}^{-1}$ ), *Rhizoctonia solani* Kühn (2% de grano infectado, v:v; grano:suelo), *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici (Sacc.), ( $5 \times 10^6$  conidios  $\text{ml}^{-1}$ ) y la mezcla de los tres hongos a la misma concentración. Los datos realizaron a los 50 días después de la inoculación, los resultados

no tuvieron diferencias significativas, sin embargo, la infección realizada por el fitopatógeno *Rhizoctonia solani* Kühn fue disminuida, de tal manera que el tratamiento T22 (*Trichoderma harzianum* Rifai) protegió 100%, a diferencia que los tratamientos Bio, End. y 343 protegieron 73.3%.

#### **2.4 Postulados de Koch.**

Cabrera *et al.* (2004) mencionan que los postulados de Koch, ponen una relación causa efecto entre la enfermedad y los microorganismos a estudiar. De acuerdo con Volcy (2008) los postulados de Koch comprenden:

- Asociación específica del microorganismo putativo con la enfermedad.  
El patógeno debe encontrarse consistentemente asociado con la enfermedad en todas las plantas enfermas que se examinen.
- Concordancia científica entre las evidencias microbiológicas patológicas y clínicas.  
El patógeno debe aislarse y desarrollarse en un cultivo puro en medios nutritivos y se deben describir sus características (parásito no obligado), o bien debe permitirse que se desarrolle sobre una planta hospedera susceptible (parásito obligado) y registrar su presencia y los efectos que produzca.
- Aislamiento en medios de cultivo artificiales  
El patógeno que se desarrolle en un cultivo puro debe ser inoculado en plantas sanas de la misma variedad o especie en que apareció la enfermedad y debe producir la misma enfermedad en las plantas inoculadas (mismos síntomas que enfermedad original).
- Reproducción de la enfermedad para inoculación del organismo cultivado en un hospedero sano.  
El patógeno debe aislarse una vez más en un cultivo puro y sus características deben corresponder a las anotadas en el segundo punto. Estos postulados en ciertos casos han de ser aplicados para realizar un diagnóstico.

## 2.5 Marco legal.

El estudio de la investigación se realizó en base a los lineamientos propuestos en el Art. 71 de la Constitución Nacional de la República del Ecuador, se estableció el Plan Nacional de Desarrollo denominado “Toda una vida” vigente entre las estrategias 2017-2021, con el objetivo tres “Garantizar los derechos de la naturaleza para las actuales y futuras generaciones, en este sentido, implica respetar integralmente sus existencia, el mantenimiento y regeneración de sus ciclos vitales y su restauración en caso de degradación o contaminación. De esa manera en la política 3.4 y 3.5 fomentan la disminución de la contaminación ambiental, por medio de buenas prácticas agrícolas e industriales y sean ejecutadas en pequeñas, medianas y grandes empresas. Este hace un realce en que el uso de especies del género *Trichoderma* promueve el control biológico para fitopatógenos que afecta al cultivo de *Gypsophila* dentro la empresa florícola “Clarivel”, enfocándose un mejor manejo apropiado de plagas y enfermedades.

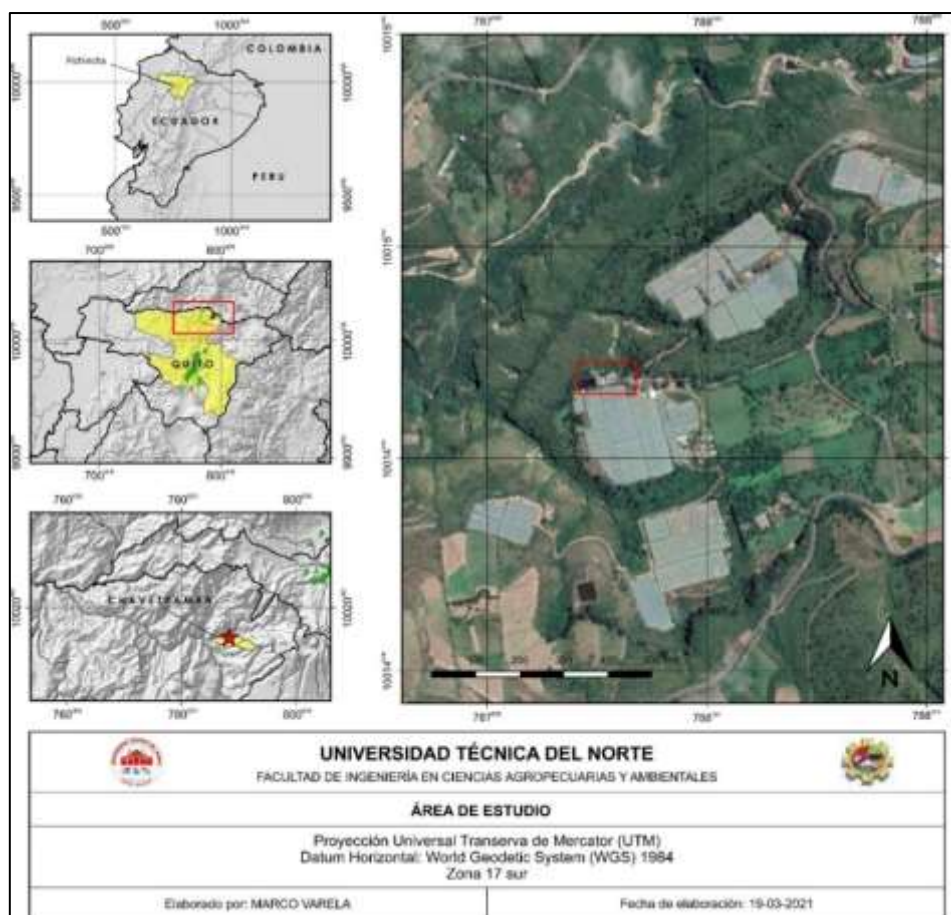
### 3 MARCO METODOLÓGICO

#### 3.1 Descripción del área de estudio.

La investigación se llevó a cabo en la parroquia Chavezpamba, perteneciente al cantón Quito, ubicado en la provincia de Pichincha, Barrio Alobuela, a una altitud de 2 130 msnm, una latitud de 14673.60 y una longitud de 789083.11 (coordenadas UTM) (Figura 9).

**Figura 9**

*Mapa base de ubicación del área de estudio.*



#### 3.2 Condiciones climáticas.

Realizando la toma de datos obtenidos de la empresa florícola “Florisol”, la temperatura promedio anual para el año 2019 corresponde a 24 °C; por otra parte, el Instituto Nacional

de Meteorología e Hidrología, (INAMHI, 2018), señala que la precipitación promedio anual para el mismo año fue de 1222 mm y con una humedad relativa del 70%.

### 3.3 Materiales y métodos.

El material vegetal, material de campo, de oficina, materiales y equipos de laboratorio utilizados en el transcurso de la investigación se detalla en la Tabla 7.

**Tabla 7**

*Materiales y equipos utilizados en la investigación.*

<b>Material vegetal</b>	<b>Materiales de campo</b>	<b>Materiales de oficina</b>	<b>Materiales de laboratorio</b>	<b>Equipos de laboratorio</b>	<b>Reactivos</b>
Plantas sintomáticas Gypsophila variedad “Million Dos”	Fundas plásticas herméticas (10 unidades)	Computador	Platos Petri	Microscopio óptico	PDA (Papa Agar Dextrosa)
	Macetas (120 unidades)	Etiquetas	Ligas de goma	Cámara de flujo laminar	Tween 5%
Plántulas Gypsophila variedad “Million Dos”	Termo higrómetro digital	Esferos	Balanza digital	Cámara de Neubauer	Hipoclorito de Sodio (NaClO) 5,25%
	Regadera	Registro	Parafilm	Incubadora	
	Calibrador Etiquetas		Matraz Tubos de ensayo Tubos eppendorf Gradillas		

### 3.4 Métodos

El experimento consta de dos fases, durante la primera se ejecutó un ensayo preliminar, donde se evaluó el antagonismo mediante confrontación por cultivos duales, de acuerdo con el o los aislados fitopatógenos causantes de la pudrición basal en gypsophila “Million Dos”. La segunda fase inició, una vez que se aplicó el controlador biológico y el patógeno,

se evaluó las variables: longitud de la plántula lesionada en cm de acuerdo con el efecto protectante de las diferentes concentraciones de *Trichoderma* sp. aplicados en el cultivo de *Gypsophila* “Million Dos”, posteriormente fueron tratados con el patógeno que produjeron la mayor severidad de la enfermedad pudrición basal en la fase uno, porcentaje de marchitez y peso fresco del cultivo.

#### **3.4.1 Aislamiento de Microorganismos**

Para poder desarrollar el experimento de la investigación, se hizo un ensayo preliminar, con el que se utilizó material vegetal de la empresa florícola “Clarivel”, para poder aislar en el laboratorio los hongos que estaban presente. Luego del aislamiento, se procedió a repicar para poder tener cultivos puros de los microorganismos. Finalmente, se evaluó mediante confrontación por cultivos duales, para confirmar el antagonismo entre los hongos.

### **3.5 Fase experimental.**

#### **3.5.1 Factor de estudio.**

El factor evaluado en el estudio fue de dosis de *Trichoderma* sp. con cuatro concentraciones hacia los posibles hongos fitopatógenos que produjeron la mayor severidad de la enfermedad pudrición basal en la fase uno.

#### **3.5.2 Tratamientos.**

Los tratamientos evaluados fueron, las concentraciones de *Trichoderma* sp. aplicado en plantas de *gypsophila*. En la Tabla 9, se detalla cada una de ellas.

#### **3.5.3 Diseño experimental.**

El diseño que se utilizó durante la investigación fue DBCA y conformó las siguientes características:



**Tabla 8***Concentraciones de Trichoderma sp.*

Concentración de esporas/ml. del patógeno	N.º de tratamiento	Concentración de esporas/ml. de <i>Trichoderma</i> sp.	Codificación	Descripción de la codificación de la cepa
1 x10 <sup>7</sup>	Sin <i>Trichoderma</i> sp.	1 x10 <sup>0</sup>	T.R.G.E.	<i>Trichoderma</i> , aislado de raíz, cultivo gypsophila "E"
	D1	1 x10 <sup>4</sup>		
	D2	1 x10 <sup>6</sup>		
	D3	1 x10 <sup>8</sup>		

- Características del experimento:
  - Dosificaciones: 4
  - Bloques: 3
  - Total, de unidades experimentales: 120
  - Área total del experimento: 120 m<sup>2</sup>
- Características de la unidad experimental

La unidad experimental estuvo constituida por 10 macetas plásticas (Figura 10), las dimensiones de estas se detallan en la Tabla 10.

**Tabla 9***Medidas de la unidad experimental.*

Unidad experimental	Dimensiones de la maceta (diámetro superior x diámetro inferior)	Altura	Volumen por maceta	Kg de tierra por maceta
10 macetas plásticas	26.5 x 18 cm	0.40 cm	15 l.	5 kg.

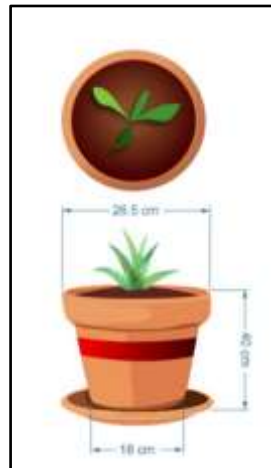
### 3.5.4 Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó empleando el análisis de varianza con nivel de significancia del 5% en el software INFOSTAT 2018, se aplicó el modelo lineal general

y mixto (Tabla 11), para las pruebas se utilizó LSD Fisher 5%, cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza, se realizaron ajustes de datos y transformación (Tabla 12).

**Figura 10**

*Representación de la unidad experimental.*



**Tabla 10**

*Análisis de varianza (ADEVA) para el factor efectividad de Trichoderma sp.*

Fuentes de variación	G.L.
Bloque	2
Concentración	3
Error	6
Total	11

- Diseño de bloque completo al azar.

El diseño para la investigación comprendió en un Diseño en Bloques completos al azar con cuatro dosificaciones y tres bloques, con tres replicas (Figura 11).

**3.6 Variables para evaluarse**

Las variables se evaluaron en la fase dos, fueron tomadas de acuerdo con la conducta de los aislados fitopatógenos.

**Tabla 11**

*Análisis de varianza (ADEVA) para la interacción entre concentración de Trichoderma sp. y la parte de la planta Gypsophila.*

<b>Fuentes de variación</b>	<b>G.L.</b>
Bloque	2
Concentración	3
Parte de la planta	1
Concentración x parte de la planta	3
Error	14
Total	23

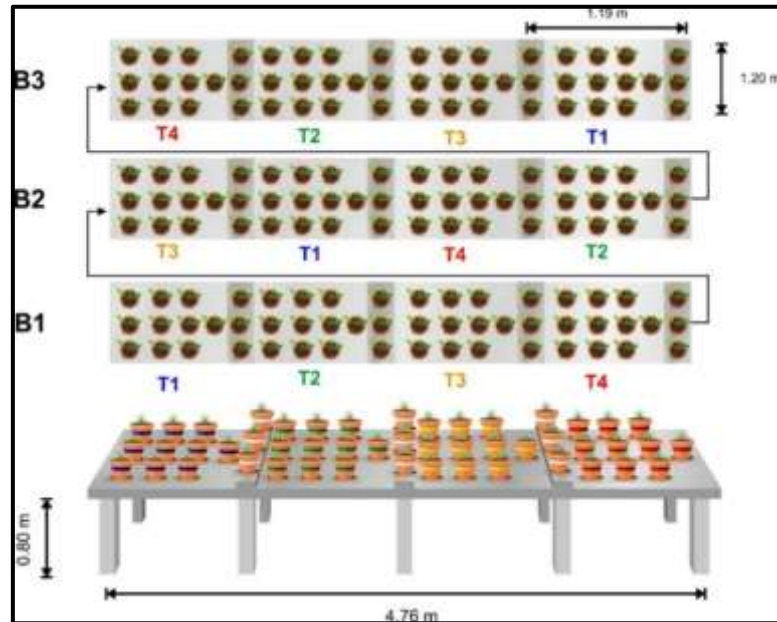
➤ Porcentaje de marchitez.

Para determinar la mortalidad en el cultivo causado por el aislado de fitopatógenos, se realizó en las unidades experimentales bajo condiciones de invernadero con el propósito de ver el tiempo que se tarda en aparecer síntomas de pudrición basal. Para efectuar el daño en cada maceta de gypsophila, previo a la inoculación, el aislado fitopatógeno fue descongelado a temperatura ambiente, colocando 180 µl del hongo conservado, para esto se cultivó en platos Petri con medio PDA (Figura 12) y se incubó durante siete días bajo condiciones de laboratorio de la florícola “Florisol” (25-27 °C). Luego cada hongo fitopatógeno se multiplicó en 5 platos Petri con medio PDA y se incubó bajo las condiciones de laboratorio anteriormente descritas.

Para la cosecha de las conidias de cada hongo fitopatógeno, se añadió 5 ml de agua destilada estéril a cada caja Petri con el hongo. Luego con la ayuda de un cotonete estéril se procedió a coleccionar las esporas formando una mezcla homogénea, la concentración de las conidias se ajustó a  $1 \times 10^7$  conidias/ml de acuerdo con el conteo en microscopio. En el invernadero, a cada planta se le hizo cuatro agujeros equidistantes alrededor de la corona de la planta, con dos cm de profundidad y separados de la planta a un centímetro. En cada agujero se inoculó el patógeno o combinación de patógenos, en una dosis de dos ml de la suspensión de esporas a la concentración antes mencionada (Figura 13).

## Figura 11

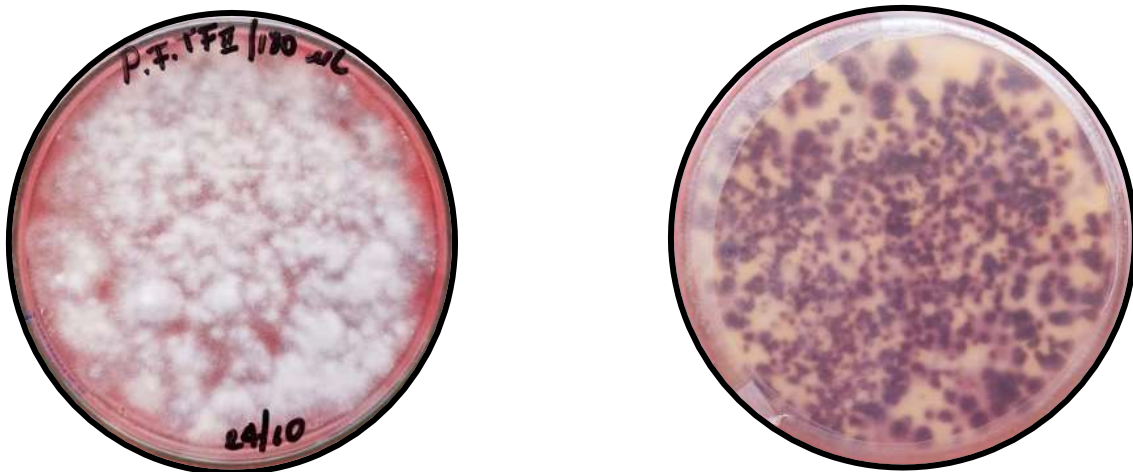
Distribución de las dosificaciones para los aislados fitopatógenos.



**Nota:** T1: concentración 1 ( $1 \times 10^0$  esporas/ml de *Trichoderma* sp.), T2: concentración 2 ( $1 \times 10^4$  esporas/ml de *Trichoderma* sp.), T3: concentración 3 ( $1 \times 10^6$  esporas/ml de *Trichoderma* sp.) y T4: concentración 4 ( $1 \times 10^8$  esporas/ml de *Trichoderma* sp.) B1: Bloque uno, B2: Bloque dos y B3: Bloque tres.

## Figura 12

Activación de conservados previo a la inoculación del fitopatógeno.



### Figura 13

*Inoculación del patógeno en gypsophila "Million Dos"*



- Diferencia de longitud de la planta

Tres semanas luego de ser aplicada las dosificaciones se evaluó el daño provocado por el patógeno o combinación de estos. La medición de la longitud (cm) de la lesión, se realizó con la ayuda de un calibrador (Figura 14), desde la corona del tallo hasta el extremo superior de la planta.

### Figura 14

*Medición de longitud de la planta infectada por el patógeno.*



- Peso fresco de la planta

Al finalizar la aplicación del biocontrolador y el patógeno, se evaluó el peso fresco de la planta, se tomó en cuenta que la fase dos, hubo tratamientos pretratados con *Trichoderma*

sp. y luego con los patógenos, así como tratamientos solo inoculados con patógenos con la finalidad de comparar severidad (Figura 15).

### **Figura 15**

*Peso fresco del material vegetal infestado con el patógeno.*



## **3.7 Manejo específico del experimento.**

### **3.7.1 Aislamientos de Microorganismos**

Preparativos iniciales antes de empezar la inoculación de aislados patógenos.

- Colecta de plantas sintomáticas.

En un muestreo al azar del cultivo gypsophila variedad “Million Dos”, correspondiente a la Florícola “Clarivel”, se realizó la cosecha de plantas sintomáticas incluyendo raíces (15 plantas) las que presentan síntomas de pudrición basal, tales como: plantas con poco desarrollo o crecimiento, raíces y hojas necrosadas, zonas infectadas con tejidos acuosos, entre otros. Cada muestra fue colocada en fundas herméticas, para su posterior tratamiento (Figura 16).

## Figura 16

*Muestreo del cultivo afectado por pudrición basal.*



*Nota: a.- Selección de muestras sintomáticas de gypsophila y b.- Colecta de la muestra selecta (Flecha roja).*

- Desinfección del material vegetal.

Después del muestro y colecta de plantas, se lavó con agua destilada para eliminar los restos de tierra. Se realizó un protocolo de desinfección, para ello se utilizó agua destilada estéril e Hipoclorito de Sodio (NaClO) y se diluyó al 5%, se utilizó la siguiente fórmula  $C_1V_1=C_2V_2$ , donde:

$C_1$ : 5% de NaClO

$V_1$ : Volumen de NaClO con la que se va a trabajar

$C_2$ : 200 ml de agua destilada

$V_2$ : 5,25% NaClO

$$C_1V_1=C_2V_2$$

$$5\% * V_1 = 200 \text{ ml} * 5,25\% \text{ NaClO}$$

$$V_1 = \frac{200 \text{ ml} * 5\% \text{ NaClO}}{5,25\% \text{ NaClO}}$$

$$V_1 = 190,47 \text{ ml de NaClO}$$

**Nota:** Establecimiento de la fórmula y se obtuvo el volumen 1 de NaClO a utilizar en la desinfección del material vegetal.

Las plantas sintomáticas recolectadas se trasladaron al laboratorio de la florícola “Florisol”, el material vegetal a utilizar se inició dividiendo la base del tallo, separando

todas las hojas y la parte de la raíz, se colocó en frascos estériles con agua destilada estéril para apartar residuos de posible contaminación (Figura 17).

Posteriormente, se realizó el lavado de los explantes con 190.47 ml de NaClO aforado a 200 ml con agua destilada estéril, siguiendo el protocolo como lo propone (Bedoya-Pérez *et al.*, 2016) haciendo tres lavados: el primero, se sumergió el material vegetal en la solución aforada durante 30 segundos, inmediatamente se enjuagó en el segundo lavado con 250 ml de agua destilada estéril por 60 segundos, así mismo para el tercer lavado. Se recomienda hacer un cuarto hasta un quinto lavado con la finalidad de que los explantes no tengan sobrantes de Hipoclorito de Sodio.

- Explantes utilizados dentro de la cámara de flujo laminar.

Los explantes desinfectados, se procedió a sembrar en medio de cultivo PDA (Papa Agar Dextrosa) previo a esta actividad se realizó:

- Limpieza con alcohol al 70% y colocación de luz UV en la cámara de flujo laminar 45 minutos antes de entrar con alcohol.
- Se preparó medio de cultivo PDA como lo describe PROBIOTEK (2017), distribuidos en platos Petri de 25 ml.

### Figura 17

*Corte transversal del material vegetal.*



*Nota: a: Selección de tallo y raíz y b: partes del cultivo resposando en agua destilada.*

Una vez pesados los gramos de PDA, se preparó en matraz de Erlenmeyer con 750 ml de agua destilada, agitando frecuentemente hasta obtener una mezcla homogénea,



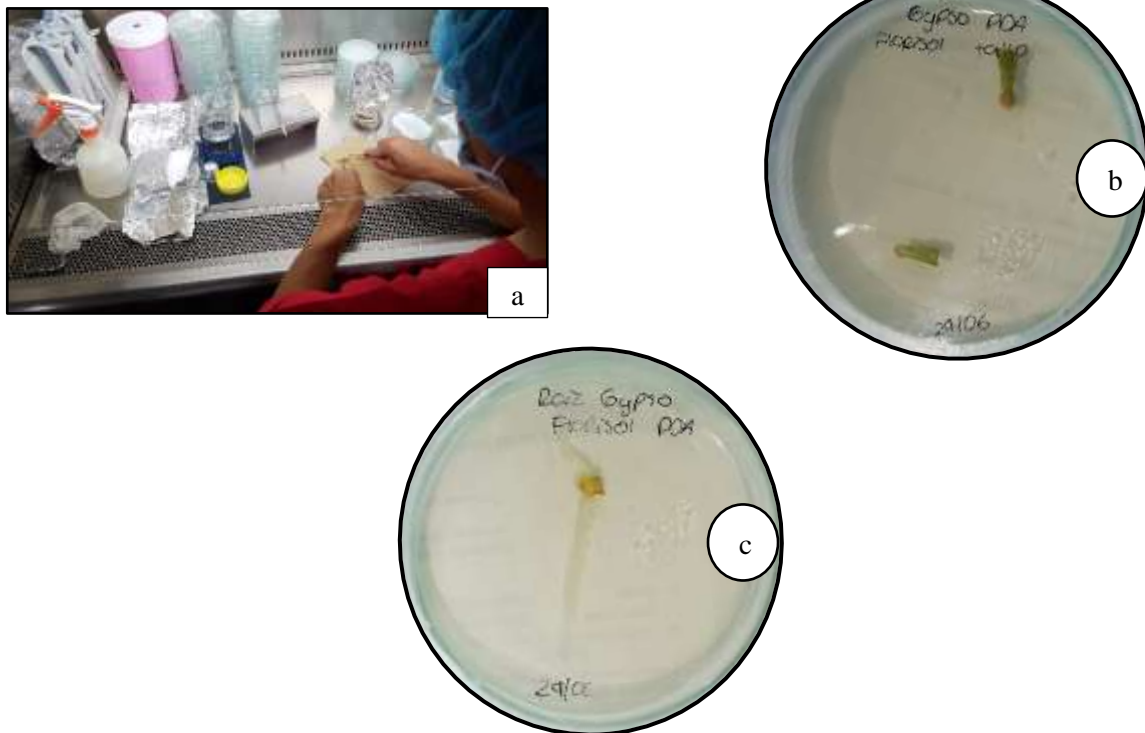
finalmente para su esterilización, se aseguró con papel aluminio y sellar con liga de goma, para evitar derrames al momento de esterilizar.

Se esterilizó en autoclave durante 35 minutos, a 120 °C, a una presión de 1.5 atm (atmósfera), el medio de cultivo, 30 platos Petri (15 para la base del tallo y 15 para raíz), un paquete de servilletas y un paquete de papel filtro, posteriormente enfriar a 45 °C. Esterilizado los materiales y el medio que se utilizó, se procedieron a dispensar el medio de cultivo y esperar hasta que solidifique. Luego con ayuda de pinzas y bisturí, se apartó partes de la raíz, dejando la lesión más afectada del tallo, por separado, se colocó cada uno de los explantes en platos Petri (Figura 18).

Como pasos previos para la identificación morfológica, se hizo una revisión general de todos los platos Petri, a los dos días de haber realizado la siembra del material vegetal, se presencié el desarrollo de hifas en medios de PDA, en los segmentos cortados de la base del tallo y la raíz (Figura 19).

### Figura 18

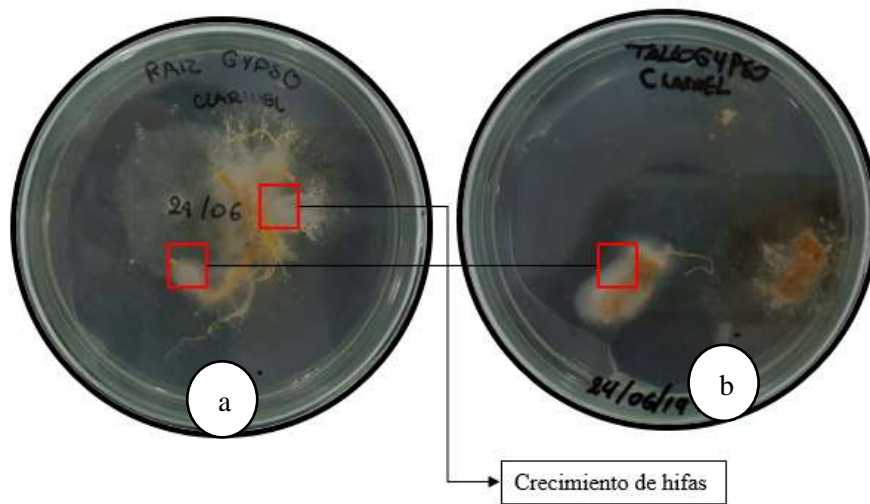
*Explantes utilizados en la cámara de flujo laminar.*



*Nota: a.- Distribución de los explantes, b.- y c.- platos Petri con segmentos tallo y raíz.*

## Figura 19

*Explantos de gypsophila "Million dos" en platos Petri.*



*Nota: a.- y b.- Desarrollo de hifas en la base de raíz y Presencia de hifas en la base de tallo.*

A partir del tercer día se fue observando el crecimiento de los hongos presentes en cada plato Petri. Transcurridos siete días se presenció gran diversidad de microorganismos para ello, se procedió a repicar los posibles hongos fitopatógenos, previo a esta actividad, se preparó 40 cajas con medio de cultivo (PDA).

- Identificación de aislados de hongos fitopatógenos.

Los cultivos monospóricos de los posibles hongos fitopatógenos se observaron e identificaron con la ayuda de la guía Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett y Hunter, 1972). Se desinfectó los materiales y el área donde se procedió a identificar los caracteres morfológicos (Figura 20).

- Conservación de los aislados de hongos fitopatógenos.

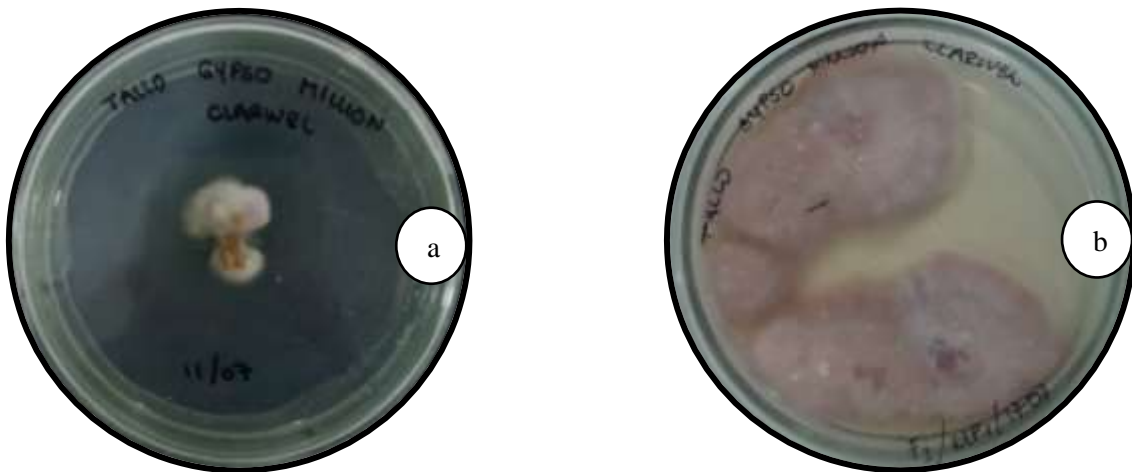
Para preservar de mejor manera los cultivos monospóricos, se emplearon diversos agentes crioprotectores que evitan la formación de cristales y causar efectos negativos a las cepas en la etapa de reactivación, entre ellos el glicerol que penetra de manera intra y extracelular, es altamente hidrofílico, lo cual favorece los puentes de hidrógeno evitando la formación de cristales y en conjunto con el skim milk que permite guardar las cepas a temperaturas inferiores a cero grados centígrados. Para lo cual se realizó la preparación de soluciones de almacenamiento de cepas (figura 21), donde se usó la siguiente fórmula.

Glicerol 10%	Skim Milk 8.5 %
Glicerol 10%	$100 \frac{g}{l} = \text{solución } 100\%$
$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$	$\frac{1g}{10 ml} = \text{solución } 100\%$
$100 * V_1 = 10\% * 100$	$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$
$V_1 = 10 \text{ ml.}$	$100 * V_1 = 8,5\% * 100$
	$V_1 = 8,5 \text{ ml.}$

Se colocó la solución final en un recipiente de vidrio y se autoclavó a 121 °C durante 20 minutos. Seguidamente se trabajó en la cámara de flujo laminar, agregando 700 µl de la solución de glicerol y 700 µl. de la solución de skim milk y una sección del inóculo del hongo, finalmente se selló los Tubos eppendorf con Parafilm y se almacenó a 0 °C (Figura 22).

### Figura 20

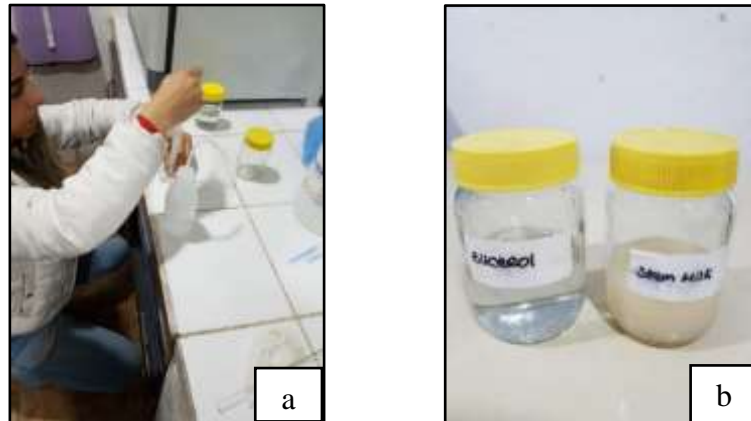
*Identificación morfológica de los Posibles hongos fitopatógenos.*



*Nota: a.- y b.- Medio de cultivo de la base del tallo y crecimiento de hifas.*

## Figura 21

*Preparación de soluciones para la conservación de cepas.*



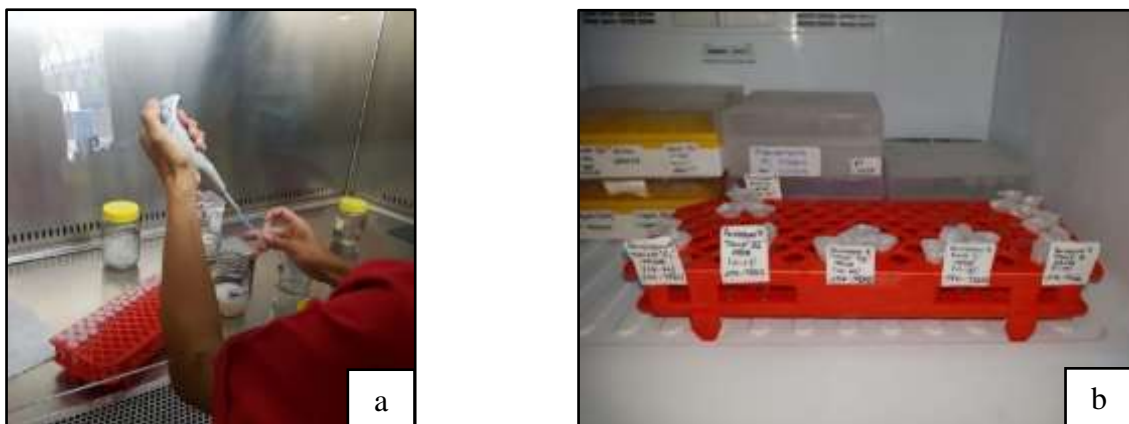
*Nota: a.- Método de preparación para conservación en frío 0°C y b.- Soluciones Glicerol y skim milk preparadas.*

- Inoculación de fitopatógenos

Previo a la inoculación, los posibles microorganismos fitopatógenos, fueron multiplicados a partir de los cultivos conservados, para esto cada microorganismo se sembró en platos Petri con medio PDA y se incubó durante siete días bajo condiciones de laboratorio de la florícola “Florisol” (25-27 °C), luego cada fitopatógeno se multiplicó en aproximadamente 5 platos Petri con medio PDA y se incubó bajo las condiciones anteriormente descritas (Figura 23).

## Figura 22

*Conservación de aislados fitopatógenos*



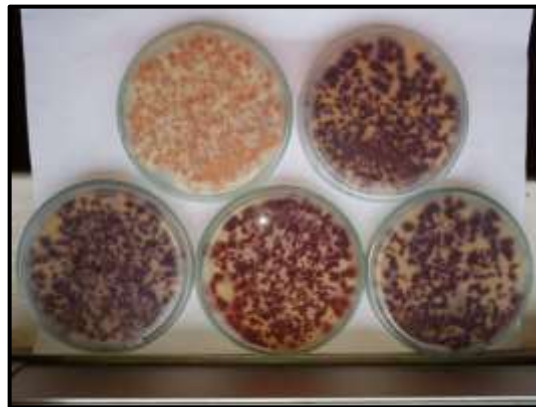
*Nota: a.- Distribución de las soluciones preparadas en Tubos eppendorf b.- Almacenamiento 0°C de cepas puras.*

Para realizar la cosecha de las conidias de cada microorganismo fitopatógeno, se colocaron cinco ml de agua destilada estéril a cada plato Petri con el hongo. Luego con la ayuda de un cotonete estéril se procedió a realizar la cosecha de esporas, las cuales se depositaron en un recipiente plástico aforado a cinco y 10 ml colocando dos capas de gasa estéril en la boquilla del vaso y sujetadas con elástico.

La concentración de las conidias se ajustó a  $1 \times 10^7$  conidias/ml de acuerdo con el conteo en microscopio. En el invernadero, a cada planta se le hizo cuatro agujeros equidistantes alrededor de la corona. Para un aprovechamiento, se realizó tres orificios de dos cm de profundidad y separados de la planta, a un centímetro. Posteriormente en cada agujero se inoculó el patógeno o combinación de patógenos, en una dosis de dos ml de la suspensión de esporas a la concentración antes dicha.

### **Figura 23**

*Multiplicación de cultivos monospóricos de los microorganismos fitopatógenos.*



Realizando cuatro lavados con agua destilada estéril para separar residuos de Hipoclorito de Sodio, el material vegetal se dividió la parte de raíz y base del tallo. Seguidamente se realizó el respectivo proceso dentro de la cámara de flujo laminar, con ayuda de pinzas y bisturí se cortó sobrantes de la raíz y dejando la lesión más afectada del tallo, por separado se colocó cada uno de los explantes en platos Petri (Figura 24).

- Multiplicación de *Trichoderma* sp.

De las muestras obtenidas del posible patógenos, en el laboratorio, se aisló un hongo antagonista, se multiplicó en medio de cultivo PDA. A los siete días se encontró gran

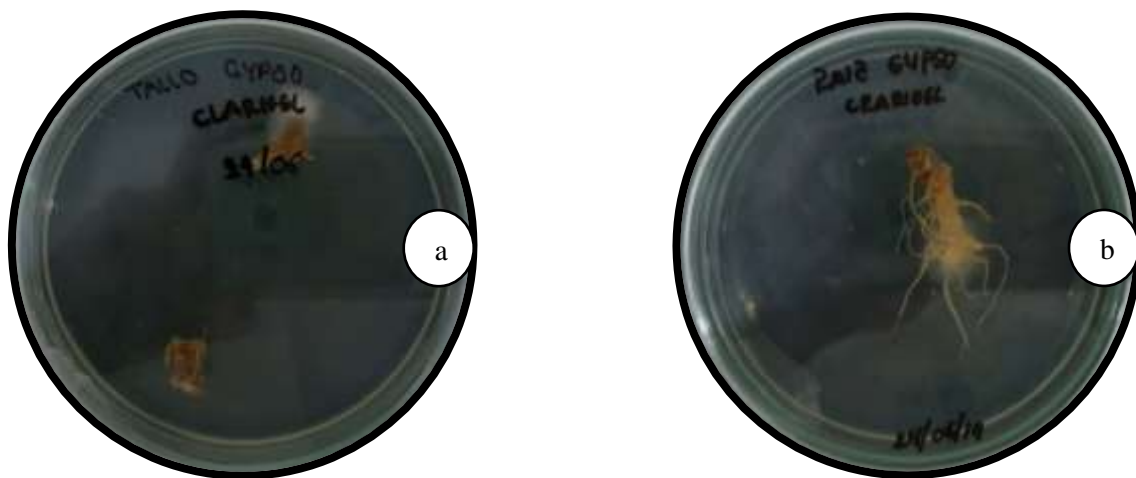
diversidad de hongos, se realizó una caracterización visual en donde se determinó presencia de *Trichoderma* sp. Posterior a ello se realizaron tres repiques para obtener un cultivo más puro, a los cuatro días hubo crecimiento de hifas y pasado los siete días se realizó la identificación morfológica con ayuda de la guía Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett y hunter, 1972) (Figura 25).

- Evaluación *in vitro* de la confrontación de *Trichoderma* sp. hacia los patógenos causantes de la pudrición basal.

Las pruebas de antagonismo se realizaron mediante competencia (espacio-nutrientes), donde, fue el enfrentamiento del patógeno y el antagonista en una caja Petri con medio PDA.

#### Figura 24

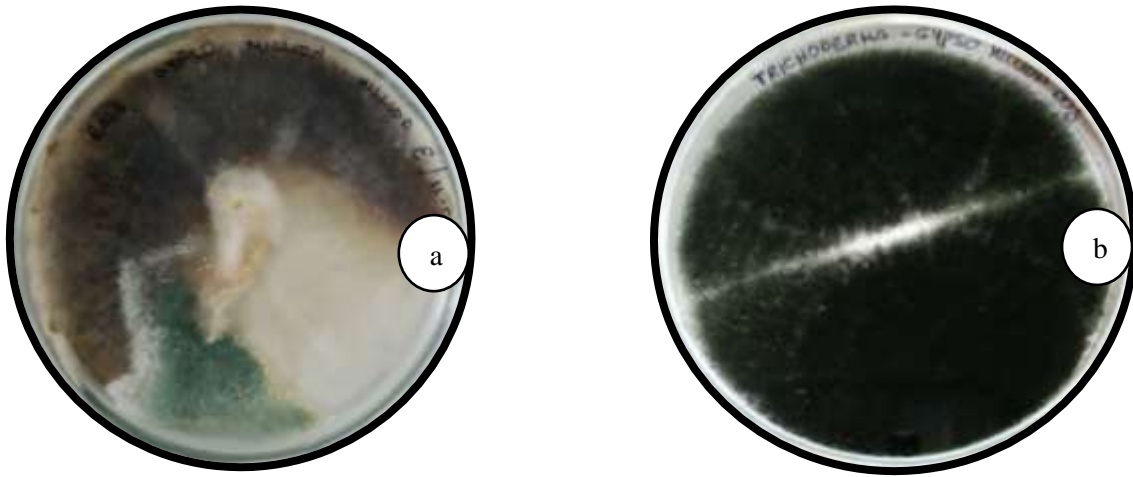
Siembra del material de *Gypsophila* "Million Dos".



Nota: **a.-** Segmento base del tallo; **b.-** Segmento de raíz.

## Figura 25

*Aislamiento del posible controlador biológico.*

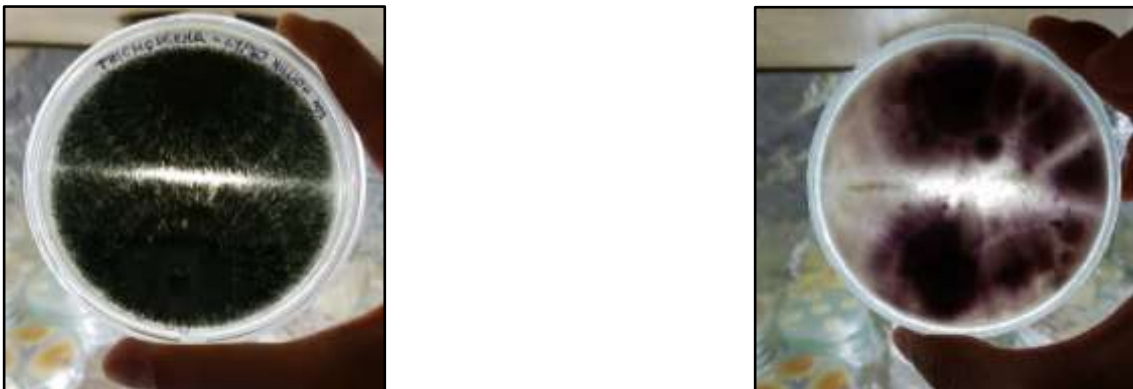


*Nota: a.- Diversidad de microorganismos; b.- Cultivo monospórico del posible antagonista.*

Los hongos fueron cultivados de manera individual en platos Petri. Posteriormente se realizó medios de cultivo para colocar en puntos opuestos el fitopatógeno y el controlador biológico. La evaluación se realizó, por medio de caracterización macroscópica de cada aislado, identificando el tipo de micelio y coloración de colonia (superficie y reverso) cada 24h, según las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1972).

## Figura 26

*Cultivos monospóricos controlador biológico y el fitopatógeno.*



### 3.7.2 Fase experimental

Evaluación del peso fresco, longitud de la planta, porcentaje de mortalidad.

- Propagación de plantas madre, mediante siembra de esquejes.

Se realizó la cosecha 252 esquejes provenientes de plantas madre de *Gypsophila* “Million dos”, se tomaron directamente del tallo, separándolos de la base central y seguidamente se trasladó al cuarto frío para su previa siembra. La propagación vegetativa, es un método donde se empleó con la finalidad de mantener uniformidad en crecimiento, alta productividad entre, otros. Así lo confirma, Durán (1974), menciona en sus estudios, sobre dicha reproducción, el rendimiento en el cultivo de *Gypsophila* tiene un crecimiento parejo y una floración uniforme.

Por otra parte, se preparó el sustrato a colocar en bandejas plásticas de germinación 12x7 (96 cavidades), seguidamente se trasladó el material vegetal del cuarto frío e inmediatamente en el invernadero de enraizamiento se colocó hormona de crecimiento en la parte del corte y se sembró los esquejes de *Gypsophila* (Figura 27).

- Desinfección del suelo

Para efectuar la fase experimental, se recolectaron 627 kg de tierra proveniente del suelo donde se recolectó las plantas sintomáticas. Se esterilizó de acuerdo con los protocolos que se manejan en la florícola “Florisol”. Se fue colocando 6 kg de tierra en fundas plásticas por cada esterilización en el autoclave hasta completar los 627 kg. Cada desinfección se realizó a 121°C durante 35 minutos, finalmente se dejó reposar las muestras de tierra para su total enfriamiento (Figura 28).

- Establecimiento e inoculación en plantas *Gypsophila* “Million Dos”.

Colocado el suelo esterilizado en cada maceta, se plantaron 120 esquejes de *Gypsophila* “Million Dos”. Por otra parte, las aplicaciones de *Trichoderma* se realizaron cada 15 días, para un total de 2 aplicaciones luego de la plantación.



## Figura 27

*Proceso por seguir para la siembra de Gypsophila "Million Dos".*



*Nota: Por ejemplo, a.- Colocación de sustrato en bandejas y b.- Siembra de esquejes de Gypsophila bajo condiciones de invernadero.*

Para esto, ocho mililitros del aislado de *Trichoderma* sp. y de acuerdo con la concentración a evaluar se aplicó a la corona de cada planta a través del riego. Al cuarto día de la plantación se inoculó el o los microorganismos causantes de la mayor severidad de la enfermedad pudrición basal de acuerdo con los resultados de la fase 1.

## Figura 28

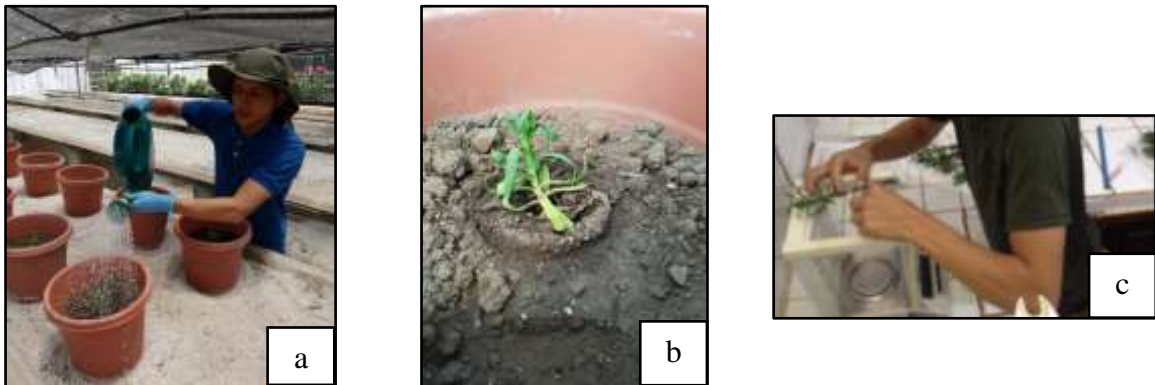
*Esterilización de suelo, previo a la siembra de esquejes de Gypsophila.*



A los 23 días luego de haber aplicado los tratamientos se evaluó el porcentaje de marchitez a las unidades experimentales. Seguidamente, con la ayuda de una regla se midió la longitud en cm de la planta desde la corona de la planta hasta el extremo superior y peso fresco de la planta, se realizó con la ayuda de una balanza digital (Figura 29). Se tomó en cuenta que en la fase 2 existieron tratamientos pre-tratados con *Trichoderma* y luego con los microorganismos fitopatógenos, así como tratamientos solo inoculados con los patógenos para comparar las severidades.

### Figura 29

*Inoculación del patógeno y evaluación de variables.*



*Nota: a.- Riego al cultivo de Gypsophila "Million Dos"; b.- Evaluación del porcentaje de marchitez; c.- Medición de las variables: tamaño y peso fresco de gypsophila.*

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados obtenidos del estudio referente a la efectividad de *Trichoderma* sp. para control de hongos causantes de la pudrición basal en gypsophila “Million Dos”; la investigación constó de dos fases, iniciando con el aislamiento, identificación, caracterización, conservación de cepas del posible antagonista y fitopatógeno, además, se evaluó *in vitro*, el antagonismo mediante competencia de nutrientes, hasta la segunda fase que fue la inoculación de los aislados fitopatógenos y el controlador biológico. Una vez realizada la investigación, se realizó la evaluación de las variables, porcentaje de marchitez, longitud y peso fresco del cultivo de *Gypsophila*, finalmente, se procedió al análisis de los datos obtenidos en las dos fases de campo; los aislamientos fueron conservados para estudios posteriores y forman parte de la colección del laboratorio de la florícola “Florisol”.

### 4.1 Obtención de cultivos del controlador biológico y el fitopatógeno.

En los muestreos se incluyó la empresa florícola “Clarivel”, en ella se consiguieron siete aislamientos del fitopatógeno y uno del controlador biológico donde la purificación de las cepas se realizó en el laboratorio de la empresa florícola “Florisol” (Tabla 13).

**Tabla 12**

*Número de microorganismos aislados del muestro en el cultivo de Gypsophila.*

<b>Empresa</b>	<b>Número de cepas</b>
Florícola “Clarivel”	7 posibles fitopatógenos
<b>Total</b>	1 controlador biológico <b>8</b>

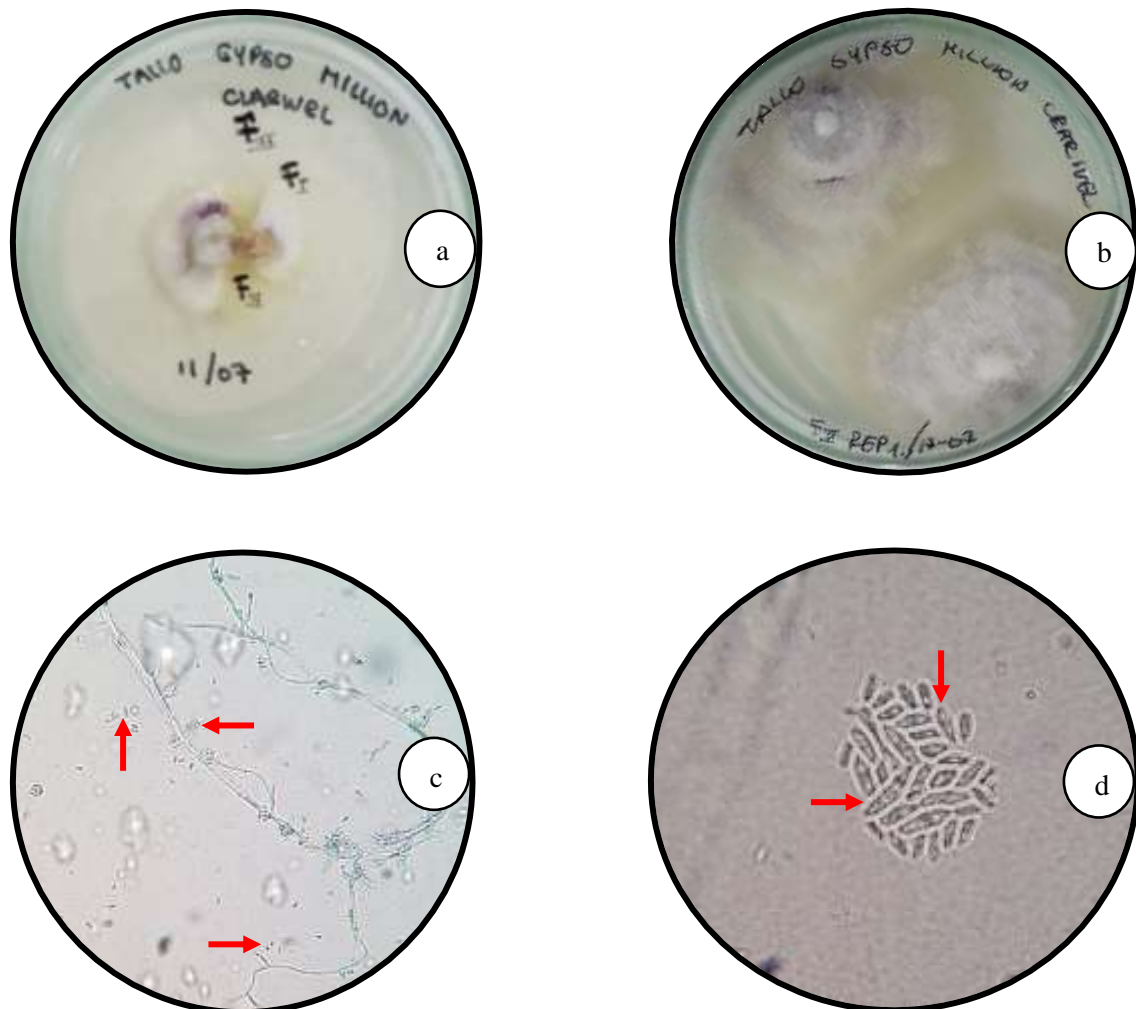
### 4.2 Identificación, caracterización de aislados fitopatógenos de *Gypsophila* “Million Dos”.

Para la identificación de los microorganismos, se cubrió el portaobjetos con una cinta adhesiva que contenían micelio activo y esporas de cada aislado de hongo y se tiñó con una gota de azul de lactofenol, finalmente se realizaron observaciones en el microscopio óptico.

El género *Fusarium* fue identificado al realizarse el aislamiento de las muestras colectadas en campo. Las características del cultivo son descritas a continuación: micelio aéreo, color rosa pálido a morado intenso con textura algodonosa, desarrollo de macroconidios y microconidios (Figura 30). Lo anteriormente descrito coincide con lo reportado por Rivera-Jiménez *et al.* (2018), quienes tuvieron características similares en los aislados obtenidos por ellos en medios de cultivo PDA e identificados con posterioridad como *F. oxysporum* Di Prieto.

### Figura 30

Características macroscópicas y microscópicas presentadas por *Fusarium* sp. en cultivos PDA.



Nota: **a.-** Aislamiento del fitopatógeno de la parte del tallo de gypsophila "Million Dos", **b.-** Cultivo monospórico, **c.-** Macroconidios con aumento 40x (flecha roja) y **d.-** Macroconidios con aumento 100x (flecha roja).

Resultados similares fueron reportados por Lezcano *et al.*, (2012) donde aislaron de semillas de guaje (*Leucaena leucocephala* Lam.), se observaron colonias de crecimiento rápido (con 64 mm como promedio al séptimo día de incubación). A su vez, presentaron un micelio aéreo abundante y algodonoso, de color blanquecino, con tonalidades rosa y morado y desde el punto de vista morfológico, los aislamientos se caracterizaron por presentar conidióforos que surgieron lateralmente de las hifas en el micelio aéreo, simples y ramificados, desarrollo de macroconidios hialinos y microconidios. Con referencia a los macroconidios, Sitton y Cook (1981), argumenta que estas estructuras del género *Fusarium* constituyen una importante fuente de inoculo y se convierten en el suelo en clamidosporas, donde pueden sobrevivir durante años para posteriormente germinar infectando las raíces de las plantas.

De modo idéntico, sucedió en la investigación de Retana *et al.*, (2018), donde afirman que los hongos del género *Fusarium* han provocado marchitez en cultivos de apio (*Apium graveolens* L.). Identificaron y describieron de manera morfológica a los patógenos que se aislaron a partir de plantas enfermas provenientes de campo, presentando los siguientes problemas: retraso en la tasa de crecimiento, amarillamiento, marchitez en el follaje y tallo con presencia de necrosis. mostraron características, tales como: desarrollo de colonias de apariencia algodonosa y de color rosado en los primeros días, posteriormente, a medida que iban desarrollándose, tomaron una tonalidad de color morado en el centro del medio de cultivo, con producción abundante de macro y microconidios.

#### **4.3 Identificación, caracterización de aislados biocontrolador de *Gypsophila* “Million Dos”.**

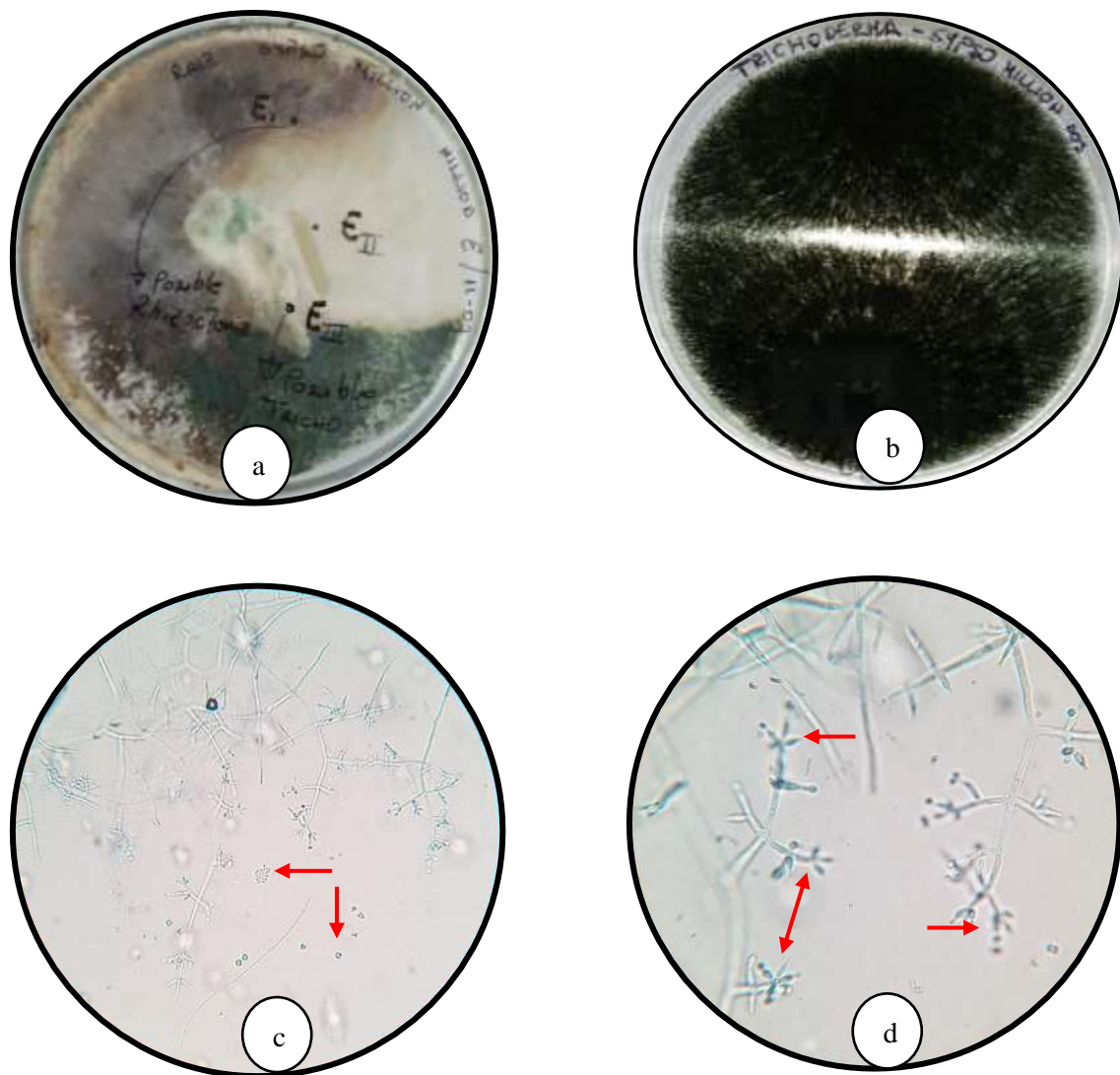
De las mismas 15 muestras colectadas en campo anteriormente detalladas y siguiendo el criterio establecido por Barnett y Hunter (1972), la cepa de *Trichoderma* sp. se compararon e identificaron morfológicamente características como: colonias de color verde claro a oscuro, textura polvosa, micelio, conidióforos y conidios de color verde, ramificaciones en forma piramidal, encontrando semejanza con biocontrolador *T. harzianum* Rifai (Figura 31).

La identificación obtenida del controlador biológico coincide con los reportes de García-Núñez *et al.*, (2017), donde determinaron mediante características morfológicas macroscópicas tales como: textura del micelio, pigmentación de las conidias y esporas las

cepas del género *Trichoderma*, y microscópicas tales como: la forma de las conidias, fialides y conidióforos.

### Figura 31

*Características macroscópicas y microscópicas presentadas por Trichoderma sp. en medio PDA.*



*Nota: a.- Aislamiento del controlador biológico de la parte de raíz de gypsophila “Million Dos” (Flecha roja), b.- Cultivo monospórico, c.- Conidios redondos y elipsoidales con aumento 40x (Flecha roja) y d.- Fialides en forma de racimo con aumento 100x (Flecha roja).*

Por otra parte, García-Núñez *et al.*, (2012), aislaron 10 cepas nativas del género *Trichoderma* de suelos hortícolas del valle de Toluca, México, algunas de las cuales en evaluaciones de antagonismo *in vitro*, señalan un alto potencial para el control de la pudrición blanda (*Sclerotinia* sp.) en lechuga (*Lactusa sativa* L.), no obstante, manifiestan que no se identificaron a nivel molecular, por lo que de importancia conocer a que especie pertenecen, así como su efecto de biocontrol sobre otros patógenos.

Algunas especies del género *Trichoderma* son reconocidas como agentes de biocontrol con amplio aspecto de acción hacia los microorganismos fitopatógenos, usando mecanismos de acción tales como: competencia, micoparasitismo y antibiosis.

#### 4.4 Porcentaje de marchitez.

Los resultados indican que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de *Trichoderma* sp. ( $p= 0.1874$ ) para el porcentaje de marchitez de *Fusarium* sp. (Tabla 13), los síntomas se presentaron a partir del día 23 después de la aplicación del patógeno. Sin embargo, las plantas sin *Trichoderma* sp. presentaron un porcentaje de marchitez 30%, mientras que a la concentración de  $1 \times 10^4$  mostró un 23%, seguido de la concentración de  $1 \times 10^8$  esporas/ml con 20%, finalmente con concentración de  $1 \times 10^6$  el porcentaje de marchitez fue de aproximadamente 7%.

**Tabla 13**

*ADEVA para la variable porcentaje de marchitez*

Fuente de variación	Grados de libertad F. V	Grados de libertad Error	Valor F	Valor P
Concentración	3	6	2.21	0.1874

En el testigo comenzaron a aparecer síntomas de la enfermedad a los 16 días después de la inoculación de *Fusarium* sp., mientras que, en el resto de los tratamientos, estos se hicieron visibles a partir del día 24 a pesar de haber aplicado un biocontrolador como *Trichoderma* sp. antes que *Fusarium* sp. Es importante señalar que el tratamiento con menor porcentaje de marchitez fue D2 (6.67%) lo que podría indicar, un efecto positivo del hongo empleado como controlador (Tabla 14), como lo han señalado Cubillos *et al.*

(2011), quienes demostraron un efecto protectante al utilizar cepas nativas y comerciales de *Trichoderma sp.* contra *F. solani* Mart. en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims, 1818), obteniendo 100% de recuperación del antagonista.

Por otra parte, luego de los 24 días de haber aplicado tanto *Trichoderma sp.* como el fitopatógeno, en el tratamiento D2 se puede apreciar que no existen diferencias significativas, debido a que se consiguió menos marchitez con una media del 6.67, lo que se puede determinar como un efecto positivo del hongo *Fusarium sp.* (Tabla 10). Por su parte Cevallos (2010), determinan la eficacia de una cepa biocontroladora del género *Trichoderma* sobre el complejo “marchitez del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.)” argumenta que las cepas del controlador biológico, son aptos de inducir resistencia sistémica en el cultivo, ya que aplicadas en la rizosfera la protegen de patógenos del suelo o foliares, además explica un rápido crecimiento y desarrollo, a su vez indica que produce un gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos.

**Tabla 14**

*Efecto de concentración de Trichoderma sp. en porcentaje de marchitez.*

Concentración de <i>Fusarium sp.</i> (esporas/ml)	Codificación de las concentraciones de <i>Trichoderma sp.</i>	Concentración de <i>Trichoderma sp.</i> (esporas/ml)	$\mu \pm ee$
	Sin <i>Trichoderma sp.</i>	$1 \times 10^0$	$30.00 \pm 0.00$
$1 \times 10^7$	D1	$1 \times 10^4$	$23.33 \pm 13.33$
	D2	$1 \times 10^6$	$6.67 \pm 3.33$
	D3	$1 \times 10^8$	$20.00 \pm 10.00$

Eraso-Insuasty *et al.*, (2014), relacionan la baja producción del cultivo de arveja con la enfermedad denominada marchitez vascular, causada por *F. oxysporum* f. sp. (pisi). Realizaron la evaluación del amarillamiento de arveja, mediante la capacidad antagónica del hongo *Trichoderma* sobre el fitopatógeno del género *Fusarium*, las cepas nativas fueron aisladas de las rizósfera de cultivos sanos y uso de una cepa comercial del biocontrolador. Se evaluó *in vitro*, el crecimiento micelial y halo de inhibición en simbras duales, señalando que hubo buena actividad antagónica en condiciones de laboratorio y las cepas C14 y C21 presentaron mejor actividad antagónica, por consiguiente,



recomiendan el uso del agente biocontrolador del género *Trichoderma* en el manejo de *F. oxysporum* f. sp. (pisi) en arveja (*Pisum sativum* L.).

En la investigación realizada *in vitro* por Guédez *et al.*, (2012), reportaron la evaluación de aislados de *T. harzianum* Rifai para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn, *Sclerotium rolfsii* Sacc. (Curzi) Tu & Kimbr) y hongos del género *Fusarium* causantes de pudriciones y la muerte de la planta en semilleros y plantaciones de tomate, obtuvieron 6 aislamientos nativos de *T. harzianum* Rifai, el antagonismo se evaluó en laboratorio mediante cultivos duales, colocando a cada extremo el biocontrolador y cada patógeno usando medios de cultivo PDA. De esta manera determinaron un rápido crecimiento al comparar el desarrollo de los aislamientos de *T. harzianum* Rifai con el de los hongos patógenos obteniendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Finalmente concluyeron que la inoculación anticipada en semilleros y plantaciones, redujeron la presencia de los patógenos *R. solani* Kühn, *S. rolfsii* Sacc. (Curzi) Tu & Kimbr) y *F. oxysporum* Di Prieto, permitiendo que no proliferen poblaciones elevadas del fitopatógeno cerca de las plantas.

#### **4.5 Antagonismo de *Trichoderma* sp. frente a *Fusarium* sp.**

En cuanto a la determinación del antagonismo de *Trichoderma* sp. hacia el fitopatógeno causante de la pudrición basal en el cultivo de *Gypsophila*, su evaluación fue *in vitro* en de laboratorio, mediante competencia (espacio-nutrientes), para la valoración correspondiente (Figura 32).

En condiciones de laboratorio (28 °C), a los tres días se observó crecimiento micelial en los dos hongos, sin embargo, los mecanismos que actúa el hongo del género *Trichoderma*, por medio de una competencia por nutrientes, producción de metabolitos antifúngicos, enzimas hidrolíticas y micoparasitismo (Páez, *et al.*, 2007), a los cinco días de competencia por nutrientes, *Trichoderma* sp. presentó el aumento radial, donde las hifas iniciaron con una coloración blanca a color verde, con una consistencia polvosa (Figura 33).

Alrededor de los 15 días de la siembra, se pudo evidenciar de manera macroscópica tanto del biocontrolador, como el fitopatógeno, se pudo determinar fácilmente, la acción antagónica de *Trichoderma* sp. *in vitro*, impidiendo el crecimiento de *Fusarium* sp. (Figura 34).

**Figura 32**

*Cultivo dual entre Trichoderma sp. frente a Fusarium sp.*



*Nota: Al extremo superior se encuentra el fitopatógeno Fusarium sp., mientras en la parte inferior el biocontrolador Trichoderma sp. en medio PDA.*

**Figura 33**

*Competencia por nutrientes y espacio, durante cinco días.*



### Figura 34

*Acción antagónica del controlador biológico Trichoderma sp. vs. el fitopatógeno Fusarium sp.*



Estas observaciones, se relacionan también con los estudios realizados en el cultivo de maracuyá por Suárez-Meza *et al.*, (2008), quienes indicaron el principal problema del cultivo es la marchitez, que está asociado al patógeno *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., de tal modo, se determinó el antagonismo *in vitro* de aislados de *Trichoderma harzianum* Rifai, frente a *F. solani* (Mart.), utilizando cepas comerciales y nativas del biocontrolador del género *Trichoderma* y la técnica de cultivo dual con Agar Sabouraud, se pudo evaluar por competencia de nutrientes y espacio, micoparasitismo y porcentaje de inhibición del crecimiento radial, donde consideraron que todos los aislados nativos y a su vez comerciales, demostraron antagonismo *in vitro* de *T. harzianum* Rifai, sobre *F. solani* (Mart.).

Por otra parte, Rodríguez-García y Wang-Wong (2020), orientaron la búsqueda de alternativas para el manejo de fitopatógenos como el *Fusarium spp.* que afecta al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.), con antagonistas que sean eficientes y compatibles con el ambiente y a su vez, disminuir la incidencia que provoca este patógeno. Se emplearon aislados antagónicos comerciales y nativos, por medio de la técnica de cultivo dual, evaluaron los radios de crecimiento del antagonista y del patógeno. En cuanto a los resultados, obtuvieron diferencias significativas en la capacidad antagónica de las

especies de *Trichoderma* frente al fitopatógeno del género *Fusarium*. Las cepas del antagonista biocontrolador, demostraron ser más agresivas en el combate del patógeno.

En efecto, una vez que los hongos del género *Trichoderma* estuvieron en contacto con diferentes patógenos, se puede asumir que tuvo una tasa de incorporación de nutrientes, crecimiento micelial superior a hongos del género *Fusarium*, manejando varios mecanismos como secreción de enzimas hidrolíticas, entre ellas celulasas, quitinasas, glucanasas, xylasas y muchas veces las proteasas, aunque el crecimiento o comportamiento de los microorganismos no es el mismo en laboratorio que en el campo, las cepas del género *Trichoderma*, pueden estar implicadas en los mecanismos de biocontrol, permitiéndole al antagonista aprovechar mejor los nutrientes del medio y privar al patógeno de utilizar los recursos, así lo asegura Samuels (1996), la presencia de forma natural de *Trichoderma* en diferentes suelos (agrícolas, forestales, en barbechos), se considera una evidencia de la plasticidad ecológica de este hongo y de su habilidad como excelente competidor por espacio y recursos nutricionales, aunque la competencia depende de la especie.

#### 4.6 Diferencia de longitud.

Los resultados del análisis de varianza para la variable diferencia de longitud, indica que existe una diferencia significativa ( $F=7.34$ ;  $gl= 3,114$ ;  $p= 0.0002$ ) entre las concentraciones en estudio (Tabla 15).

**Tabla 15**

*ADEVA para la variable diferencia de longitud.*

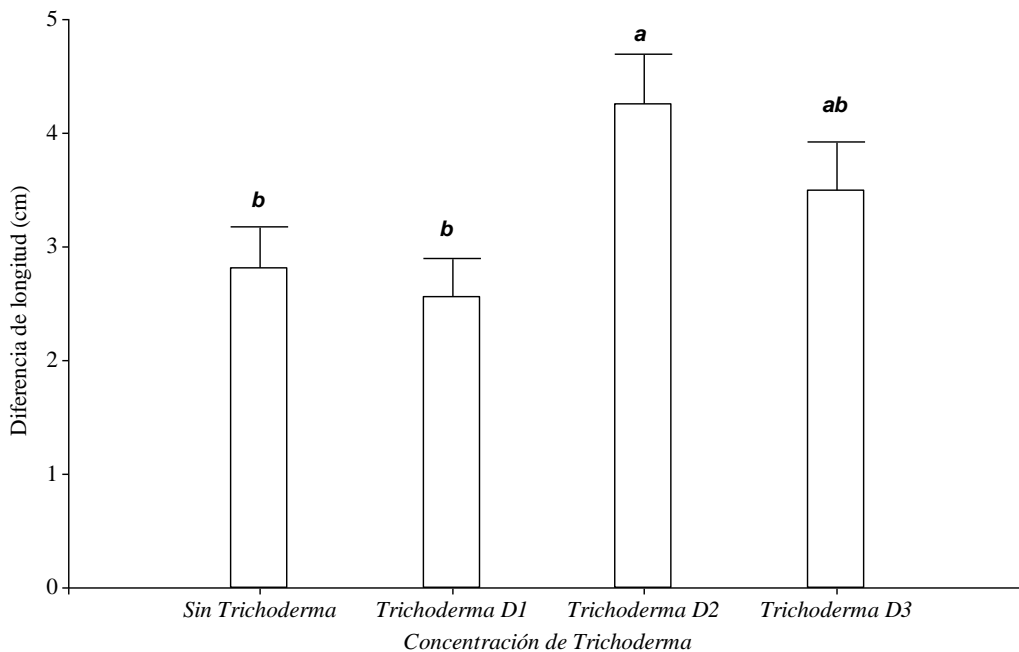
Fuente de variación	Grados de libertad F. V	Grados de libertad Error	Valor F	Valor P
Concentración	3	114	7.34	0.0002

En la figura 35, se puede determinar la relación entre la diferencia de longitud del cultivo evaluado en función a la concentración de *Trichoderma* sp., a los 24 días se observó que la concentración  $1 \times 10^6$  esporas/ml de *Trichoderma* sp. presentó mayor longitud con una media superior de 4.26 cm, 85.2% más alto de diferencia la concentración D2, que la concentración D1 ( $1 \times 10^4$  esporas/ml de *Trichoderma* sp. y  $1 \times 10^7$  esporas/ml de

*Fusarium* sp.) (Figura 36). De la Torres de la cruz *et al.*, (2015), aseguran que diversas especies del género *Trichoderma* están asociadas con la rizósfera de plantas o pueden relacionarse de manera endofítica, por lo que es importante el buen manejo y uso, promoviendo el crecimiento y desarrollo de las plantas.

### Figura 35

*Diferencia de longitud de cultivo de gypsophila en relación con las concentraciones de Trichoderma sp.*



Diversos estudios han comprobado las cepas del género *Trichoderma*, con excelentes resultados, respecto a la capacidad antagonista, favoreciendo un mejor crecimiento de lagunas variables agronómicas como, por ejemplo: productividad, altura de la planta, entre otras. Tal es el caso de Hernández *et al.* (2011), quienes realizaron estudios *in vitro*, donde caracterizaron molecular y agronómicamente aislados de *Trichoderma* sp. para hongos fitopatógenos, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. y del género *Fusarium*, que afectan severamente a cultivos de sorgo (*Sorghum* spp.), maíz (*Zea mays* L.) y frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

Con el uso de cepas nativas del género *Trichoderma*, determinaron una concentración intermedia  $1 \times 10^4$  esporas/ml, obtuvo diferencias significativas, por consiguiente,

permitiendo la inhibición frente a los patógenos causantes de las enfermedades y favoreciendo en el desarrollo óptimo de la altura de la planta y la biomasa producida.

### Figura 36

*Longitud del cultivo Gypsophila a diferentes concentraciones.*



*Nota: a.- Concentración  $1 \times 10^4$  esporas/ml de Trichoderma sp. y b.- Crecimiento del cultivo de Gypsophila con concentración  $1 \times 10^6$  esporas/ml de Trichoderma sp.*

De forma similar, Sabando-Ávila *et al.* (2017), evaluaron el efecto de una cepa comercial TRICHO-D® WP a base de *T. harzianum* Rifai en pre-siembra en cultivo de piña (*Ananas comosus* L. Merr.), que es severamente afectado por pudriciones causadas por *Fusarium* sp. y *Thielaviopsis paradoxa* Dade C. Moreau. Mediante aplicaciones en campo, señalaron para la variable altura de la planta, como positivo la inoculación de las dosis 600 y 800 g/ha con una concentración  $1 \times 10^8$  ufc/g<sup>-1</sup>, sin embargo, donde existió una mejor actividad antagonista fue en la aplicación de 400 y 800 g/ha obtuvieron un mayor número de hojas por planta.

En consecuencia, el uso de hongos del género *Trichoderma* en pre siembra actúa como un buen bioestimulante para diferentes cultivos, por ejemplo, Larios *et al.* (2019) argumentan con su investigación al biocontrol de *Damping off* y promoción del crecimiento vegetativo en plantas de *Capsicum chinense* (Jacq) con *Trichoderma* spp., la altura de la planta presenta diferencias significativas ( $F= 8.65$ ,  $p= 0.00001$ ). Es así que la inoculación anticipada en el cultivo permitió mayor altura en el cultivo de tomate (5.8 cm) en comparación con el resto de los tratamientos, donde los valores oscilaron entre 5.2 a 5.5 cm. Dentro de este orden de ideas, Yedidia *et al.* (2001) mencionan el uso de controladores biológicos en sistemas de producción agrícola, como es el caso de cultivos

hidropónicos donde comprueban como efecto positivo, la inoculación de plantas de pepino con *T. harzianum* Rifai, aumenta la longitud, peso seco, área foliar y clorofila, incrementando entre el 35 y 70% tanto en este sistema de cultivo como en condiciones de invernadero (suelo).

#### 4.7 Peso fresco del cultivo *Gypsophila*.

Los resultados de análisis de varianza mostraron interacción (F= 3.48; gl= 3,230; p= 0.0167) entre la concentración de *Trichoderma* sp. y la parte de la planta para la variable peso fresco. Por otro lado, para la parte de la planta existen diferencias significativas (F=118.22; gl=1,230; p= 0.0001) independientemente de la concentración. Sin embargo, no existen diferencias significativas (F= 1.15; gl= 3,230; p= 0.3290) entre concentraciones independientemente de la parte de la planta (Tabla 16).

**Tabla 16**

*ADEVA para la variable peso fresco del cultivo.*

Fuente de variación	Grados de libertad F. V	Grados de libertad Error	Valor F	Valor P
Concentración	3		1.15	0.3290
Parte	1	230	118.22	<0.0001
Concentración: Parte	3		3.48	0.0167

En la figura 37, se puede decir que el promedio del peso fresco de las plantas de *Gypsophila* en función de las concentraciones aplicadas, fue superior el tratamiento D2, con la concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml, con una media de 3.08 g, el patógeno con una concentración de  $1 \times 10^7$  esporas/ml existiendo una diferencia significativa con respecto a las concentraciones.

Los valores obtenidos para la parte de la raíz (Figura 38) no mostraron diferencia significativa con una media de 1.30 g, para las concentraciones D1 y D3, para las concentraciones sin *Trichoderma* sp. y D2 presentaron una media 1.20 y 0.90 g; esto puede ser debido a la ventaja que tiene el hongo del género *Trichoderma*.

Al ser un controlador antagónico (Figura 39), puede adaptarse y vivir en suelos con contenidos de alta incidencia de productos químicos, esto se debe a su potencialidad de

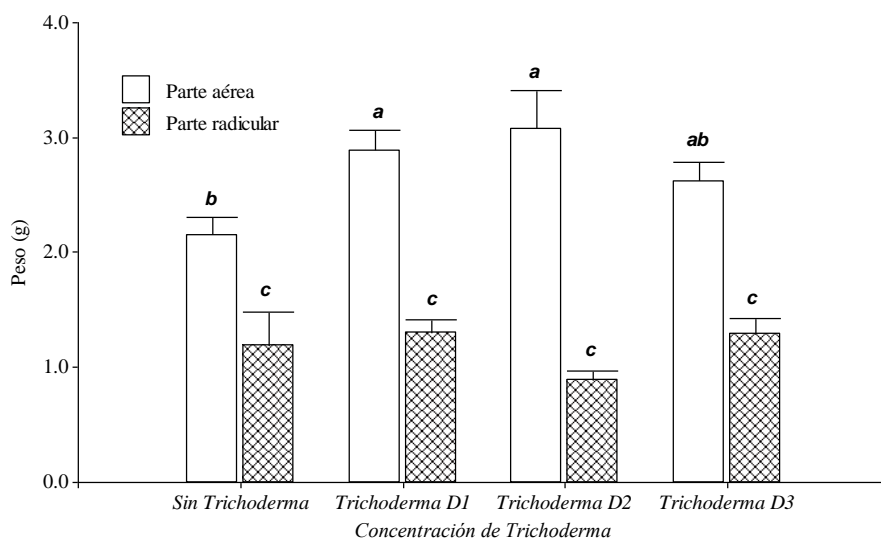
extraer nutrientes de los hongos que degrada, ayudando a la descomposición, dando como favorecido su efecto al mezclar en la siembra materia orgánica y materiales compostados (Ahmad y Baker, 1987).

Algo semejante ocurre con las investigaciones realizada por Naseby *et al.* (2001), al evaluar el efecto de las cepas de control biológico de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de guisantes, las poblaciones de *Pythium ultimum* Trow, las comunidades microbianas y las actividades enzimáticas del suelo, donde todas las cepas de del género *Trichoderma* redujeron el número de lesiones causadas por *Pythium* sp. y aumentaron el número de raíces laterales.

La inoculación con *Trichoderma* sp., nativas, cepas TH1 y T4 resultaron significativamente mayores en pesos de raíces (62 % y 57 %) en presencia de *Pythium* sp., en consecuencia, el uso de controladores biológicos nativos como el *Trichoderma* sp. tienen una mayor actividad antagonista, permitiendo el control de hongos fitopatógenos que afectan a la actividad agrícola.

**Figura 37**

*Peso fresco del cultivo de gypsophila en función de las concentraciones de Trichoderma sp.*





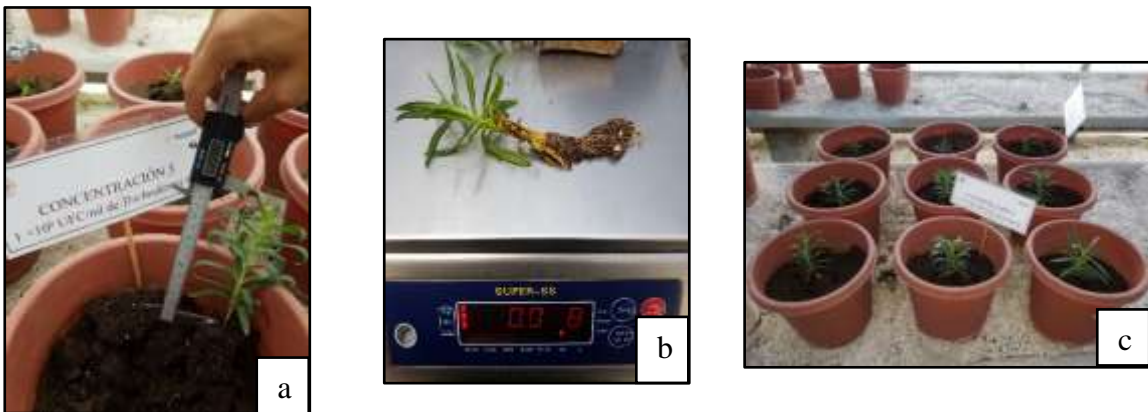
### Figura 38

Condición morfológica del cultivo de *Gypsophila* aplicado el biocontrolador y el fitopatógeno *Fusarium* sp.



### Figura 39

Concentraciones de *Trichoderma* sp. aplicadas para la variable peso fresco del cultivo de *Gypsophila*.



Nota: **a.-** Hace referencia a la medida del cultivo., mientras que **b.-** Representa al pesaje en fresco del cultivo en una concentración  $1 \times 10^6$  esporas/ml y **c.-** Tratamiento D2 ( $1 \times 10^6$  esporas/ml), con respuesta a favor al *Trichoderma* sp.

Según Companioni *et al.* (2019), las especies del género *Trichoderma* se caracterizan por su mayor capacidad a la hora de colonizar un espacio, es así que su capacidad saprofita les permite utilizar un amplio rango de sustratos y compiten de forma directa por nutrientes en el medio, permitiendo reducir la enfermedad; otro ejemplo al evaluar el efecto de dos hongos antagónicos (*Trichoderma harzianum* Rifai y *Trichoderma viride*

(Bayman y Radka. 1997)) en el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Cif y *Par. evans* et. al) en Perú, inocularon al follaje cada 14 días hasta completar 10 inoculaciones, los resultados obtenidos permitieron la disminución tanto la incidencia 21.5% con *T. harzianum* Rifai y 19.36% con *T. viride* (Bayman y Radka. 1997), como la severidad con 5.77 % con *T. harzianum* Rifai 5.19% con *T. viride* de la monillasis en el cultivo de cacao. Por otra parte, Butt y Copping, (2000); Ezziyyani *et al.*, (2004) y Woo y Lorito (2006); mencionan que alrededor del 90% de los biocontroladores agrícolas que se comercializan en el mercado para biocontrol de fitopatógenos de plantas, teniendo como principio activo (conidios y clamidiosporas) de *Trichoderma* sp., en tal sentido, su aplicación aporta al desarrollo sostenible de la agricultura y permite responder a la demanda de cultivos de mejor calidad.

## 5 CONCLUSIONES

- Tras realizar los aislamientos de los microorganismos en la empresa florícola “Florisol”, se identificaron ocho cepas de hongos, de las cuales una cepa corresponde al género *Fusarium* y otra al género *Trichoderma*, considerando como controlador biológico. Las seis cepas restantes, se conservaron para análisis futuros.
- La cepa nativa T.R.G.E. de *Trichoderma* sp. de la empresa florícola “Clarivel”, demostró actividad inhibitoria ante el crecimiento de *Fusarium* sp. en laboratorio y bajo condiciones semicontroladas en invernadero.
- La severidad de pudrición basal en el cultivo *Gypsophila* bajo condiciones de invernadero, se presentó tras inocular *Fusarium* sp. con una concentración  $1 \times 10^7$  esporas/ml.
- A pesar de no obtener diferencias significativas en el porcentaje de marchitez, la cepa nativa T.R.G.E. de *Trichoderma* sp. ( $1 \times 10^6$  esporas/ml) de la empresa florícola “Clarivel”, mostró ser antagónica y estimulante para el crecimiento en el cultivo de *Gypsophila* (menor porcentaje de marchitez con una media de 6.67).

## 6 RECOMENDACIONES

- Realizar la identificación molecular de la especie nativa P.F.T.FII del género *Fusarium*, para determinar la especie.
- Identificar tanto morfológica como molecularmente, las seis cepas nativas restantes encontradas para que puedan ser utilizadas en futuras investigaciones en la empresa.
- Continuar con investigaciones referentes a la búsqueda y uso de cepas locales en las fincas Florisol y Clarivel, para plantear un plan de manejo de las enfermedades presentes en el cultivo de *Gypsophila*.
- Ampliar las investigaciones con los resultados obtenidos en este trabajo para poder aplicar en campo, *Trichoderma* sp. como controlador biológico del cultivo.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, J.S. y Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77, 182-189.
- Almaraz-Sánchez, A., Ayala-Escobar, V., Tlatilpa-Santamaría, I.F. y Nieto-Ángel, D. (2018). *Fusarium sambucinum* Fuckel agente causal de la pudrición de frutos de chile manzano (*Capsicum pubescens* R. y P.) en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(1) 159-169. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1810-2>
- Alvarez, H., Quinchua, W., de Granada, E., y Bustos, I. (1995). Eficiencia de cepas de *Trichoderma* sp. En el control de *Phytium* sp. y *Rhizoctonia solani* en *Gypsophila paniculata*. *Agricultura Tropical*, 32(2), 85–93.
- Álvarez-Rodríguez, B., Carrillo-Fasio, J., A., García-Estrada, R., S., Allende-Molar, R., Santos Cervantes, M., E. (2016). Caracterización de *Phytophthora nicotianae* causante de tizón de vinca en áreas urbanas y viveros de ornamentales en Culiacán, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(3), 242-257. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-1>
- Ann, P. J., y Liu, S. S. (1993). *Phytophthora* wilt of baby's breath. *Plant Pathology Bulletin*, 2(2), 106-110.
- Ávila, A. y Pereyra, S. (2016). *Cultivo de Gypsophila*. Córdoba: Programa Protri.
- Barik, B.P., Tayung, K., Jagadev, P.N. y Dutta, S.K. (2010). Colocación filogenética de un hongo endofítico *Fusarium oxysporum* aislado de rizomas de *Acorus calamus* con actividad antimicrobiana. *Revista europea de ciencias biológicas*, 2, 8-16.
- Barnett, H. y Hunter, B. (1972). *Illustrated genera of imperfect Fungi*. San Pablo.
- Baysal-Gurel, F., Kabir, M., N y Liyanapathiranage, P. (2019). Efecto de los insumos orgánicos y la solarización para la supresión de *Rhizoctonia solani* en la producción de plantas ornamentales leñosas. *Plantas*, 8(5), 138.
- Bedoya-Pérez, J. C, Sánchez-Jaramillo, C.Y, Bermúdez-Gómez, S.M. y Ramírez, S. (2016). Estandarización de un protocolo de desinfección y establecimiento de

cultivo in vitro de *Aloysia tripphilla*. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 14(2), 38-46.

Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C. y Codón, A. C. (2004). Mecanismos de biocontrol de las cepas de *Trichoderma*. *Microbiología Internacional: El Diario Oficial de la Sociedad Española de Microbiología*, 7(4), 249-260.

Benítez-Díaz, P. y Miranda-Contreras, L. (2013). Contaminación de aguas superficiales por residuos de plaguicidas en Venezuela y otros países de Latinoamérica. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 7 23.

Blanco, G. A. y Barrera, A. C. de. (1992). Crecimiento y producción en tres clones de *Gypsophila paniculata* L. cultivadas bajo idénticas condiciones de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 9(1), 119-130.

Bruna V., A. y Tobar C., G. (2004). Determinación de *Phytophthora nicotianae*, causante del cancro del tallo de tomate en Chile. *Agricultura Técnica*, 64(3), 314-318. <https://doi.org/10.4067/S0365-28072004000300013>

Butt, T. M. y Copping, L.G. (2000). Agentes de control biológico fúngico. *Perspectivas de plaguicidas*, 11(5), 186-191.

Cabrera, M., Sosa de Castro, N., Álvarez, R. y Sosa, Á. (2004) Identificación de patógenos fúngicos causantes del atizonamiento en lluvia de oro (*Cassia fistula* L.) en corrientes, Argentina. *Agricultura Técnica*, 64(2), 213-217.

Camargo, O., Sanabria, J., Arbeláez G. y OSPINA, J. (1994). Influencia del tipo de planta, respuesta del hospedante a la infección y tratamiento del suelo sobre la dinámica de la población de *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi en un suelo colombiano. *Agronomía Colombiana*, 11:118-130.

Cardona, C., Marín M. y Díez, M. (2012). Identificación del agente causal de la pudrición basal del tallo de vainilla en cultivos bajo cobertizos en Colombia. *Revista mexicana de micología*, 35, 23–34.

Casierra-Posada, F. Peña-Olmos, J. y Villareal, A.R. (2010). Crecimiento y producción de *Gypsophila paniculata* en respuesta al termoperiodo, confinamiento y despunte. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 4(2), 199-208.

- Castro, M. (2017). *Análisis comercial del sector florícola ecuatoriano y el impacto de los tratados internacionales en este sector: Período 2010 – 2016* [Tesis de maestría, Universidad de Especialidades Espíritu Santo] <http://repositorio.uees.edu.ec/handle/123456789/1761>.
- Cevallos, S. (2010). Estudios de eficacia de *Trichoderma* CEPA G008 sobre el complejo “Marchitez del Tomate” (*Lycopersicon esculentum* Mill). [Tesis de grado previa a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo]. <http://repositorio.educacionsuperior.gob.ec/handle/28000/965>
- Chiriboga, H., Gómez, G., y Garcés, K. (2015). *Protocolos para formulación y aplicación del bio-insumo: Trichoderma ssp. para el control biológico de enfermedades*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). <https://repositorio.iica.int/handle/11324/2647>.
- Companioni, B., Domínguez, G. y García, R. (2019). *Trichoderma*: Su potencial en el desarrollo sostenible de la agricultura. *Biotecnología Vegetal*, 19(4), 237-248.
- Couoh, E. V., Briceño, M. de los Á. S., Alejo, J. C., Sánchez, E. R., & Suárez, J. M. T. (2015). Diagnóstico y alternativas de manejo químico del tizón foliar (*Alternaria chrysanthemi simmons* y *Crosier*) del crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) kitamura en Yucatán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología (México)* 23(1).
- Cubillos, J.G, Páez, A. y Mejía D, L. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. asociado al complejo «secadera» en maracuyá, bajo condiciones de invernadero. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 64(1), 5821-5830.
- Deng, Z., Harbaugh, B., K, Kelly, R., O, Seijo, T. y McGovern, R., J. (2005). Resistencia a la pudrición de la raíz por *Pythium* en cultivares comerciales de *Caladium*. *HortScience*, 40(3), 549-552.
- Díaz-Celaya, M., Rodríguez-Alvarado, G., Silva-Rojas, H., V., Pedraza-Santos, M. E., Salgado-Garciglia, R. y Fernández-Pavía, S., P. (2011). Identificación de especies de *Pythium* aisladas de plantas ornamentales. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3, 431-443

- Durán, O. (1974). Memorias curso de floricultura. Ministerio de Agricultura ICA, Regional No. 1. Tibaitatá, Mosquera, Colombia.
- Encalada, A. (2017). *Análisis de las exportaciones de flores ecuatorianas hacia el mercado chino periodo 2010-2015*. [Componente práctico del examen complejo, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil]. <http://repositorio.ucsg.edu.ec/handle/3317/7767>
- Eraso-Insuasty, C., Acosta-Rodríguez, J., Salazar-González, C. y Betancourth García, C. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. Para el manejo del amarillamiento de arveja causada por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(2), 237. [https://doi.org/10.21930/rcta.vol15\\_num2\\_art:363](https://doi.org/10.21930/rcta.vol15_num2_art:363)
- Escobar, P., Montealegre, J. y Herrera, R. (2004). Respuesta in vitro de cepas de *Trichoderma harzianum* frente a  $FE^{3+}$ , salinidad, pH y temperatura, con el fin de ser utilizado en control biológico de *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* en tomate. *Boletín Micológico*, 19, 95-102.
- Ezziyyani M., Pérez, C, Sid A. Requena, M.E. y Candela, M.E. (2004) *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*, 26, 35-45.
- Ezziyyani, M., Sid Ahmed, A., Pérez, S. M. E., Requena, M. E., y Candela, M. (2006). Control biológico por microorganismos antagonistas. *Revista Horticultura*, 191, 8-15.
- Fernández-Herrera, E., Acosta-Ramos, M., Ponce-González, F. y Manuel-Pinto, V. (2007). Manejo biológico de *Phytophthora capsici* Leo., *Fusarium oxysporum* schlechtend.: Fr. y *Rhizoctonia solani* kühn en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) E. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 35-42.
- Fernández-Larrea, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas*, 62 96-100.
- Galindo, C.H y Arbeláez, G. (1995). Control de la pudrición basal del tallo en *Gypsophila paniculata* L. causada por *Pythium* sp., con tres aislamientos de *Trichoderma harzianum* y con fungicidas. *Agronomía colombiana*, 12(2), 134-141.



- Garcés de Granada, E., Orozco de Amézquita, M., Sara, P., Carvajal, L., M. y Sarmiento, C., I. (1994). Manejo de *Pythium* sp. y *Rhizoctonia solani* kuhn en bancos de enraizamiento de *Gypsophila paniculata* L. *11*(2) 158-163.
- García-Núñez, H. G., Martínez-Campos, Á. R., Hermosa-Prieto, M., R., Monte-Vázquez, E., Aguilar-Ortigoza, C., J. y González-Esquivel, C., E. (2017). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora infestans*. *Revista mexicana de fitopatología*, *35*(1), 58-79. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-4>
- Garibaldi, A. y Gullino, M. (1987). *Fusarium* wilt of carnation: present situation, problems and perspectives. *Acta Horticulturae*, *216*, 45-54.
- González-Hernández, D. (2002). Estado Actual de la Taxonomía de *Rhizoctonia solani* Kühn. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *20*(2), 200-205.
- Groenewald, S. (2006). Biology, pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* F. sp. *cubense* [Trabajo de grado de Maestría, Universidad of Pretorio]. <http://hdl.handle.net/2263/30587>.
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L. y Olivar, R. (2009). Control biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Laboratorio de Fitopatología, Control Biológico*, *7*(13), 50-54.
- Guédez, C., Cañizales, L., Castillo, C. y Olivar, R. (2012). Evaluación *in vitro* de aislamientos de *Trichoderma harzianum* para el control de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* en plantas de tomate. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, *32*(1), 44-49.
- Guerrero, L. y Cadena, L. (2016). *Evaluación del control biológico de Periplaneta americana (Blattidae, Linnaeus) por ingestión del hongo Metarhizium anisopliae (Clavicipitaceae, y ácido bórico* [Tesis de pregrado, Universidad Distrital Francisco José de Caldas]. <http://hdl.handle.net/11349/3365>.
- Handford C., Elliott., C. y Campbell, K. (2015). A review of the pesticide legislation and the scale of challenge in reaching the global harmonization of food safety standards. *Inter Environ Ases Manag.* *11*(4) 525-536.

- Hernández-Mendoza J. L., Sánchez, M., García, J. G., Mayek, N. y González, J. M. (2011). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp. nativos del noreste de México. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 176-185.
- Hernández-Amasifuen, A., Pineda-Lázaro., A. y Noriega-Córdova, H. (2019). Aislamiento e identificación de *Fusarium oxysporum* obtenido de zonas productoras de «ají pimentón» *Capsicum annumm* L. (Solanaceae) en el distrito de Barranca, Perú. *Arnaldoa*, 26(2), 689-698.
- Heslop. Harrison, J. (1969). Development differentiation and yield. En: Eastin, JD, Haskins, FA, Sullivan, CY, van Bavel, CHM y Heslop-Harrison, J. (Eds.). *Physiological aspects of crop yield Wisconsin*, American Society of Agronomy. Pág. 291-321.
- Huang, X., Chen, L., Ran, W., Shen, Q. y Yang, X. (2011). La cepa *Trichoderma harzianum* SQR-T37 and its bio-organic fertilizer could control *Rhizoctonia solani* Damping-off disease in cucumber seedlings mainly by the mycoparasitism. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 91, 741-755.
- HyeongJin, J., WanGyu, K., JaeYeong, K. y SeongEon, L. (1998). Enfermedades por *Phytophthora* no registradas de plantas con flores causadas por *Phytophthora nicotianae* en Corea. *Revista coreana de patología vegetal*, 14(5), 452-457.
- Infante, D., Martínez, B., González, N. y Reyes Y (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*, 24(1) 14-21.
- Infoagro. (2012). *InfoAgro*. Obtenido de Cultivo de la Gypsophila: [http://www.infoagro.com/documentos/el\\_cultivo\\_gypsophila.asp](http://www.infoagro.com/documentos/el_cultivo_gypsophila.asp)
- Instituto Nacional de Meteorología e Hidrológica, INAMHI. (2018). Datos meteorológicos, Chavezpamba, Quito, Pichincha.
- Izquierdo, D.E., Mosquera, M. F., Roble, G.D. y Rosales, F.S. (2018). Competitividad en las exportaciones florícolas del Ecuador. *Ciencia Digital*, 2(2), 315-327.
- Izzeddin A, N. y Medina T, L. (2011). Efecto del control biológico por antagonistas sobre fitopatógenos en vegetales de consumo humano. *Salus*, 15(3), 8-12.

- Jones, J. B., Jones, J. P., Stall, R. E. y Zitter, T. A. (Eds.). (1991). Compendium of tomato diseases. The American Phytopathological Society Press. <https://worldveg.tind.io/record/15679>.
- Larios, E. J., Valdovinos, J. de J. W., Chan, W., García, F. A., Manzo, G, y Buenrostro, M. T (2019). Biocontrol de Damping off y promoción del crecimiento vegetativo en plantas de *Capsicum chinense* (Jacq) con *Trichoderma* spp. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(3), 471-483.
- Lezcano, J., C, Martínez, B. y Alonso, O. (2012). Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* provenientes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas. *Pastos y Forrajes*, 35(2), 187-196.
- López-Casallas, M., Guevara-Castro, Y., A., Pisco-Ortíz, Y., C., Cabrera, I., M., López-Cardona, N. (2020). Pudrición de raíces y tallo de la soya por *Phytophthora sojae* Kaufm. y Gerd. En la altillanura plana del departamento del Meta. *Summa Phytopathologica*, 46(2), 113-120. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/230356>
- López, N. (2009). Malezas asociadas a plantas ornamentales. *Fitosanidad*, 13(4), 233-236.
- Martínez, B., Infante, D., y Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Revista de Protección Vegetal*, 30, 11-22.
- Montoro, Y., Moreno, R., Gomero, L. y Reyes, M. (2009). Características de uso de plaguicidas químicos y riesgos para la salud en agricultores de la sierra central del Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 26(4), 466-472.
- Monzón, A. (2002). Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. *Manejo Integrado de Plagas*, 63, 95-103.
- Motta-Delgado, P.A. y Murcia-Ordoñez, B. (2011). Hongos entomopatógenicos como alternativa para el control biológico de plagas. *Ambiente y Agua - Revista interdisciplinaria de ciencias aplicadas*, 6(2), 77-90.

- Naseby, D. C., Pascual, J. A. y Lynch, J. M. (2001). Effect of biocontrol strains of *Trichoderma* on plant growth, *Pythium ultimum* populations, soil microbial communities and soil enzyme activities. *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 161-169.
- Ortuño, N., Miranda, C. y Claros, M. (2013). Selección de cepas de *Trichoderma* spp. generadoras de metabolitos secundarios de interés para su uso como promotor de crecimiento en plantas cultivadas. *Revista de la Biosfera Selva Andina*, 1(1), 16-32.
- Páez, M. E., & Albarracín, S. N. (2007). Evaluación de la capacidad antagónica de *Trichoderma koningii* sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. *Rev. Fav. Agron. (LUZ)*, 24, 27-31.
- PROBIOTEK (2017). *Agar de Dextrosa y Papa* <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/medios-de-cultivo-reactivos/agar-de-dextrosa-y-papa/>.
- Pulido-Herrera, A., Zavaleta-Mejía, E., Cervantes-Díaz, L. y Grimaldo-Juárez, O. (2012). Alternativas de control en la pudrición radical de cebolla para el Valle de la Trinidad, Baja California. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*. 3(1), 97–112.
- Puño, R., Terrazas, E., Alvares, T., Giménez, A., Mendoza, L, Smeltekop, H. y Loza-Murguía, M. (2011). Nota de la capacidad biocontroladora de metabólicos de *Trichoderma inhamatum* Bol12 QD sobre cepas nativas de *Phytophthora infestans* in vitro. *Revista de la Sociedad de Investigación Selva Andina*, 2(1), 26-33.
- Rengifo, I. (2010). *Etiología de las enfermedades conocidas como marchitamiento y necrosis basal en cultivos de Callistephus chinensis ubicados en la Sabana de Bogotá*, [Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá]. <http://hdl.handle.net/10554/8663>.
- Retana, K., Ramírez-Coché, J. A., Castro, O., y Blanco-Meneses, M. (2018). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium oxysporum* F. SP. *Apii* asociado a la marchitez del apio en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 42(1), 115-126.

- Revelo, J. (1991). *El hongo Fusarium oxysporum*. INIAP, Estación Experimental Santa Catalina, Departamento de Protección Vegetal.
- Rivera-Jiménez, M.N, Zavaleta-Mancera, H. A, Rebollar-Alviter, A., Aguilar-Rincón, V.H., García-de-los-Santos, G., Vaquera-Huerta, H. y Silva-Rojas, H. V. (2018). Phylogenetics and histology provide insight into damping-off infections of ‘Poblano’ pepper seedlings caused by *Fusarium* wilt in greenhouses. *Mycol Progress*, 17(11), 1237–1249.
- Robles Y., L., Leyva M., S., Cruz, A., Camacho T., M., Nieto, D. y Tovar P, J.M. (2016). *Fusarium oxysporum* Schltdl. Y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. En vivero. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 7(36), 25–36.
- Rodríguez S., M., Gerding P. M. y France, A. (2006). Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de polilla de tomate *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidóptera: Gelechiidae). *Agricultura Técnica*, 66(2), 151-158.
- Rodríguez, E. y Ossa J. (2007). *Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (Physalis peruviana L.) el hongo Fusarium oxysporum Schilecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo*. [Tesis de grado, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá]. <http://hdl.handle.net/10554/8319>
- Rodríguez-García, D. y Wang-Wong, A. (2020). Efectividad a nivel *in vitro* de *Trichoderma* spp. nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense*. <https://doi.org/10.15517/rac.v44i2.43096>.
- Ruiz, A., y Sánchez, J. (2006). Control biológico de hongos fitopatógenos causantes de pudrición basal en plantas de *Gypsophila paniculata* L. y *Limonium sinuatum* L., mediante aplicación de *Trichoderma* sp. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 142.
- Sabando-Ávila, F., Molina-Atiencia, L.M y Garcés-Fiallos, F.R. (2017). *Trichoderma harzianum* en pre-trasplante aumenta el potencial agronómico del cultivo de piña. *Revista Brasileira de Ciências Agrarias*, 12(4), 410-414.

- Salazar, L. A., Aponte, G. Y, Alcano, M., Sanabria, N. H., y Guzmán, J. J. (2012). Importancia de las especies de *Trichoderma* para el control de *Macrophomina phaseolina* en las áreas agrícolas del estado Aragua, Venezuela. *Agronomía Tropical*, 62, 7-16.
- Solano-Báez, R., Leyva Mir, G., Tlapal Bolaños, y Mariscal Amaro, A. (2013). Etiología y respuesta de variedades de crisantemo a la pudrición del tallo en el Estado de México. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 19(1), 49-59.
- Samuels, G., J. (1996). *Trichoderma*: una revisión de la biología y sistemática del género. *Investigación micológica*, 100(8), 923-935. [https://doi.org/10.1016/S0953-7562\(96\)80043-8](https://doi.org/10.1016/S0953-7562(96)80043-8)
- Soto, J., Clavijo, M. y Filgueira, J. (2012). Evaluación fenotípica de la resistencia en poblaciones de clavel F1 al marchitamiento vascular causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi* *Agronomía Colombiana*, 30(2), 172-178.
- Suárez-Meza, C.L., Fernández-Barbosa, R.J., Valero, N.O., Gámez-Carrillo, R.M. y Páez-Redondo, A.R. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., Asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 35-43.
- Sundaramoorthy, S., y Balabaskar, P. (2013). Biocontrol efficacy of *Trichoderma* spp. Against wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. Sp. *Lycopersici*. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*, 1(3), 036–040.
- Torres, G. (2000). Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Colombiana*, 17, 11-22.
- Vaillant-Flores, D., I. y Gómez-Izaquirre, G. (2009). Incidencia de *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora infestans* en Cuba. *Agricultura técnica en México*, 35(2), 219-223.
- Van-Beneden, S., Pannecouque, J., Debode, J., De Backer, G. y Höfte, M. (2009). Caracterización de hongos patógenos causantes de la pudrición basal de la lechuga en invernaderos belgas. *Revista europea de fitopatología*, 124(1), 9-19.

- Vázquez, J. y Loli, O. (2018). Compost y vermicompost como enmiendas en la recuperación de un suelo degradado por el manejo de *Gypsophila paniculata*. *Scientia Agropecuaria*, 9(1), 43-52.
- Vázquez, J., Álvarez-Vera, M., Iglesias-Abad, S. y Castillo, J. (2020). Las complicaciones de enmiendas orgánicas en forma de compost y vermicompost reducen los efectos negativos del monocultivo en suelos. *Scientia Agropecuaria*, 11(1), 105-112.
- Velasco, R. G., Martínez, D.L.O., Mejía, E.Z., Aguilera, G.M. y Acuña, E.A.G. (2003). Etiología de la marchitez del crisantemo (*Dendranthema grandiflora* Tzevelec) cv. Estrella polar. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(1), 75-78.
- Leiva, V., D. (2018). Eficacia de biofungicidas frente a la caída de plántula de pepino, inducida por *Pythium aphanidermatum*. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 2(1), 72-78.
- Volcy, C. (2008). Génesis y evolución de los postulados de Koch y su relación con la fitopatología. Una revisión *Agronomía Colombiana*, 26(1), 107-115.
- Wolcan, S., Ronco, L., y Lori, G., (2007). Podredumbres basales de *Gypsophila paniculata* (Caryophyllaceae): agentes causales y su patogenicidad potencial sobre *Dianthus caryophyllus* (Caryophyllaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 42(3-4), 159-167.
- Woo, S.L. y Lorito, M. (2007). Aprovechar las interacciones entre los antagonistas de hongos, patógenos y la planta para el biocontrol. En M. Vurro y J. Gressel (Eds.), *Nuevas biotecnologías para la mejora y gestión de agentes de biocontrol* (págs. 107-130). Springer Holanda. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5799-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5799-1_6).
- Yedidia, I., Srivastva, A.K., Kapulnik, Y. y Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235(2), 235-242.
- Yong, A. y Leyva A. (2010). La biodiversidad florística en los sistemas agrícolas. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00-00.