



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
SISTEMA DE POSTGRADO UNIVERSIDAD AGRARIA DEL
ECUADOR
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN SANIDAD VEGETAL

TRABAJO DE TITULACIÓN COMO REQUISITO PREVIO
PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN SANIDAD VEGETAL

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE
BIOCONTROLADORES SOBRE *Fusarium sp.*, BAJO
CONDICIONES CONTROLADAS

ING. DAVID JACOBO ULLOA BUCARAM

GUAYAQUIL, ECUADOR

2022

SISTEMA DE POSTGRADO UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR

CERTIFICACIÓN

El suscrito, Docente de la Universidad Agraria del Ecuador, en mi calidad de Director **CERTIFICO QUE:** he revisado el Trabajo de Titulación, denominada: **CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BIOCONTROLADORES SOBRE *Fusarium sp.*, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS**, el mismo que ha sido elaborado y presentado por el/la estudiante, **Ing. David Jacobo Ulloa Bucaram**; quien cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador para este tipo de estudios.

Atentamente,

Ing. Joaquín Morán Bajaña, PhD.

Guayaquil, 19 de mayo de 2022

UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
SISTEMA DE POSGRADO UNIVERSIDAD AGRARIA
DEL ECUADOR

TEMA:
"CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BIOCONTROLADORES
SOBRE *Fusarium* Sp., BAJO CONDICIONES CONTROLADAS"

AUTOR:
ING. DAVID ULLOA BUCARAM

**APROBADA Y PRESENTADA AL CONSEJO DE POSGRADO
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
MAGÍSTER EN SANIDAD VEGETAL.**

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

ING. JUAN MARTILLO GARCÍA, MSc.
PRESIDENTE

ING. PAULO CENTANARO QUIROZ, MSc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

ING. TAYRON MARTINEZ CARRIEL, MSc.
EXAMINADOR PRINCIPAL

ING. JOAQUÍN MORÁN BAJAÑA, PhD.
EXAMINADOR SUPLENTE

AGRADECIMIENTO

Expreso mi agradecimiento primeramente a Dios por permitirme un día más de vida.

Agradezco profundamente con el corazón abierto a mi Padre el Dr. Jacobo Bucaram Ortiz, de quien no sólo llevo su nombre, si no también todo su legado de enseñanzas, sus ejemplos, sus consejos y son el modelo de vida, fructífera en realizaciones, que me guía e inspira para salir adelante. Realmente él y mi madre Beatriz me animaron a estudiar la maestría y he sabido llevar a cabo esta etapa de mi vida académica con creces, Padre mío, jamás mis palabras alcanzarán para expresarte mi amor de hijo agradecido por todo lo que representas y haces por mí, trataré de ser un digno hijo tuyo y tu nombre siempre lo pondré en lo más alto de mi vida.

Agradezco no con menos profundidad, por el inmenso amor que me profesan, a mis madres Doña Mercedes Leverone de Bucaram y a Beatriz Bucaram de Amador, la primera por sus desvelos y su infinita paciencia, la segunda por sus preocupaciones y su alta capacidad de entenderme, a ambas por su rigurosidad frente a mis arrebatos, ustedes son mi luz y mi equilibrio.

Agradezco de manera muy especial al Voluntariado de la Universidad Agraria del Ecuador, el mismo que en el postgrado se encuentra bajo la coordinación de la Lcda. Beatriz Bucaram Leverone de Amador, mi Madre, la que me ha guiado en todos los momentos, la que ha impulsado mis proyectos y ha apoyado cada momento de mi vida, procurando que también alcance el éxito en mis estudios de postgrado, Madre mía simplemente te amo y muchas gracias por tu dedicación hacia mí.

Agradezco a mis tías Martha Rina Bucaram de Jorgge y Rina Mercedes Bucaram de Vera, quienes con sus consejos y orientaciones me han

mantenido en la senda para cumplir los objetivos de mi vida, formarme como profesional y ser persona de bien.

Agradezco a todas las personas que contribuyeron con su granito de arena para que este proyecto académico culmine con éxito, a mi tutor el Ing. Joaquín Morán Bajaña, a los miembros del tribunal de tesis, Ing. Juan Javier Martillo, Ing. Paulo Centanaro e Ing. Tayron Martínez.

A todo el personal docente y administrativo del Sistema de Postgrado de la Universidad Agraria del Ecuador y a todo el equipo del voluntariado UAE.

David Jacobo Ulloa Bucaram

DEDICATORIA

Dedico este trabajo de tesis a Dios, a mis Padres, a mis docentes del postgrado, a mis compañeros de estudio y a toda la familia de la Universidad Agraria del Ecuador.

David Jacobo Ulloa Bucaram

RESPONSABILIDAD

La responsabilidad, derecho de la investigación, resultados, conclusiones y recomendaciones que aparecen en el presente Trabajo de Titulación corresponden exclusivamente al Autor y los derechos académicos otorgados a la Universidad Agraria del Ecuador.

Ing. Agr. David Jacobo Ulloa Bucaram

C. I. 0917587776

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| Caracterización del tema | 1 |
| Planteamiento de la situación problemática..... | 2 |
| Justificación e importancia del estudio..... | 3 |
| Delimitación del problema..... | 3 |
| Formulación del problema..... | 4 |
| Objetivos | 4 |
| Objetivo general..... | 4 |
| Objetivos específicos | 4 |
| Hipótesis | 4 |
| Aporte teórico o conceptual | 4 |
| Aplicación práctica | 4 |
| CAPÍTULO 1 | 5 |
| Marco Teórico | 5 |
| 1.1 Estado del arte | 5 |
| 1.2 Bases teóricas..... | 10 |
| 1.3 Marco legal | 17 |
| CAPÍTULO 2 | 20 |
| ASPECTOS METODOLÓGICOS | 20 |
| 2.1 Métodos. | 20 |
| 2.2 Variables. | 20 |
| 2.3. Población y Muestra. | 22 |
| 2.4 Técnicas de Recolección de Datos. | 22 |
| 2.5 Estadística Descriptiva e Inferencial. | 22 |
| 2.6 Diseño Experimental. | 22 |
| RESULTADOS | 23 |
| DISCUSIÓN | 33 |
| CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES | 36 |
| BIBLIOGRAFÍA CITADA | 37 |
| ANEXOS | 45 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en medio PDA..... | 23 |
| Figura 2. Crecimiento de <i>Trichoderma harzianum</i> en medio PDA..... | 24 |
| Figura 3. <i>Trichoderma</i> ocupando casi la totalidad de la caja Petri en franco antagonismo con <i>Fusarium</i> sp a las 96 horas | 25 |
| Figura 4. El micelio de <i>Trichoderma</i> inhibiendo totalmente a <i>Fusarium</i> sp. | 26 |
| Figura 5. Forma del micelio de <i>Trichoderma</i> sp. | 27 |
| Figura 6. Estructuras conidiales de <i>Trichoderma</i> sp..... | 28 |
| Figura 7. Forma de las fiálides de <i>Trichoderma</i> sp..... | 29 |
| Figura 8. Forma de las hifas de <i>Trichoderma</i> sp. | 30 |
| Figura 9. Clamidosporas de <i>Trichoderma</i> sp..... | 30 |
| Figura 10. Cojines florales de cacao presuntamente infectados con <i>Fusarium</i> sp. | 31 |
| Figura 11. Mazorcas de cacao infectadas con <i>Fusarium</i> sp..... | 31 |

INDICE DE ANEXOS

| | |
|--|-----|
| Anexo No. 1. Recolección de hongos en sustrato de arroz..... | 45 |
| Anexo No. 2. Observación microscópica de las estructuras de <i>T. harzianum</i> teñida con azul de lactofenol..... | 46 |
| Anexo No. 3. Preparando el azul de lactofenol 1:10 como sustancia de tinción . | 47 |
| Anexo No. 4. Observación microscópica de las estructuras de <i>T. harzianum</i> teñida con azul de lactofenol..... | 48 |
| Anexo No. 5. Observando en el microscopio las estructuras fúngicas para su caracterización morfológica..... | 49 |
| Anexo No. 6. Recolectando las muestras de hongos en sustrato de arroz cocinado..... | 50 |
| Anexo No. 7. Certificado de aprobación de trabajos prácticos y experimentales, suscrito por el Encargado del Laboratorio de la UAE..... | 501 |

RESUMEN

Es necesario caracterizar morfológicamente a hongos como *Trichoderma harzianum*, cuya acción biocontroladora sobre otros hongos permite manejar a especies patógenas como *Fusarium sp.* Se planteó un estudio cuyo objetivo fue: Realizar la caracterización morfológica de *T. harzianum*, con fines de biocontrol sobre *Fusarium sp.*, bajo condiciones controladas. Se extrajo una muestra de suelo, material vegetal y orgánico en descomposición de varios puntos de Milagro y Yaguachi. Los resultados se presentaron de manera descriptiva. Todos los aislamientos se realizaron en medio Papa Dextrosa Agar PDA (Acumedia-USA) en placas Petri de 100 x 15 mm y se incubaron a 25 °C durante 5 a 7 días en condiciones de oscuridad. Para la tinción y posterior caracterización morfológica del *Trichoderma* se utilizó una solución de Azul de lactofenol. Las cepas antagonicas se identificaron siguiendo la guía de Barnett y Hunter, (1972). El enfrentamiento del antagonico frente al patógeno en la prueba dual, presentó una velocidad de crecimiento del primero y superior a *Fusarium sp.* A las 72 horas el biocontrolador presentó un marcado antagonismo sobre *Fusarium sp.* logrando inhibir parcialmente su crecimiento. El micelio no exhibió anillos concéntricos, más bien su aspecto fue algodonoso, de color verde oscuro con bastante uniformidad en todo el cuerpo fúngico. El biocontrolador presenta hifas septadas simples y conidióforos transparentes con ramificaciones. Las clamidosporas se observan solas y aisladas. Se aprueba la hipótesis: Las estructuras morfológicas de *T. harzianum* inciden en su actividad antagonica sobre *Fusarium sp* bajo condiciones controladas.

Palabras claves: Antagonismo, micelio, Trichoderma harzianum, PDA, prueba dual.

SUMMARY

It is necessary to morphologically characterize fungi such as *Trichoderma harzianum*, whose biocontrol action on other fungi allows the management of pathogenic species such as *Fusarium sp.* A study was proposed whose objective was: To carry out the morphological characterization of *T. harzianum*, with biocontrol purposes on *Fusarium sp.*, under controlled conditions. A sample of soil, plant material, and decomposing organic material was extracted from various points in Milagro and Yaguachi. The results were presented descriptively. All isolations were made in Potato Dextrose Agar PDA medium (Acumedia-USA) in 100 x 15 mm Petri dishes and incubated at 25 °C for 5 to 7 days in dark conditions. For the staining and subsequent morphological characterization of the *Trichoderma*, a solution of Lactophenol Blue was used. The antagonistic strains were identified following the guide of Barnett and Hunter, (1972). The confrontation of the antagonist against the pathogen in the dual test, presented a growth rate of the first and superior to *Fusarium sp.* At 72 hours, the biocontroller presented a marked antagonism against *Fusarium sp.* partially inhibiting its growth. The mycelium did not exhibit concentric rings, rather its appearance was cottony, dark green in color with enough uniformity throughout the fungal body. The biocontroller presents simple septate hyphae and transparent conidiophores with ramifications. Chlamydospores are observed alone and isolated. The hypothesis is approved: The morphological structures of *T. harzianum* affect its antagonistic activity on *Fusarium sp.* under controlled conditions.

Keywords: Antagonism, mycelium, Trichoderma harzianum, PDA, dual test.

INTRODUCCIÓN

Ecuador es un país megadiverso y gracias a sus condiciones agroclimáticas, se producen diversas especies que forman parte de su inventario agrícola como el banano, cacao, palma africana y otras especies como frutas y flores cuyo destino son los mercados internacionales.

Muchas de estas especies se ven amenazadas por microorganismos fúngicos del género *Fusarium* que ponen en riesgo la producción y la competitividad comercial. En la naturaleza existen algunas especies que actúan como biocontroladoras de los hongos patógenos, gracias a sus características metabólicas que le confieren un papel de antagonismo para reducir e inhibir la acción de *Fusarium sp.*

Se ha asociado el ataque de *Fusarium sp.*, a enfermedades en plantaciones de banano, cacao, hortalizas y frutas ocasionando patologías como pudrición vascular entre otras.

Algunos estudios mencionan a hongos del género *Trichoderma sp.*, como microorganismos con gran capacidad antagónica frente a algunas especies del reino fungi entre los que sobresale *Fusarium sp.*, (Granobles y Torres, 2013 y Sánchez et al., 2015).

El uso de microorganismos para el control de hongos patógenos para las plantas ha sido la tendencia en los últimos años, como alternativa para disminuir el uso de pesticidas, cuyas consecuencias han sido notablemente destructivas en términos ambientales y peligrosos para los operadores que los aplican.

Caracterización del tema

Se ha mencionado a algunas especies de hongos del género *Trichoderma* entre los que sobresalen *T. harzianum* y *T. viride* así como bacterias tales como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. brevis* entre otras, como posibles biocontroladoras de *Fusarium sp.*, a nivel de laboratorio, debido a que se ha observado que en campo su eficiencia ha sido registrada como

muy importante, logrando reducir la población del hongo patógeno a niveles muy bajos. (Castañeda y Sánchez, 2016)

Algunas especies de *Trichoderma* poseen mayor control sobre el hongo que otras. Debido a esto, se hace necesario la observación por microscopía, previa tinción de las cepas biocontroladoras, bajo condiciones de laboratorio, para su caracterización morfológica.

El presente trabajo tiene como propósito evaluar la actividad antagónica de *Trichoderma harzianum.*, como función de biocontrol sobre *Fusarium sp.*, bajo condiciones controladas.

Planteamiento de la situación problemática

Los ataques de *Fusarium sp.* a las especies agrícolas como el banano, cacao y otras especies frutales ponen en riesgo la producción y por consiguiente la sostenibilidad económica del sector agropecuario principalmente de la costa ecuatoriana.

Este microorganismo fúngico de carácter patógeno posee enemigos naturales que pueden ser utilizados en su biocontrol como herramienta para enfrentar los daños y desequilibrios causados por el hongo en las plantas, mermando su productividad y por consiguiente los beneficios económicos esperados.

El hongo patógeno *Fusarium sp.*, ha demostrado agresividad en las especies vegetales que infecta y la gravedad de su daño puede significar la pérdida de la plantación.

Los hongos del género *Trichoderma* han exhibido una gran actividad antagónica frente a otros hongos como *Fusarium sp.* (Mejía *et al.*, 2016).

Se hace necesario caracterizar morfológicamente los materiales fúngicos de *Trichoderma* sobre el hongo *Fusarium sp.*, para establecer posteriormente medidas de control y evitar las posibles pérdidas económicas, además proteger el medio ambiente, al utilizar los mismos enemigos naturales del microorganismo infeccioso,

lo cual sería una práctica amigable con el ambiente y a un bajo costo en relación con los controles químicos tradicionales.

Justificación e importancia del estudio

Los patógenos, influenciados quizás por la cambiante situación climática y el uso indiscriminado de pesticidas han afinado su comportamiento agresivo sobre las plantas. En el caso de *Fusarium sp.*, existen algunas cepas que se caracterizan por su carácter virulento que ha generado una situación de descontrol en su ataque sobre especies vegetales sobre la cual se basa la actividad agroexportadora del Ecuador, como lo son los cultivos de cacao, banano y otras especies como flores, frutas, etc.

Se ha reportado, a nivel *in vitro*, que los ataques de *Fusarium sp.*, inhabilitan a las plántulas a las condiciones de campo al ser trasplantadas. Se ha evaluado el potencial antagonista de hongos y bacterias en plantas de banano bajo condiciones de laboratorio y se encontró porcentajes del 3 % a 52 % de inhibición por bacterias y 69 % a 78 % con los hongos, corroborando el potencial de estos microorganismos endófitos en el biocontrol del hongo patógeno *Fusarium sp.* (Chávez, Noreskal, Staver, y Dita, 2015)

Los informes sobre la complejidad de los ataques de *Fusarium* en algunas especies vegetales es preocupante debido a las pérdidas económicas ocasionadas y cuyas medidas de control son típicamente químicas y por consiguiente contaminadoras del entorno. (Mejía , Reyes, Alejo, Tun, y Borges, 2016)

Delimitación del problema

El estudio se llevará a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Universidad Agraria del Ecuador, campus “Ciudad Universitaria Dr. Jacobo Bucaram Ortiz” en la ciudad de Milagro, Guayas, Ecuador.

Se espera que el trabajo experimental se desarrolle entre los meses de septiembre de 2021 hasta diciembre del 2021.

La población beneficiaria la constituyen los productores agrícolas cuyas plantaciones son amenazadas por el hongo fitopatógeno.

Formulación del problema

¿Qué influencia podrían tener las características morfológicas de las estructuras de *Trichoderma harzianum*, en su función de biocontrol?

Objetivos

Objetivo general

Realizar la caracterización morfológica de *Trichoderma harzianum*, con fines de biocontrol sobre *Fusarium sp.*, bajo condiciones controladas

Objetivos específicos

Explicar la actividad antagónica de *Trichoderma harzianum*, sobre *Fusarium sp.*, a nivel *in vitro*

Identificar las estructuras morfológicas de *Trichoderma harzianum* mediante microscopía óptica

Describir la actividad patógena de *Fusarium sp.*, sobre el tejido vegetal que parasita

Hipótesis

Las estructuras morfológicas de *T. harzianum* inciden en su actividad antagónica sobre *Fusarium sp* bajo condiciones controladas.

Aporte teórico o conceptual

La información que se obtenga del presente trabajo servirá para comprender los mecanismos de la actividad antagónica que cierto género de hongos realiza sobre *Fusarium sp.* Asimismo generará datos del comportamiento del microorganismo y sus enemigos naturales bajo condiciones controladas en el laboratorio. Los datos obtenidos formarán parte de una publicación en los medios de difusión científica disponibles.

Aplicación práctica

Al realizar la caracterización morfológica de *T. harzianum* permitirá comprender el comportamiento de este hongo sobre otros de carácter patógeno sobre las plantaciones de los principales cultivos agroexportables.

CAPÍTULO 1

MARCO TEÓRICO

1.1 Estado del arte

En un estudio llevado a cabo en el laboratorio de Fitopatología de la escuela de Agronomía de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, en México, Savín *et al.*, (2021) lograron aislar 18 grupos de siete especies de *Trichoderma harzianum* entre las que se mencionan a *T. viride*, *T. atroviride*, *T. asperellum*, *T. longibrachiatum*, *T. koningii* y *Trichoderma sp.* observando formas conidiales esféricas con cierto alargamiento en un polo, estas formas se presentaron en *T. atroviride*, *T. viride*, *T. longibrachiatum* y una especie no identificada de *Trichoderma*. Sin embargo, formas elipsoidales se distinguió por microscopia en *T. asperellum*, *T. harzianum* y *T. koningii*.

Según informan Rodríguez *et al.*., (2021) en un ensayo organizado con el auspicio de Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Córdoba cuyo objetivo fue identificar y aislar cepas nativas de *Trichoderma spp.* con fines de biocontrol de *Fusarium spp.*, en el cultivo de berenjena, lograron aislar cinco cepas de *Trichoderma spp.*: identificadas como TC05, TM04, TS03, TC02, TM01 y cinco cepas de *Fusarium spp.* registradas como FM01, FS02, FC03, FC04, FS05, mediante cultivos duales bajo un diseño completamente al azar (DCA) con cinco repeticiones en arreglo factorial 5x6 donde se midió el diámetro de las colonias y el porcentaje de inhibición, la eficiencia de biocontrol de *Trichoderma spp.* encontrándose que la cepa TC05 logró inhibir entre en más del 90% a las cepas de *Fusarium spp.*; concluyendo que la cepa nativa TC05, posee el mayor potencial para su utilización en el cultivo de la berenjena.

Morales *et al.*, (2020), dentro de un equipo multidisciplinario de investigadores de las Universidades de Puebla y el Colegio de Postgraduados de México identificaron y caracterizaron morfológicamente los hongos asociados a enfermedades en un cultivo de la fresa, así como determinaron la capacidad antagónica *in vitro* de la cepa T-H4 de *Trichoderma harzianum* frente a los hongos identificados como causantes de las enfermedades de este cultivo. Las muestras colectadas de plantas infectadas se inocularon en cultivos duales, enfrentados entre cepas control e infectivas, en medio PDA generando cultivos monospóricos

para su posterior caracterización morfológica. Se identificaron tres hongos asociados al fruto (*A. niger*, *Colletotrichum sp.* y *R. stolonifer*), tres en hojas y tallo (*Pestalotiopsis sp.*, *Curvularia sp.* y *Alternaria sp.*) y dos hongos asociados a la raíz (*Rhizoctonia sp.* y *Fusarium sp.*). La cepa control presentó un nivel de antagonismo promisorio para *Colletotrichum sp.*, *Pestalotiopsis sp.*, *Alternaria sp.*, *Rhizoctonia sp.* y *Curvularia sp.*, *in vitro*.

En un estudio donde se evaluó el antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra los microorganismos causantes de la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante, Martínez *et al.*, (2020), encontraron que las cepas de *T. harzianum* controlaron potencialmente la actividad infecciosa de *Fusarium solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Macrophomina phaseolina* causantes de la enfermedad, presentando un comportamiento antagónico basado en la competencia por nutrientes, parasitismo, producción de enzimas de carácter antifúngico y probablemente antibiosis. Se observó adicionalmente un ligero incremento en la producción de vainas, longitud de la raíz y un mejoramiento del rendimiento.

En una investigación que pretendió determinar el nivel de la actividad antifúngica *in vitro* con microorganismos recolectados y aislados de la rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México contra *Fusarium oxysporum* FOC, Vega *et al.*, (2019) determinaron, en una prueba aleatoria, que de las 117 especies de *Streptomyces sp.*, una cepa logró inhibiciones superiores al 65 %; de las 83 cepas de *Bacillus sp.* apenas una de *B. amyloliquefaciens* y otra de *B. velezensis* consiguieron inhibir a FOC entre 30 y 57 %, pero de las 10 cepas escogidas al azar de las 48 recolectadas de *Trichoderma sp.*, todas alcanzaron inhibiciones del 35 y 75 %.

Los investigadores Michel *et al.*, (2019) identificaron la capacidad antagónica agresiva de *Trichoderma inhamatum* y *T. asperellum* contra los hongos que causan la enfermedad de la Pata Prieta del cultivo de la planta de jamaica en Guerrero, México. Estas cepas mostraron gran potencial antagónico y agresivo en poco tiempo, con la ventaja de estar adaptadas al ambiente de la principal región de producción de jamaica en México, donde existe alta incidencia de esta enfermedad.

Espinoza *et al.*, (2019), de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Coahuila, México, se plantearon como objetivo evaluar la capacidad inhibitoria

de *Trichoderma asperellum*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Streptomyces mutabilis* sobre *Fusarium oxysporum* y *F. solani*, logrando porcentajes de inhibición del 74 %, 55 % y 35 % en el cultivo de melón. El estudio concluyó que los microorganismos antagonicos constituyen una alternativa de biocontrol en enfermedades en el cultivo de melón.

En una investigación, llevada a cabo por Coz, (2019), donde evaluaron la influencia del pH (5; 6 y 7) y su asociación a la presencia de calcio extracelular modificado por EDTA (1mM, 10mM, 20mM y 100mM) sobre el crecimiento micelial en 18 cepas de *Fusarium*, obtenidas y aisladas de tejidos vasculares de algunos cultivos de la región de San Martín, logrando identificar las especies en cacao, arroz, fréjol, ají, café maíz amarillo, plátano y culantro. Las especie identificadas y caracterizadas fueron *F. equiseti*, *F. solani*, *F. moniliforme*, *F. rigidiuscula*, *F. tricinctum*, *F. episphaeria* y *F. lateritium*.

En estudio publicado por Umaña, Orozco y Umaña, (2019) y realizado en el laboratorio de Fitopatología de la Universidad Nacional de Costa Rica, donde aislaron 13 cepas de *Trichoderma sp.*, inoculadas en medio PDA adicionado con ácido láctico al 25%, a partir de esporas recolectadas de cultivos de piñas con presencia parcial de plantas forestales, encontraron como resultados una velocidad de crecimiento promedio de los aislamientos entre 90 y 120 mm a una temperatura de 25 °C mientras que el porcentaje de germinación se ubicó entre 3 y 94 %.

Rodríguez y Flores, (2018), de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Venezuela, identificaron la capacidad antagonica *in vitro* de 16 aislamientos de *Trichoderma sp.* frente a *Rhizoctonia solani* y *Fusarium verticillioides*, realizando pruebas de cultivo duales, utilizando platos Petri con medio papa dextrosa agar durante 2 semanas en el marco de un diseño completamente al azar con cinco repeticiones por tratamiento encontrando diferencias significativas en las variables de porcentaje de inhibición del crecimiento (PIC) y número de esclerocios frente a *R. solani*, y las variables de PIC y porcentaje de inhibición de la esporulación al enfrentar a *F. verticillioides*. Los aislamientos con mayor potencialidad de antagonismo frente a *R. solani* fueron *F. koningii* y *T. croseum*, mientras que frente a *F. verticillioides* la especie de *T. harzianum*. Es

notorio resaltar que las cepas de *Fusarium* fueron más resistentes que *Rhizoctonia* frente a *Trichoderma*.

Samaniego *et al.*, (2018) investigadores de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Matanzas en Cuba, con los objetivos de aislar, identificar y evaluar cepas autóctonas de *Trichoderma spp.* de los suelos de la provincia de Matanzas, realizaron una prospección en dos agroecosistemas con suelo ferralítico rojo; logrando aislar e identificar tres cepas autóctonas de este hongo. Estas cepas, mediante la técnica de cultivo dual se aislaron y evaluaron su capacidad antagónica bajo condiciones *in vitro* para lo cual se empleó cepas de referencia de *Trichoderma harzianum* Rifai 3(A-34)2 y *T. viride* Persoon 5(TS-3)1 contra los hongos fitopatógenos *Rhizoctonia solani* Kühn, *Fusarium spp.* y *Sclerotium rolfsii* Sacc., midieron el radios de las colonias, la velocidad de crecimiento y el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) de los antagonistas. Los resultados arrojaron que las cepas autóctonas de *Trichoderma* aisladas e identificadas fueron *Trichoderma* 2T-aislado, *T. harzianum* 6(A-53)2 y *T. viride* 4(TS-3)1, de las cuales, *Trichoderma* 2T-aislado resultó el antagonista *in vitro* más eficiente contra los tres hongos fitopatógenos, seguida de *T. viride* 4(TS-3)1 (biocontrolador de *R. solani* y *S. rolfsii* y con menor capacidad antagónica contra *Fusarium spp.*) y *T. harzianum* 6(A-53)2.

Pérez *et al.*, (2018), en un ensayo desarrollado en el Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), de la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas en Villa Clara, Cuba, con el objetivo de evaluar en condiciones semicontroladas la eficiencia de *Trichoderma harzianum* como antagonista de *Bipolaris oryzae*, *Sarocladium oryzae* y *Pyricularia grisea* causantes de varias enfermedades fúngicas foliares del arroz, evaluaron nueve tratamientos, tres concentraciones del agente de control biológico, cuatro diluciones de filtrados de cultivo, un control relativo (Azoxistrobina) y un control absoluto para determinar la eficiencia y la variable epifitiológica de área bajo la curva del progreso de las enfermedades asociadas con los patógenos descritos, lograron una eficiencia entre el 70 y 90 % de antagonismo sobre los hongos que causan las patologías del arroz antes mencionadas, alcanzando además una disminución mayor al 60 % de los síntomas de dichas enfermedades .

Duarte *et al.*, (2018), en el Centro de Sanidad Agropecuaria de Cuba, determinaron la actividad antagónica de 13 cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg frente a dos aislamientos de *Fusarium* (*Fusarium dlamirii* Marasas, Nelson y Toussoun) y *Fusarium solani* (Martius Appel y Wollenweber emend. Snyder y Hansen) procedentes de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Estos autores evaluaron la antibiosis, la competencia por espacio y el micoparasitismo mediante la técnica del cultivo dual observándose que las cepas de *T. asperellum* con excepción de Ta-78, lograron una completa inhibición de las cepas de *Fusarium sp.* dentro de las 48 h de iniciado el cultivo según la escala de Bell. Los valores de inhibición alcanzados fueron de desde el 41 al 48,72 % con lo cual se concluye que presentan mucha potencialidad para el control biológico de este fitopatógeno.

En el Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Protección de Cultivos de la Universidad de Costa Rica, Retana, Ramírez, Castro, y Blanco, (2018), realizaron la caracterización morfológica de *Fusarium oxysporum* sp. apii en medio PDA (agar dextrosa de papa) y medio CLA agar hojas de clavel (carnation leaf agar) y paralelamente analizaron molecularmente al hongo y al mismo tiempo, mediante los postulados de Koch, procedieron a comprobar y confirmar la acción patógena del microorganismo. Los resultados de la inoculación de las plantas con *F. oxysporum* exhibieron los síntomas característicos como el amarillamiento, enanismo, marchitez y anaranjamiento de los conductos vasculares de las raíces. El crecimiento micelial presentó un color blanquecino-rosáceo al inicio cambiando a café púrpura y luego a café morado en el centro. En el medio CLA se pudo observar las clamidosporas y los macroconidios abundantes algunos con cierta curvatura.

Un grupo de investigadores de la Universidad Autónoma del Estado de México y la Universidad de Salamanca de España liderados por García *et al.*, (2016) mediante la amplificación de la región ADN ribosómica nuclear ITS1-ITS4 y un fragmento del gen *tef1 α* realizaron la caracterización morfológica y molecular de 10 cepas nativas de *Trichoderma* (TL2, TL4, TL5, TL6, TX7, TX8, TT6, TF8, TF10 y TJ6) y su relación filogenética, así como su capacidad de biocontrol contra *Phytophthora infestans*. Se demostró también que 6 de las 10 cepas,

correspondieron a *T. asperellum* y cuatro a *T. harzianum/Hypocrea lixii*. Las pruebas de antagonismo mediante enfrentamiento entre el patógeno y los antagonistas bajo condiciones *in vitro* alcanzaron entre el 49 % hasta el 98 % de inhibición.

1.2. Bases teóricas.

1.2.1 El biocontrol de microorganismos sobre agentes patógenos.

Andrade *et al.*, (2019) demostraron la actividad antagónica *in vitro* de *T. viride* contra *P. capsici* donde el biocontrolador presentó 0.516 mm de crecimiento radial en comparación de *P. capsici* que obtuvo 0.241 mm de crecimiento en caja Petri.

La misma fuente evidencia que *T. viride* y *T. harzianum* presentan similar actividad de antagonismo contra *R. solani* y *F. oxysporum* mostraron un hiperparasitismo incluso en las primera 8 horas del enfrentamiento en cultivos duales bajo condiciones *in vitro*.

Leyva *et al.*, (2017) utilizando 17 cepas de *Bacillus* spp y una cepa de *Foc* raza 1 determinaron la capacidad de antagonismo de nueve (53%) cepas de la bacteria contra *Fusarium*, identificando a las especies *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *B. licheniformis* las que presentaron los mayores antagonismos destacando su alta capacidad de biocontrol sobre el hongo *Fusarium oxysporum*.

Ariza y Sánchez, (2012) y Castañeda y Sánchez, (2016) en sus debidos momentos extrajeron y aislaron de la rizosfera de la planta ornamental *Ornithogallum umbellatum* cepas de *Bacillus subtilis* empleando el Medio Mínimo de Sales MMS que una vez incubadas fueron enfrentadas en cultivos duales de PDA y medio Agar Malta contra *Fusarium oxysporum*, logrando inhibiciones superiores al 70%.

Mejía *et al.*, (2016) reportan la eficacia de las rizobacterias *B. subtilis*, *B. megaterium* y *B. amyloliquefaciens* en el biocontrol de *Fusarium*, sobretodo de las especies *F. oxysporum*, *F. solani* y *F.*

Las cepas de *B. megaterium* y *B. licheniformis* además de su efecto inhibitorio de hongos patógenos, Mejía *et al.*, (2016) resaltan que poseen un marcado efecto de inducción de crecimiento de la planta e incremento de la producción de *Capsicum annuum*.

Pérez et al., (2018) aislaron *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker y *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams y Hawks (Rivero, 2008) como causantes de serias patologías en el cultivo de arroz. Estos patógenos fueron enfrentados con *Trichoderma harzianum* en cultivos duales y logrando un antagonismo a las 24 horas posteriores a la siembra, alcanzando diámetros de inhibición de 1,6 cm frente al control de 1,5 cm obteniéndose un PICR de 6,3%.

1.2.2 Trichoderma como género de hongos biocontroladores de otros hongos con capacidad patogénica.

Pérez et al., (2015) confrontaron cepas de actinomicetes, extraídas de diversos puntos de una plantación de manzanos, con cepas de *Fusarium equiseti* para lo cual utilizaron medio Czapek-Dox-Agar (CDA). Los niveles de inhibición fueron del 100%.

Sánchez et al., (2015) aislaron cepas de *Fusarium oxysporum* de pudriciones basales de bulbos de cebolla roja (*Allium cepa*) causante del “Mal de Almácigo” en bulbos y hortalizas y luego fue confrontado con *Trichoderma harzianum* bajo condiciones *in vitro*. Se determinó que *T. harzianum* y *T. atroviride* y *T. koningiopsis* es capaz de inhibir completamente a *Fusarium oxysporum* s.l. resaltando que la cepa de *T. longibrachiatum* fue descartada como biocontrolador debido a su capacidad de infectividad en humanos.

Martínez et al., (2015), manifiesta que el género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794 pero más adelante, casi 200 años después, Rifai en 1969 propone agregar nueve especies.

Según Villegas (como se citó en Martínez et al., 2015), el género *Trichoderma* se ubica en la clase Hyphomycetes, orden Moniliales, familia: Moniliaceae. Su fase sexual (estado Teleomorfo) se encuentra ubicado en la clase Ascomycetes, serie Pyrenomycetes, orden Hypocreales, género *Hypocrea*. Las especies del género *Trichoderma* son un grupo de derivados clonales de *Hypocrea* que han perdido la capacidad de completar un ciclo sexual.

Méndez et al., (2017) lograron recolectar más de 30 aislados de micrororganismos, con capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos, a

partir de cuatro bioinsumos. Los materiales fueron recogidos en zoas distintas de Nicaragua y correspondieron a 23 aislados bacterianos que fueron identificadas mediante pruebas morfológicas y moleculares como del género *Bacillus* sp. *B. subtilis*, *B. cereus* y *Rhizobium* sp. Se consiguió identificar la capacidad antagónica de 6 cepas correspondiente a *Bacillus subtilis*, con el mayor poder de inhibición dentro de un rango de 50-100%, de hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Alternaria*.

Stocco, (2015) describe a la antibiosis como la inhibición o destrucción de un organismo por los metabolitos del otro. Gran parte de las cepas de *Trichoderma* sintetizan compuestos volátiles y no volátiles tóxicos que impiden o inhiben la colonización por otros microorganismos. Por lo tanto, la antibiosis se produce durante las interacciones que implican compuestos difusibles de bajo peso moleculares o antibióticos producidos por cepas de *Trichoderma* que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. (Benítez *et al.*, como se citó en Stocco, 2015).

La misma fuente añade que el complejo enzimático, compuestos volátiles y otras sustancias tóxicas pueden inhibir la síntesis de la pared celular y la elongación de las hifas de los hongos patógenos.

Martínez, (2020) reporta que en suelos con cultivares de maracuyá no se detectó la presencia de *T. harzianum* en las muestras de suelo analizadas, no obstante, si se detectó cepas de *Aspergillus* spp. *Fusarium* spp. y *Penicillium* spp. siendo las más abundantes

Mamani, (2019) señala que se conocen algunos microorganismos como agentes causales de muchas de las enfermedades de las plantaciones de Heliconia, entre ellos: *Alternaria*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera musae-sapientum*, *Phyllosticta musae*, *Glomerella cingulata*, *Gloeosporium musarum*, *Colletotrichum musae*, *Guignardia musas*, *Curvularia* sp, *Mycosphaerella musicola* y *Pestalotia* sp.

Los autores del párrafo anterior acotan muchas de las morfoespecies de *Trichoderma* evaluadas presentaron gran capacidad antagónica frente a las morfoespecies de *Fusarium* sp., debido a su buen desempeño antagónico e inhibitorio.

Martínez *et al.*, (2020) destacan que el género *Trichoderma* posee una capacidad inhibitoria muy interesante debido a que muchos casos reportados lo ubican como un antagonico de algunas especie fúngicas patógenas y que estos ultimos se han visto disminuidos cuando se inoculó semillas de tomate, pimiento y otras hortalizas con el hongo *T. harzianun* consiguiendo la inhibición de *F. solani*, *F. oxysporum*, *Sarocladium sp.*, y *Pythium sp.*, en suelos con actividad agrícola.

1.2.3 Enfermedades de las plantas asociadas al género *Fusarium*.

Se ha informado de la virulencia y agrevisidad de *Fusarium* y según lo reporta Leslie *et al.*, (como se citó en Ortiz *et al.*, 2015) causando enfermedades asociadas a pudriciones de raíces, frutos, semillas y tallos, formación de chancros, marchitez y daños foliares.

En este mismo sentido Agrios (como se citó en Ortiz *et al.*, 2015) añade que *fusarium* afecta y sus pérdidas son enormes en cultivos de hortalizas, flores, algodón, tabaco, banano, café, tomate y caña de azúcar (Ortiz *et al.*, 2015).

En efecto, Adame *et al.*, (2015) lograron comparar varios niveles de patogenicidad de cepas de *Fusarium spp.*, aisladas a partir de tallo y raíz de vainilla con síntomas de pudrición. Los autores realizaron un analisis de la agresividad de las variantes estererasas detectadas en estos aislamientos para asociarlas con la patogenicidad observada.

En algunas latitudes se ha explicado la presencia de enfermedades asociadas no solo a *Fusarium sp.* tal como lo indican Martínez de la Parte y Pérez, (2015) quienes encontraron, en un estudio realizado en plantaciones de cacao en Cuba, además las siguientes especies patógenas: *Phytophthora spp.* , *Lasiodiplodia theobromae*, *Phytophthora palmivora* y *Colletotrichum gloeosporioides* siendo las más recurrentes y prevalentes. Los autores observaron la presencia *Cercospora sp.*, *Phomopsis sp.*, descartando la presencia de *Moniliophthora pernicioso* asociada a escoba de bruja.(Martínez de la Parte, E., 2015)

1.2.4 El género *Fusarium*,

Magdama, (2019), explica que *Fusarium oxysporum*, es una de las especies más importantes, dentro del campo de las enfermedades, como agente causal de pudrición de tallos y patologías vasculares en las plantas. Como patógeno, el hongo es responsable de la famosa enfermedad conocida como Mal de Panamá o Fusariosis del banano que causó el declive de la producción bananera en América Latina.

En Australia, en 1876 se observó por primera vez síntomas de marchitez asociados con la muerte de las plantas. En 1910, F. Smith aisla por primera vez el hongo a partir de tejido sintomático de banano procedente de Cuba. Este investigador lo identifica como *Fusarium cubense*. Posteriormente basado en nuevos estudios el hongo se reclasifica como *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense (Foc). Más adelante se le añadió la sigla “*forma specialis*” (forma especial) “f.sp.” cubense, para indicar que la especie, se refiere a cepas de *F. oxysporum* que causan enfermedad exclusivamente en banano (Magdama, 2019).

Forero *et al*, (2018) señalan que *Fusarium* es un hongo oportunista causante de marchitamiento vascular y muchas pudriciones en diversas especies de plantas, pero, también causa enfermedades en humanos, vive en materia orgánica en descomposición, está ampliamente distribuido en el mundo entero y las especies más sobresalientes, en términos de mortalidad, son *F. solani* y *F. oxysporum*. Agrios (como se citó en Ortíz *et al.*, 2009), añade que *Fusarium* es un género de hongo capaz de adaptarse a todos los ambientes donde se cultiven plantas.

Adicionalmente, Magdama, (2019) reconoce que de acuerdo a los estudios realizados en el Ecuador, las poblaciones de Foc presentes en el país se originarían de un linaje clonal único, asociados al Grupo de Compatibilidad Vegetativa (GCV) 0120 y caracterizado como raza 1. A nivel mundial existen 24 GCV de Foc, siendo el GCV01213 el que se encuentra asociado a la raza 4 tropical.

Tal como lo reportan Blackwell *et al.*, (como se citó en Ortiz, *et al.*, 2015), el género *Fusarium* pertenece a la familia Nectriaceae, orden Hypocreales, clase, Sordariomycetes, subphylum Ascomycota y se

encuentra integrado por tres estados teleomórficos reconocidos siendo estos Gibberella, Haematonectria y Albonectria.

Los autores, Ortiz, *et al.*, (2015) informan que se ha creado una base de datos pública, *on line*, en la cual se exhiben secuencias de DNA para la identificación de Fusarium. Asimismo indican existen desacuerdos en la identificación del hongo y hay tres posturas que varían entre los caracteres morfológicos hasta los moleculares para agrupar las especies de Fusarium.

1.2.5 Caracterización de hongos capaces de controlar e inhibir a otros microorganismos.

De acuerdo con Rodríguez y Wang, (2020), el empleo de Trichoderma como biocontrolador de otras especies de hongos, constituye una opción eficaz, posible de desarrollar y emplear en grandes cantidades y extensiones de terrenos considerables además en una amplia cantidad y tipos de cultivos, considerando que las especies de Trichoderma son cosmopolitas y son capaces de parasitar a otros hongos fitopatógenos con los cuales ha desarrollado una alta competencia por nutrientes, produciendo además sustancias con carácter de antagonismo para estos fitopatógenos, entre los géneros que son blanco de la acción del biocontrolador se citan a *Rhizoctonia spp.*, *Fusarium spp.*, *Pythium spp.*.

Se han realizado algunas caracterizaciones de los hongos con actividad patogénica, en el cultivo de Chile, tales como los patógenos causantes de la marchitez del Chile y que se asociaron con *F. oxysporum*, al detectarse similitud en las colonias inoculadas en PDA que coincide al desarrollar abundante micelio aéreo con una variabilidad de color desde el rosa pálido, pasando por morado intenso hasta color magenta presentando una forma algodonosa (Andrade H., y otros, 2019).

Acurio y España, (2016) aislaron y caracterizaron dos especies, *T. harzianum* y *T. viride* resaltando que estos hongos favorecen el crecimiento de la asociación de pasturas de Raygrass y Trébol Blanco incrementando la masa de follaje y materia seca. Los investigadores lograron reducir la utilización de fertilizantes químicos en la plantación de pasturas al mejorar la

absorción de nutrientes por la acción y desarrollo de *T. harzianum* *T. viride* en el suelo.

Sánchez et al., (2015), caracterizaron morfológica y culturalmente aplicando la propuesta metodológica de Samuels (2004) el mismo que utilizó los siguientes atributos: (I) presencia de pigmentos, (II) aspecto de la colonia, (III) formación de pústulas, (IV) morfología de fiálides y conidios y, (V) formación de clamidosporas.

Los autores, Sánchez et al., (2015), aislaron en siembra por triplicado, y luego incubaron a 25 ± 1 °C, utilizando discos (3x3 mm) de cultivo con 7 días de edad en placas de Petri medios duales: (1) Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA) y (2) Agar papa dextrosa natural (APDN). Realizaron 60 mediciones de la longitud y ancho de las hifas.

En el estudio realizado por Sánchez et al., (2015), lograron identificar molecularmente a *Trichoderma harzianum* s.l., *T. atroviride*, *T. koningiopsis* y *T. longibrachiatum*, que fueron caracterizados morfológicamente donde, el mayor número de aislamientos correspondió a *T. harzianum* s.l.

Hernández et al., (2016) aislaron cuatro cepas de *Trichoderma* spp las que fueron idetificadas por métodos moleculares como *T. hammatum*, cepa HK701; *T. koningiopsis*, cepa HK702; *T. asperellum*, cepa HK703 y *Trichoderma* sp, cepa HK704 tres de ellas aisladas de la rizósfera de *Helianthus annus* y la última de la rizósfera de *Pinus cembroides*. En este estudio la cepa HK702 fue la que presentó el antagonismo más más agresivo ya que presentó una alta velocidad de crecimiento y limitó el desarrollo de los fitopatógenos al efectuar sobre ellos por hiperparasitismo. Las otras cepas mostraron antagonismo por competencia y antibiosis, pues detienen por completo el crecimiento de los fitopatógenos contra los que fueron evaluados.

La misma fuente, anteriormente mencionada, destaca que el aislado HK703 fue capaz de incrementar significativamente la biomasa de raíz y el follaje de las plantas bajo estudio.

Chavarría y Carmona, (2016) describen que el proceso infectivo de *Trichoderma* incluye la secreción de enzimas que degradan la pared

celular del otro hongo, además por la segregación de exoenzimas hidrolíticas disminuyen el crecimiento y la actividad del patógeno. El hongo *Trichoderma* se adhiere y forma el apresorio mediado con carbohidratos unidos a lecitinas en la pared celular del patógeno en lo posterior empieza la producción enzimática con capacidad de degradación de la pared celular del microorganismo patógeno.

Chavarría y Carmona, (2016), coinciden al afirmar que este evento no constituye ni es suficiente para establecerlo como un único sistema de selección de aislamientos de *Trichoderma* biocontroladoras debido a que las quitinasas no son las únicas enzimas involucradas en el antagonismo, sugieren evaluar la dinámica de inducción de otras enzimas tales como las glucanasas y las proteasas.

Marco legal

ACUERDO MINISTERIAL No. 299 EL MINISTRO DE AGRICULTURA, GANADERÍA, ACUACULTURA Y PESCA ACUERDA: “EXPEDIR LA NORMATIVA GENERAL PARA PROMOVER Y REGULAR LA PRODUCCIÓN ORGÁNICA-ECOLÓGICA-BIOLÓGICA EN EL ECUADOR”

CAPÍTULO I OBJETIVOS Y ÁMBITO DE APLICACIÓN

Artículo 1. OBJETO.- La presente Normativa tiene como objetivo establecer el marco general para promover la investigación, la transferencia de tecnología, la capacitación y regular la producción, procesamiento, comercialización, etiquetado, almacenamiento, promoción y certificación de productos orgánicos de origen agropecuario, incluido la acuicultura, en el Ecuador.

Artículo 2. FINALIDAD.- La finalidad de esta Normativa elevar la competitividad del sector agropecuario, incluido la acuicultura, proteger la salud de los consumidores, preservar el dinamismo vital del ambiente y mejorar la calidad de vida de los actores de la cadena productiva de productos orgánicos a través de la investigación, la transferencia de tecnología y la capacitación para el desarrollo de la agricultura orgánica.

Artículo 3. ÁMBITO.- El presente instrumento será de aplicación obligatoria para las personas naturales y jurídicas, domiciliadas o con establecimiento permanente dentro del territorio en el Ecuador, que se presten a incursionar o intervengan en cualquiera de las fases que comprenda la cadena de producción orgánica de productos de origen agropecuario, incluida la acuicultura. Artículo 4.- Para efectos de esta Normativa, se utilizará los términos “ecológico” o “biológico” como sinónimos de “orgánico”, incluido sus

abreviaturas siempre que estas abreviaturas hagan referencia a productos obtenidos bajo métodos de producción orgánica.

CAPÍTULO II DE LA AUTORIDAD NACIONAL COMPETENTE Artículo 5.- Es competencia del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca MAGAP, la aplicación del presente Acuerdo Ministerial a través de la Dirección de Productividad Agrícola Sostenible de la Subsecretaría de Agricultura, la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD, el Instituto Nacional de Pesca-INP y el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-INIAP. Para este efecto se elaborarán y revisarán las políticas, normas y procedimientos para su cumplimiento en el marco de esta Normativa. Artículo 6.- Se designa a la Dirección de Productividad Agrícola Sostenible de la Subsecretaría de Agricultura, como Autoridad Nacional de Fomento de la producción orgánica en el Ecuador. Artículo 7.- La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del AgroAGROCALIDAD, es la Autoridad Nacional Competente responsable del control de los procesos de certificación de productos orgánicos de origen agropecuario incluido la acuacultura y del control de los actores de la cadena de producción orgánica en el Ecuador, como productores, procesadores, comercializadores, importadores, exportadores, inspectores orgánicos y agencias certificadoras de productos orgánicos. Artículo 8.- El Instituto Nacional de Pesca-INP, es la Autoridad Nacional Competente responsable de promover la investigación, la transferencia de tecnología y capacitación en materia de producción orgánica acuícola en el Ecuador. Artículo 9.- El Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias-INIAP, es la Autoridad Nacional Competente responsable de la investigación, transferencia de tecnología y capacitación en materia de producción orgánica agropecuaria en el Ecuador.

CAPÍTULO III

DEL PLAN NACIONAL DE FOMENTO DE LA PRODUCCIÓN ORGÁNICA

Artículo 10.- La Dirección de Productividad Agrícola Sostenible de la Subsecretaría de Agricultura, formulará y ejecutará la implementación del Plan Nacional de Fomento de la Producción Orgánica, con la participación de los actores públicos y privados de la cadena de producción orgánica, acorde con los Planes de Desarrollo del Gobierno Nacional e iniciativas enfocadas al fomento de la producción orgánica en el país.

CAPÍTULO IV

DEL SISTEMA NACIONAL DE CONTROL DE LA PRODUCCIÓN ORGÁNICA

Artículo 11.- La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del AgroAGROCALIDAD implementará el Sistema Nacional de Control de la Producción Orgánica, garantizando que los productos orgánicos sean producidos, procesados y comercializados de acuerdo a lo dictaminado en esta Normativa y su Reglamento.

Artículo 12.- La inscripción o registro en el Sistema Nacional de Control será de carácter obligatorio para los actores que participen en la cadena de producción orgánica.

Artículo 13.- La Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del AgroAGROCALIDAD, deberá garantizar la capacidad institucional, técnica y sancionadora a las inobservancias de la presente normativa.

Artículo 14.- La certificación de productos que cumplen con esta normativa y demás reglamentos de producción orgánica, deberá ser efectuada por “organismos evaluadores de la conformidad”, legalmente constituidos en el país y que hayan sido acreditados por el Organismo de Acreditación Ecuatoriano-OAE y registrados ante la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD.

Artículo 15.- La certificación alternativa de productos que se comercialicen bajo el esquema de “sistemas alternativos de garantía limitada en los mercados locales”, deberán cumplir con las disposiciones establecidas por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD, dentro de su competencia.

DISPOSICIÓN TRANSITORIA

En el plazo de noventa (90) días contados a partir de la publicación en el Registro Oficial del presente Acuerdo Ministerial, la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD, elaborará el Instructivo para la Producción Orgánica en el Ecuador. Los manuales técnicos para el control de la producción orgánica, se emitirán mediante Resoluciones Técnicas elaboradas, suscritas y aprobadas por la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro-AGROCALIDAD, en su calidad de Autoridad Nacional Competente del Control de la producción orgánica. La normativa para el fomento, promoción de la investigación, transferencia tecnología y capacitación en materia de producción orgánica agropecuaria y acuícola, se emitirán mediante Resoluciones Técnicas elaboradas, suscritas y aprobadas según corresponda por las Instituciones mencionadas en la presente normativa en concordancia con las atribuciones delegadas.

DISPOSICIÓN DEROGATORIA

Derogar expresamente “La Normativa General para Promover y Regular la Producción Orgánica en el Ecuador” prevista en el libro II, Título XV del TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACIÓN SECUNDARIA DEL MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, expedido mediante Decreto Ejecutivo No. 3609, de 14 de enero del 2003, publicado en el Registro Oficial Edición Especial No. 1, de 20 de marzo del 2003.

DISPOSICIÓN FINAL

De la ejecución del presente Acuerdo Ministerial, que entrará en vigencia a partir de su suscripción, sin perjuicio de su publicación en el Registro Oficial, encárguese a la AGENCIA ECUATORIANA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DEL AGRO – AGROCALIDAD (AGROCALIDAD, 2013. p. 12-15).

CAPÍTULO 2

ASPECTOS METODOLÓGICOS

2.1 Métodos.

En el presente trabajo de investigación se empleó un método mixto entre el teórico y el científico al considerar los componentes inductivo-deductivo y empírico-experimental respectivamente.

2.1.1 Modalidad y Tipo de Investigación.

La modalidad del estudio fue cuasiexperimental al levantar muestras de material orgánico de sitios escogidos por el autor de donde se aislarán los microorganismos, en este caso el *Trichoderma sp.* que va a ser caracterizado en el laboratorio.

La investigación tuvo componentes de tipo exploratorio, descriptivo, comparativo y confirmatorio.

2.2 Variables.

2.2.1 Variable Independiente.

Los aislamientos del microorganismo.

2.2.2 Variable Dependiente.

La caracterización morfológica de los microorganismos biocontroladores.

Tabla 1. Matriz de operacionalización de las variables

| TIPO DE VARIABLE | | DEFINICIÓN OPERACIONAL | DIMENSIONES | INDICADORES | TIPO DE MEDICIÓN | INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN |
|----------------------|--|--|--|---|-----------------------------|--|
| INDEPENDIENTE | Los aislamientos del microorganismo. | Las características morfológicas definen parte del modo de infectar de los hongos y son: tipo de colonia, pigmentos y color del micelio, las cuales serán observadas por microscopía óptica y métodos de tinción | | No. Aislamientos | Cuantitativa | Microscopía |
| DEPENDIENTE | La caracterización morfológica de los microorganismos biocontroladores | | Tipo de colonias Forma de las hifas y conidias y conidióforo Color del micelio Presencia de pigmentos Actividad antagónica Capacidad patogénica | Diámetro de la colonia forma y número de conidias, fialides, y conidióforos, (Barnett y Hunter, 1972) Color natural de la colonia Forma de las hifas Presencia/ausencia de fialide Presencia/ausencia de fíbula Presencia/ausencia de pigmentos | Cualitativa Cuantitativa | Microscopía Tinción de Gram Tinción de esporas |

Ulloa, 2022

2.3. Población y Muestra.

2.3.1. Población. – Aunque se trabajó con un hongo del género *Trichoderma*, la población la constituyen los microorganismos biocontroladores de patógenos de las plantas, pero fue despreciada debido a su poca utilidad en la investigación.

2.3.2. Muestra. – Se extrajo una muestra de suelo, material vegetal y orgánico en descomposición de varios puntos de Milagro y Yaguachi. No se consideró un muestreo probabilístico ni al azar debido a que la esencia del trabajo fue más bien de búsqueda y caracterización de los hallazgos microbiológicos

2.4 Técnicas de Recolección de Datos.

Los datos fueron levantados de acuerdo a los crecimientos que ocurrieron en los contenedores donde se inocularán los microorganismos.

Todos los aislamientos se realizaron en medio PDA (Papa Dextrosa Agar, Acumedia) en placas Petri de 9 cm de diámetro y se incubaron a 25 °C durante 5 a 7 días en condiciones de oscuridad.

Para la tinción y posterior caracterización morfológica del *Trichoderma* se utilizó una solución de Azul de lactofenol.

Las cepas de *Trichoderma* se identificaron siguiendo la guía de Barnett y Hunter, (1972), considerando características morfológicas macroscópicas como: textura del micelio, formación de anillos concéntricos y la pigmentación de las conidias.

2.5 Estadística Descriptiva e Inferencial.

La presentación de los datos se planteó de manera descriptiva y fueron expresados en porcentaje.

2.6 Diseño Experimental.

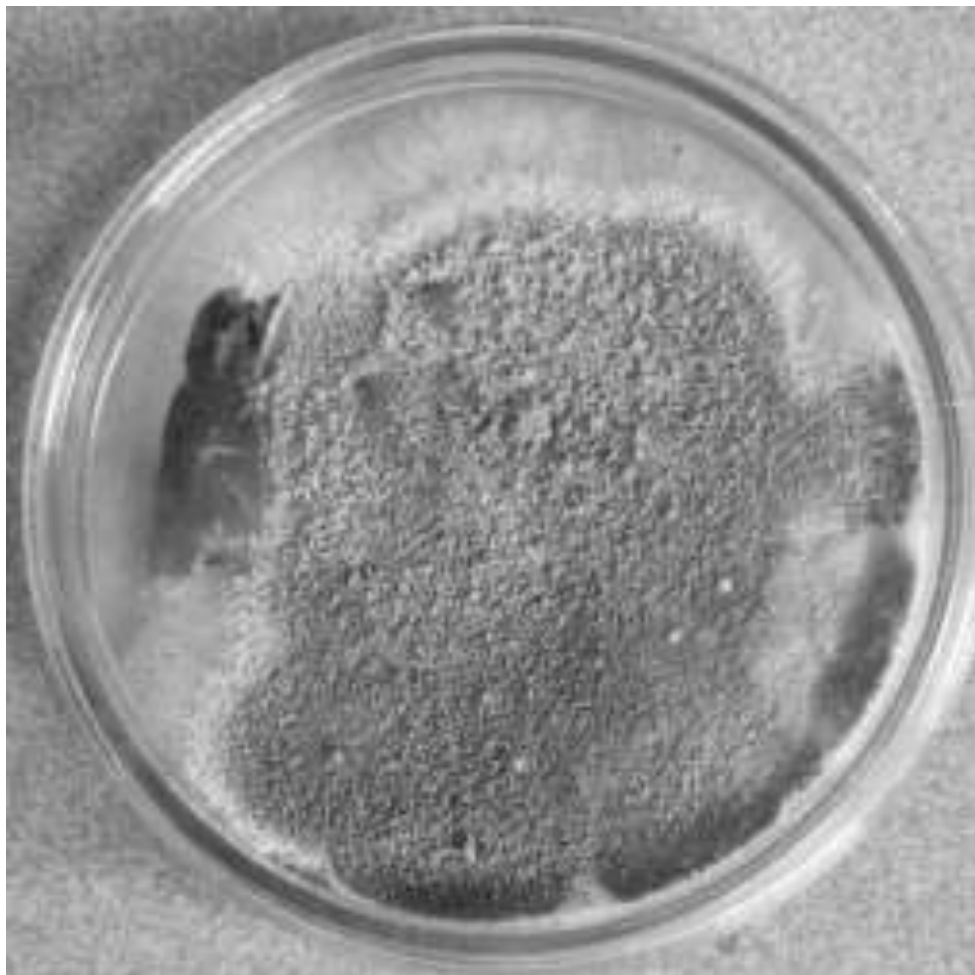
El trabajo de investigación no requirió de un diseño estadístico.

RESULTADOS

El enfrentamiento de *Trichoderma sp* frente a *Fusarium sp* en la prueba dual, presentó una velocidad de crecimiento del *Trichoderma sp* superior al *Fusarium sp*. Fig. 1 y 2. A las 48 horas se observó un detenimiento del desarrollo de *Fusarium* y por consiguiente una mayor aceleración en *Trichoderma*.

El micelio de *Fusarium* mostró un color blanquecino característico y de tipo algodonoso irradiado hacia los bordes del contenedor de Petri.

A las 72 horas de iniciado la prueba, el hongo *Trichoderma* presentó un marcado antagonismo sobre *Fusarium sp*. logrando inhibir parcialmente su crecimiento.



**Figura 1. Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en medio PDA
Elaborado por: Ulloa, 2022**



**Figura 2. Crecimiento de *Trichoderma harzianum* en medio PDA
Elaborado por: Ulloa, 2022**

En las figuras 3 y 4 se aprecian, a las 96 horas, la ocupación total de las estructuras de *Trichoderma sp.*, en las cajas de Petri inhibiendo totalmente a *Fusarium sp.* el cual se observa, tiene apenas un micelio de color blanco que intenta aislarse en los bordes del envase.



**Figura 3. Trichoderma ocupando casi la totalidad de la caja Petri en franco antagonismo con Fusarium sp a las 96 horas
Elaborado por: Ulloa, 2022**

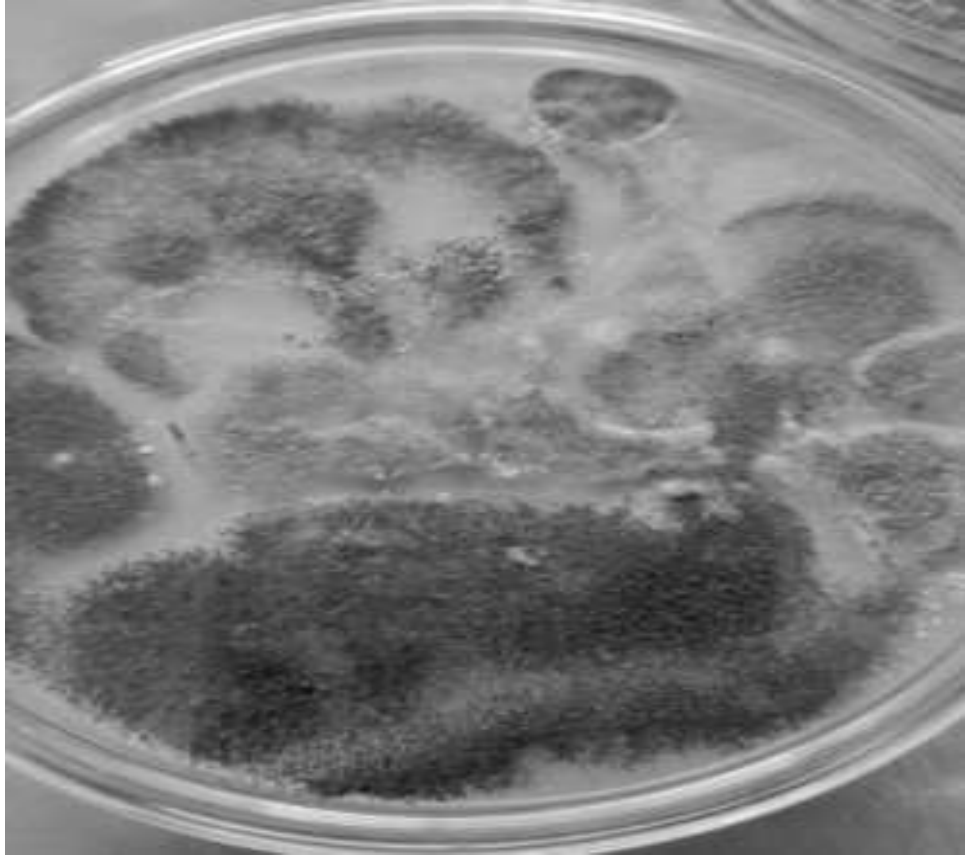


**Figura 4. El micelio de *Trichoderma* inhibiendo totalmente a *Fusarium* sp.
Elaborado por: Ulloa, 2022**

Identificar las estructuras morfológicas de *Trichoderma harzianum* mediante microscopía óptica

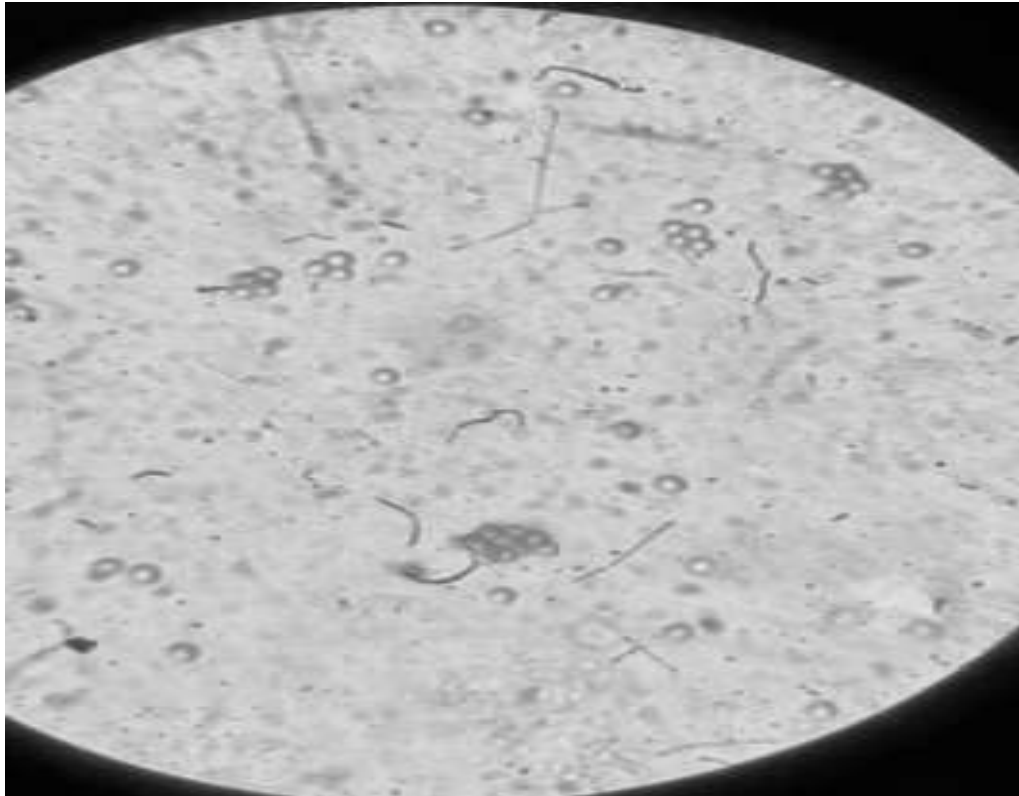
Las observaciones realizadas del crecimiento micelial de *Trichoderma* sp en medio PDA (Fig. 5) muestran que el hongo no presentó un desarrollo del micelio en un solo cuerpo al inicio de la colonización si no en porciones aisladas, esto pudo observarse a las 60 horas de inoculación. Posteriormente, aunque el micelio no exhibió anillos concéntricos, más bien su aspecto fue algodonoso, de color verde

oscuro con bastante uniformidad en todo el cuerpo fúngico. En los bordes presenta un color verde claro



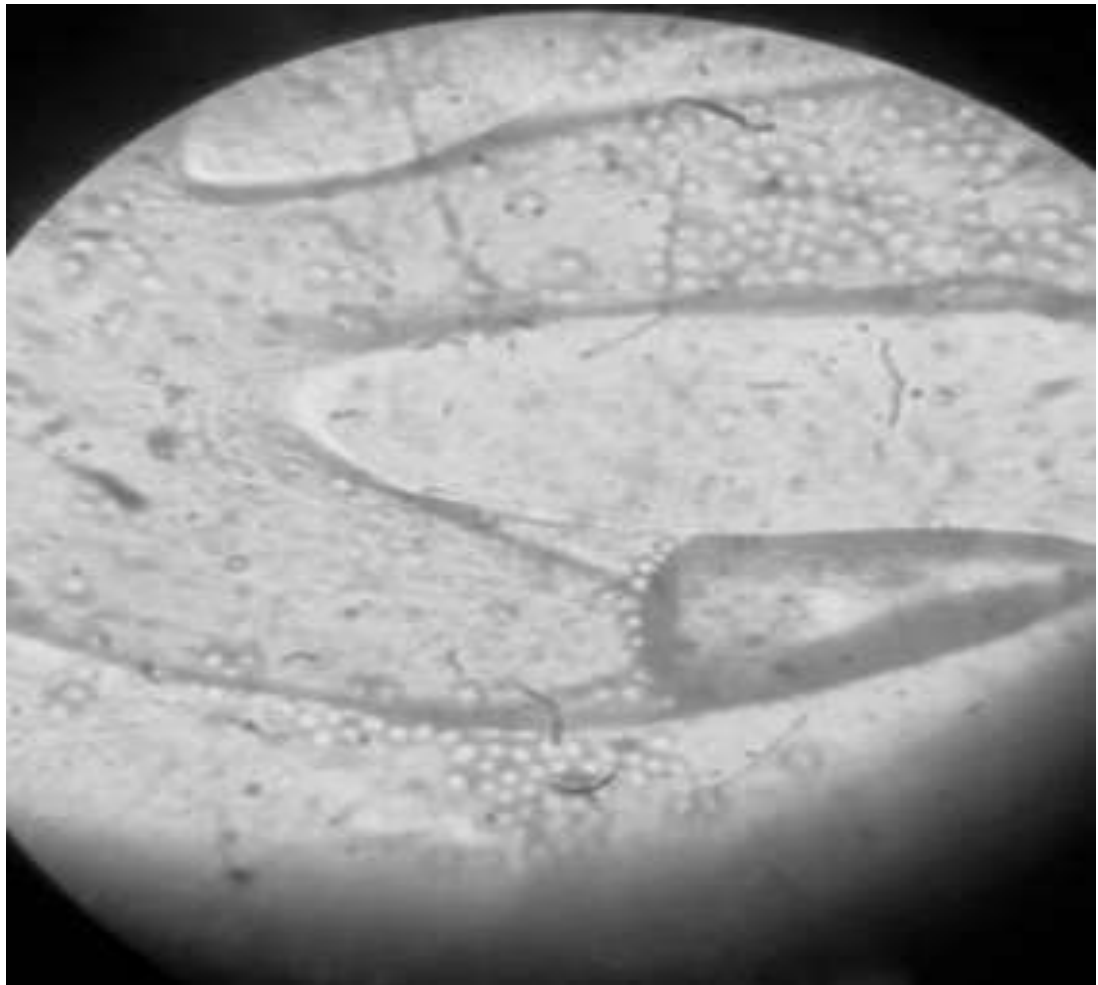
**Figura 5. Forma del micelio de Trichoderma sp.
Elaborado por: Ulloa, 2022**

En la Fig. 6 se exhiben que presentaron estructuras conidiales con forma semiovoides, dispuestas en grupos de hasta 5, asimismo presentó clamidosporas abundantes y algo globuladas.



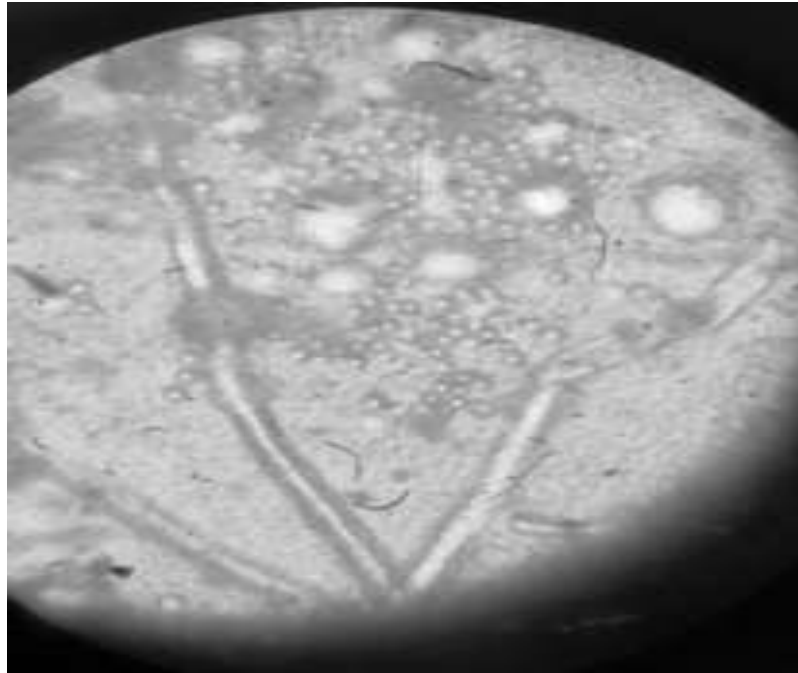
**Figura 6. Estructuras conidiales de *Trichoderma* sp.
Elaborado por: Ulloa, 2022**

La forma de las fiálides en forma apical mostró arreglos a manera de verticilos cruzados, algunas estructuras hifales tipo espinácea con conidióforos con ramificaciones (Fig. 7).



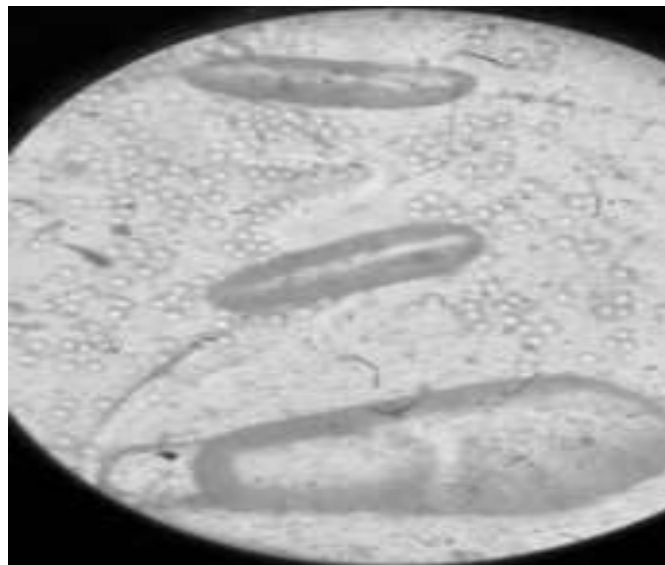
**Figura 7. Forma de las fiálides de Trichoderma sp
Elaborado por: Ulloa, 2022**

El micelio de Trichoderma (Fig. 8) presenta hifas septadas simples y conidióforos transparentes con ramificaciones. Las hifas presentan ramificaciones alargadas entrecruzadas.



**Figura 8. Forma de las hifas de Trichoderma sp.
Elaborado por: Ulloa, 2022**

Las clamidosporas se observan solas y aisladas, sus conidios pueden llegar a medir desde 2,4-3,2 a 2,2-2,8 μm , siendo por lo general de forma oval, unicelulares, de color predominantemente verde el cual posee un crecimiento precoz en medio PDA y en otros de carácter sintético (Fig. 9).



**Figura 9. Clamidosporas de Trichoderma sp.
Elaborado por: 2022**

Describir la actividad patógena de *Fusarium sp.*, sobre el tejido vegetal que parasita

Se observó los cojinetes florales de las plantas de cacao, las cuales presentaban un color rosado pálido o amarillo pálido con algunos pigmentos de color rojizo muy tenues y un aspecto arrugado (Fig. 10).



Figura 10. Cojinetes florales de cacao presuntamente infectados con *Fusarium sp.* Elaborado por: Ulloa, 2022

Las mazorcas de cacao con infección presentaron el crecimiento de un micelio pardo (Fig. 11).



Figura 11. Mazorcas de cacao infectadas con *Fusarium sp.* Elaborado por: Ulloa, 2022

Las especies de *Fusarium sp.* penetran por la raíz y colonizan el sistema vascular degradando, enzimáticamente, las barreras naturales desarrolladas por las plantas.

DISCUSIÓN

El antagonismo observado del biocontrolador *Trichoderma sp* frente a *Fusarium sp* puede deberse a la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento del patógeno con lo cual disminuye su acción destructiva del tejido que intenta parasitar tal como se pudo apreciar en las pruebas realizadas en laboratorio a nivel *in vitro*.

Los resultados encontrados destacan la capacidad invasiva del antagonista frente al patógeno y concuerdan con los de Vargas y Polanco (tal como se citó en Urgelles *et al.*, 2020).

Morales *et al.*, (2020) observaron, coincidentalmente, cierta interacción entre *T. harzianum* y *Colletotrichum sp.*, *Alternaria sp.* y *Curvularia sp.* mostrando un alto nivel de parasitismo en los casos bajo estudio. Asimismo, el experimento mostró una importante disminución del crecimiento de las especies fúngicas antes descritas en las pruebas duales lo que constituye en un indicador del potencial antagónico de *T. harzianum*. La inhibición observada del crecimiento radial presentó significancia ($p < 0.05$) y presentó una variación inferior al 30 pero superior al 80%.

Al respecto, Martínez *et al.*, (2020), en el cultivo de garbanzo demostraron que *Trichoderma* presentó una alta capacidad antagónica en el control de *R. solani*, *F. solani*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum* f. sp. ciceri, todas a nivel *in vitro* y en tiempos menores a 72 horas. Constituyendo, según estos autores, en una alternativa factible para controlar el patógeno *Fusarium oxysporum* en garbanzo.

Michel *et al.*, (2019), demostraron experimentalmente a nivel *in vitro* que algunas cepas de las especies *Trichoderma inhamatum* y *T. asperellum* presentaron actividad biocontroladora de *Phytophthora parasítica* y *Fusarium oxysporum* como agentes causales de la Pata Prieta en el cultivo de jamaica en el estado de Guerrero en México. El potencial antagónico mostrado fue agresivo a las 36 horas y se debió posiblemente a los rasgos de adaptación presentados por las

cepas antagónicas en esa zona de México en la plantación de jamaica, zona que mantiene una alta incidencia de la Pata Prieta.

Duarte, Pozo y Martínez, (2018) informan que inicialmente se le atribuía, con razón, de acuerdo a algunas evidencias, que la producción de ciertos metabolitos capaces de difundirse alrededor de las cepas que van a ser controladas, ocurría a periodos iniciales de la interacción como efectivamente se demostró más adelante.

Las observaciones de las estructuras morfológicas de *Trichoderma sp.* arrojan una alta similitud con los reportes realizados sobre la forma de las hifas, conidias y clamidosporas asociadas a la especie *harzianum*.

García *et al.*, (2017) encontró en cepas nativas de *Trichoderma*, un micelio de consistencia esponjosa y abundante, mientras que en cepas no nativas, estas presentaron hasta tres anillos concéntricos bien definidos, de color blanco en sus micelios pero con conidias de color verde. Las primeras cepas presentaron pigmentación amarilla y algunas con anillos concéntricos. Cabe indicar que en las placas no se observaron anillos y el micelio de color blanco ocupó la totalidad de las placas.

García *et al.*, (2017), destaca que la pigmentación de las conidias de *Trichoderma sp.* varió desde el tono verde claro a verde oscuro. Asimismo, concluye que a pesar de haber provenido del mismo sitio, las cepas presentaron tonalidades diferentes, El mismo autor atribuye a los factores del entorno del microorganismo, como fuente de estrés, los causantes de la pigmentación presentada así como la morfología y cantidad de las conidias.

F. oxysporum ha demostrado ser un patógeno con gran capacidad de infectar tejido vegetal desde la semilla, pasando por plántulas, frutos y flores en la mayoría de las plantas. Este poder infectivo se le atribuye a la proliferación de sus esporas, conidios, clamidosporas e hifas, así como en la producción de apresorios, y otras estructuras capaces de desarrollarse en ambientes poco favorables.

Agrios (como se citó en Espinoza *et al.*, 2019)) describe que *Fusarium oxysporum* habita naturalmente el suelo y posee una gran capacidad de infectar a las plantas invadiéndola de manera directa o indirecta por heridas de todo tipo a nivel de las raíces desde donde se extiende hasta colonizar el xilema; su acción infectiva provoca marchitamiento y muerte del tejido vegetal y la planta misma, este hongo es capaz de persistir en el suelo gracias a la producción de clamidosporas.

Delgado (como se citó en Polanco, 2016) señala que los primeros síntomas del marchitamiento como enfermedad producida por *Fusarium* sp. empiezan con el apareamiento de algunas hinchazones o protuberancias en los cuales aparecen unos puntos de color verde similares a yemas, cuyo número se incrementa paralelamente al crecimiento de la agalla, con diámetros de varios centímetros.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES:

- El hongo *Trichoderma*, identificado y caracterizado morfológicamente como de la especie *harzianum* posee una actividad antagónica muy importante sobre *Fusarium sp.*, a nivel *in vitro*, pudiendo llegar a reducir la población de este hasta las 96 horas de su colonización
- *T. harzianum* posee hifas septadas alargadas, multinucleadas, con conidios y la forma de su estructura micelial contribuye en parte con su capacidad antagónica
- *Fusarium sp.* es un patógeno cosmopolita que infecta y parasita muchas especies vegetales en casi todos sus estadíos por lo que determinar su capacidad infectiva es un trabajo arduo y complejo.

RECOMENDACIONES:

- Evaluar otras especies de *Trichoderma* para determinar su acción antagónica en especies fúngicas y bacterianas
- Establecer mediante experimentación los mecanismos celulares involucrados en el poder infectivo de *Fusarium sp.*
- Mediante los postulados de Koch determinar en el laboratorio los daños ocasionados en los tejidos vegetales por parte del patógeno.
-

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Acurio V., r., & España I., C. (2017). Aislamiento, caracterización y evaluación de *Trichoderma* spp. como promotor del crecimiento vegetal en pasturas de raygrass (*Lolium perenne*) y trébol blanco (*Trifolium repens*). *LA GRANJA Revista de Ciencias de la Vida*, 25(1), 53-61. Obtenido de http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-85962017000200053
- Adame G., J., Trigos L., A., Iglesias A., L., Flores E., N., & Luna R., M. (2015). Variaciones isoenzimática y patogénica de *Fusarium* spp. asociadas con la pudrición de tallo y raíz de vainilla. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13(3), 299-306. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/939/93920942006.pdf>
- AGROCALIDAD. (2015). *Instructivo de la Normativa General para promover y regular la producción orgánica-ecológica-biológica en el Ecuador*. Quito: Ministerio de Agricultura y Ganadería y Agrocalidad. Manual legal de aplicación. Obtenido de <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/by3.pdf>
- Andrade H., P., Luna C., A., Osorio H., E., Molina G., E., Landero V., N., & Barrales C., H. (2019). Antagonismo de *Trichoderma* spp. vs hongos asociados a la marchitez de Chile. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas volumen 10 número 6*, 10(6), 1259-1273. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v10n6/2007-0934-remexca-10-06-1259.pdf>
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2015). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova - Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10(18), 135-250. Obtenido de [file:///C:/Users/Hp/Downloads/1003-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1261-1-10-20150512%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Hp/Downloads/1003-Texto%20del%20art%C3%ADculo-1261-1-10-20150512%20(1).pdf)
- Barnett, H. L., & B., H. B. (1972). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Mycologia*,

64(4), 930. <https://doi.org/10.2307/3757954>

- Castañeda A., E., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 13(26), 53-65. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v14n26/v14n26a06.pdf>
- Chavarría V., M., & Carmona S., R. (2016). Efecto de microorganismos antagonistas en el control de la enfermedad denominada "Nectria" en la melina *Gmelina arborea* Roxb. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú | Volumen especial | págs 21-29, 1(1), 21-29*. Obtenido de <https://181.193.125.13/index.php/kuru/article/view/2549/2339>
- Chávez M., N., Noreskal, M., Staver, C., & Dita, M. (2015). Evaluación de microorganismos endófitos para la protección de vitroplantas de banano y el control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Fitosanidad*, 19(2), 101-105. Obtenido de disponible en <file:///C:/Users/Hp/Downloads/IN190198.pdf>
- Coz T. G. (2019). Influencia del pH y calcio, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* spp., aislados en cultivos agrícolas de importancia en la región San Martín. [Universidad Nacional de San Martín]. In Tesis. <http://repositorio.unsm.edu.pe/bitstream/handle/11458/3434/AGRONOMIA - Gilberth Hugo Coz Torres.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Duarte L., Y., Pozo M., L., & Martínez C., B. (2018). Antagonismo in vitro de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislados de *Fusarium* spp. *Rev. Protección Veg.*, , 33(1), 1-10. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v33n1/rpv05118.pdf>
- Eraso I., C., Acosta R., J., Salazar G., C., & Betancourth G., C. (2015). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agripecuaria*, 15(2), 237-249. Obtenido de <https://www.redalyc.org/pdf/4499/449945182005.pdf>

- Espinoza A., C., Gallegos M., G., Hernández C., F., Ochoa F., Y., Cepeda S., M., y Castillo R., F. (2019). Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Ecosist. Recur. Agropec.*, 6(16), 45-55. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v6n16/2007-901X-era-6-16-45.pdf>
- Forero R., C., Alvarado F., A., Ceballos R., A., González C., L., Linares L., M., Castañeda S., R., . . . Rodríguez B., M. (2018). Evaluación de la capacidad patogénica de *Fusarium*spp. en modelos vegetal y murino. *Rev Argent Microbiol.*, 50(1), 90-96. Obtenido de <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0325754117300962?token=61775B3B64A103675FBB13BC95BAD7173332B37D2B7E077BD0008ACE15D03BB11E9B2AD00E14171494C1E96F817366A9&originRegion=us-east-1&originCreation=20210821044801>
- García N., H., Martínez C., A., Hermosa P., M., Monte V., E., Aguilar O., C., & González E., C. (2016). Caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *Trichoderma* y su potencial de biocontrol sobre *Phytophthora* infestans. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(1), 58-80. Obtenido de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092017000100058&script=sci_arttext
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., & Miranda, I. (2015). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico y expresión de actividad quitinasa. *Rev. Protección Veg.*, 25(1), 58-63. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522011000100004
- Hernández M., J., Sánchez P., M., García O., J., Mayek P., N., González P., J., & Quiroz V., J. (2015). Caracterización molecular y agronómica de aislados de *Trichoderma* spp nativos del noreste de México. *176 Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XIII No. 2 Diciembre 2011 176-185*, 13(2), 176-185. Obtenido de <file:///C:/Users/Hp/Downloads/Dialnet->

CaracterizacionMolecularYAgronomicaDeAisladosDeTri-
4808840%20(1).pdf

Leyva R., L., Cruz M., M., Pichardo, T., Caraballos B., I., & Alvarado C., Y. (2017). Antagonistas microbianos a *Fusarium* spp., como agente causal de pudrición de raíces y tallo en melón. *Biotecnología Vegetal* , 17(4), 229-236. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v6n16/2007-901X-era-6-16-45.pdf>

Magdama, F. (2019). *Fusarium oxysporum* el hongo más temido en la industria del banano. *ECUADOR ES CALIDAD: Revista Científica Ecuatoriana*, 2019, Vol. 6, 6(1), 19-23. Obtenido de <https://revistaecuadorescalidad.agrocalidad.gob.ec/revistaecuadorescalidad/index.php/revista/article/view/61>

Mamani H., L. (2019). *Bacterias endófitas productoras de metabolitos con efecto antagónico contra Fusarium verticillioides principal fitopatógeno de cereales* (Vol. 1). La Paz: Universidad Nacional Mayor de San Andrés. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Obtenido de <https://repositorio.umsa.bo/bitstream/handle/123456789/25264/T-1963.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Martínez , B.; Infantel , D.; Reyes, Y. (2015). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Rev. Protección Veg. Vol. 28 No. 1 (2013): 1-11*, 28(1), 1-11. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v28n1/rpv01113.pdf>

Martínez de la Parte, E., P. V. L. (2015). Incidencia de enfermedades fúngicas en plantaciones de cacao de las provincias orientales de Cuba. *Revista de Protección Vegetal*, 30(2), 87–96. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30n2/rpv02215.pdf>

Martínez M., T., Guerrero A., B., Pecina Q., V., Rivas V., P., González P., E., & Angeles N., J. (2020). Antagonismo de *Trichoderma harzianum* contra la fusariosis del garbanzo y su efecto biofertilizante. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* , 11(5), 1135-1148. Obtenido de

<http://cienciasagricolas.inifap.gob.mx/editorial/index.php/agricolas/article/view/2325/3347>

- Martínez, B. (2020). Interacción entre el hongo endofítico *Fusarium oxysporum* cepa 162 y la bacteria endofítica *Rhizobium etlicepe* G12. *La Calera. Revista Científica*, 20(34), 1-9. Obtenido de <https://www.camjol.info/index.php/CALERA/article/view/9601/10981>
- Martínez, B.; Infante, D.; Peteira, B. (2015). Taxonomía polifásica y variabilidad en el género *Trichoderma*. *Rev. Protección Veg. Vol. 30 Número Especial (diciembre, 2015): 11-22, 30(1), 11-22*. Obtenido de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v30s1/rpv004s15.pdf>
- Mejía B., M., Reyes R., A., Cristóbal A., J., Tun S., J., Borges G., , L., & Pacheco A., J. (2016). *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1), 208-222. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v34n3/2007-8080-rmfi-34-03-00208.pdf>
- Méndez U., J., Flores H., M., & Páramo A., L. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente a hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica* , 30(2), 96-110. Obtenido de <https://lamjol.info/index.php/NEXO/article/view/5530>
- Michel A., A., Hernández M., J., Toledo A., R., Sabino L., J., & Romero R., T. (2019). Capacidad antagónica DE *Trichoderma* spp. nativa contra *Phytophthora* parasitica Y *Fusarium oxysporum* aislados de cultivo de Jamaica. *Rev. Fitotec. Mex.* , 42(3), 235-241. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/rfm/v42n3/0187-7380-rfm-42-03-00235.pdf>
- Morales M. L., Andrade H. P., Valencia de Ita M. Angeles., Romero A. O., Silva R. H., C. P. C. (2020). Caracterización de hongos asociados al cultivo de fresa y efecto antagonista in vitro de *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3), 434–449. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>

- Oliva O., L., Velázquez A., T., Sosa P., R., Partida R., L., Díaz V., T., Arciniega R., J., & López O., C. (2017). Control de la fusariosis vascular del garbanzo (*Cicer arietinum* L.) por microorganismos nativos de Sinaloa, México. *Agrociencia* 51: 683-695. 2017, 51(1), 683-693. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/agro/v51n6/1405-3195-agro-51-06-00683.pdf>
- Ortíz , E., Riasco, D., Angarita, M., Castro, O., Rivera , C., Romero, D., . . . Hoyos, L. (2015). Tópicos taxonómicos para el estudio del género *Fusarium*. *Fitopatología Colombiana*, 33(2), 61-67. Obtenido de file:///C:/Users/Hp/Downloads/T%C3%B3picos%20para%20el%20estudio%20de%20Fusarium_unlocked.pdf
- Pérez C., D., García G., N., Gallegos M., G., Ruiz C., M., Berlanga R., D., & Ríos V., C. (2015). Aislamiento de actinomicetos asociados a rizosfera de árboles de manzano antagonistas a *Fusarium equiseti*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(7), 1629-1638. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v6n7/v6n7a16.pdf>
- Pérez T., E., Bernal C., A., Millanes V., P., Sierra R., Y., Leiva M., M., Marín G., S., & Monteagudo H., O. (2018). Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (cepa a-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro*, 30(1), 1-13.
- Polanco Y. (2016). Biocontrol de *Fusarium* sp. por *Trichoderma* spp. en *Theobroma cacao* L en condiciones in vitro y vivero. In Tesis de postgrado. <http://mriuc.bc.uc.edu.ve/bitstream/handle/123456789/4544/YPolanco.pdf?sequence=1>
- Retana, K., Ramírez, J., Castro, O., Blanco, M. (2018). Nota técnica 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. www.mag.go.cr/revagr/index.htmlwww.cia.ucr.ac.cr

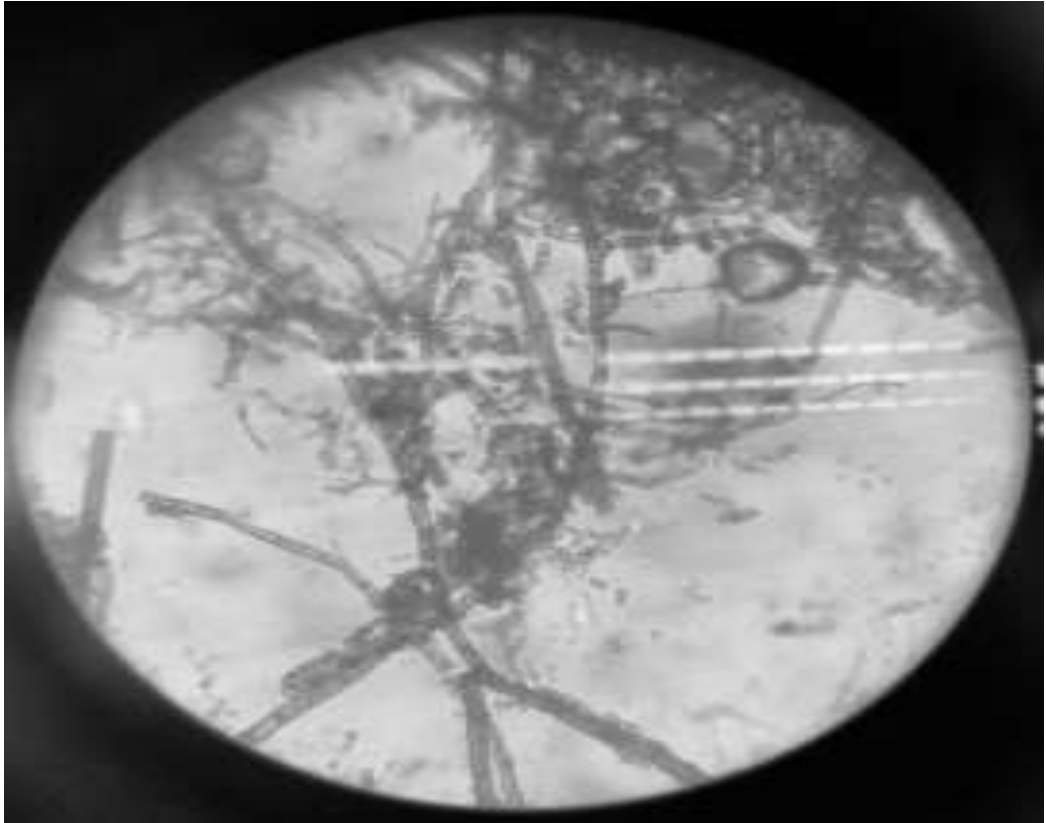
- Rodríguez , I. C., y Flores, J. (2018). Capacidad antagónica in vitro de *Trichoderma* spp. frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro*, 30(1), 49-58. Obtenido de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100005&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1316-3361
- Rodríguez G. D., Wang W. A. (2020). Efectividad a nivel in vitro de *Trichoderma* spp. nativos e importados contra *Fusarium oxysporum*. *Agronomía Costarricense*, 44(2), 109–125. <https://doi.org/10.15517/rac.v44i2.43096>
- Rodríguez P. M., Campo A. R., Cardona A. C., Manjarres C. E., R. T. B. (2021). *Trichoderma* spp. biocontrolador de marchitez vascular (*Fusarium* spp.) de la berenjena en el Caribe colombiano. *Biotecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 19(2), 158–169. <https://doi.org/10.18684/bsaa.v19.n2.2021.1847>
- Samaniego F., L., Maimouna , H., Corbea , O., Rondón C., A., & Placeres E., I. (2018). Aislamiento, identificación y evaluación de cepas autóctonas de *Trichoderma* spp. antagonistas de patógenos del suelo. *Rev. Protección Veg.* , 33(3), 1-11. Obtenido de http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522018000300003&script=sci_arttext&tlng=pt
- Sánchez A., D., Barrera, V., Reybet, G. E., & Sosa, M. C. (2015). Biocontrol con *Trichoderma* spp. de *Fusarium oxysporum* causal del “mal de almácigos” en pre y post emergencia en cebolla. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 114(1), 61-70. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/47308/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Savín M., J., Hernández M. Luis., Ceiro C. W., Ávila Q. G., Palacios E. A., Ruiz E. F., R. B. M. (2021). Caracterización morfológica y potencial de biocontrol de especies de *Trichoderma* aisladas de suelos semiáridos. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 39(3), 435–451. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2106-7>

- Stocco, M. C. (2015). *Control biológico de Mycosphaerella graminicola, patógeno del trigo, con cepas de Trichoderma harzianum caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Tesis doctoral. Obtenido de http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/42904/Documento_completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Umaña C. J., Orozco C. S., Umaña C. R., M. B. R. (2019). Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de Trichoderma para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1), 125. <https://doi.org/10.15359/rca.53-1.7>
- Urgelles C. I. Abreu, A. Abreu R. N. Díaz R. A., F. M. Y. (2020). Actividad antagónica in vitro de Trichoderma sp. frente a Fusarium sp. *Cub@: Medio Ambiente y Desarrollo*, 20(39), 1–4. <http://cmad.ama.cu/index.php/cmاد/article/view/262>
- Vega T., M., Ruiz C., M., Pérez C., D., Berlanga R., D., Ornela P., J., Rios V., C., . . . Denise R., F. (2019). Actividad antifúngica in vitro de microorganismos antagonistas contra Fusarium oxysporum de rizosfera de árboles de aguacate en Xalisco, Nayarit, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 37(No. Esp. 1), 57-64. Obtenido de <https://www.smf.org.mx/rmf/ojs/index.php/RMF/article/view/182>

ANEXOS



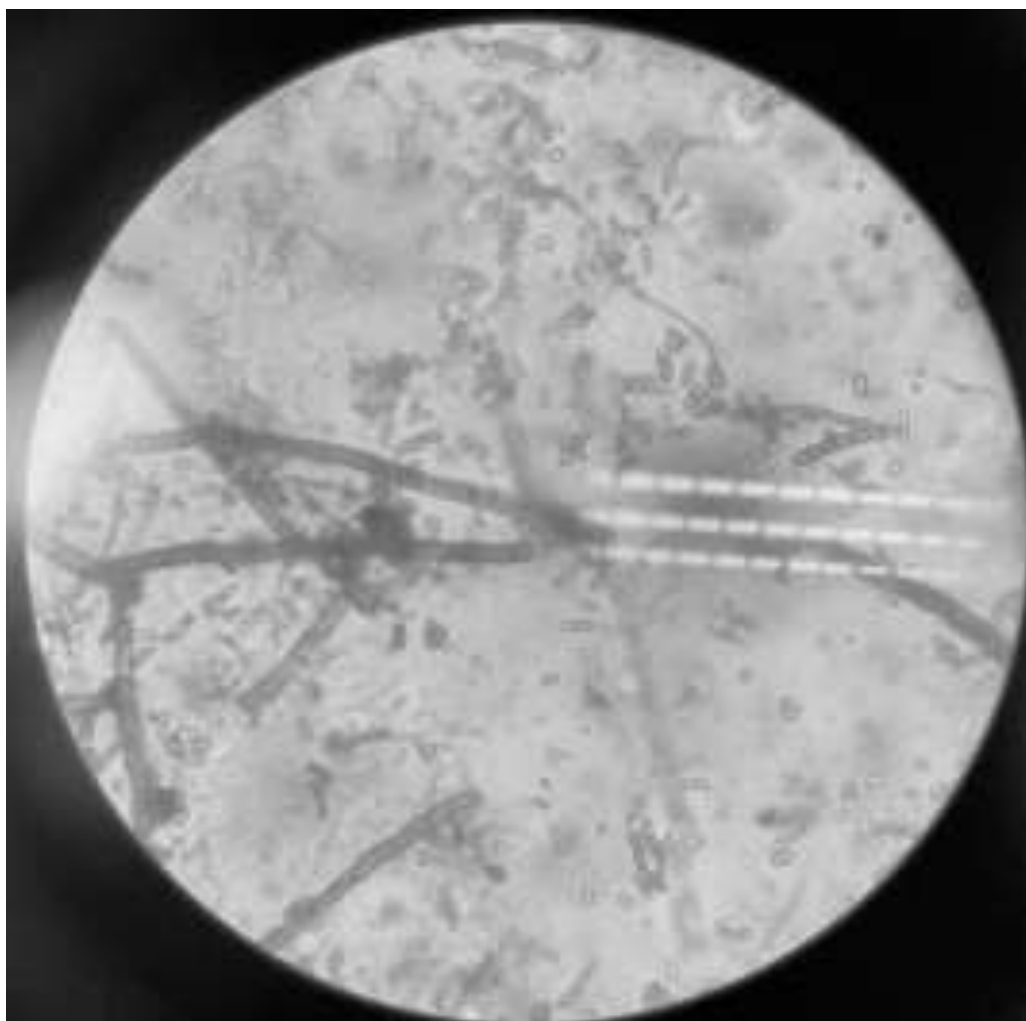
**Anexo No. 1. Recolección de hongos en sustrato de arroz
Elaborado por: Ulloa, 2022**



**Anexo No. 2. Observación microscópica de las estructuras de *T. harzianum* teñida con azul de lactofenol
Elaborado por: Ulloa, 2022**



Anexo No. 3. Preparando el azul de lactofenol 1:10 como sustancia de tinción
Elaborado por: Ulloa, 2022



**Anexo No. 4. Observación microscópica de las estructuras de *T. harzianum* teñida con azul de lactofenol
Elaborado por: Ulloa, 2022**



**Anexo No. 5. Observando en el microscopio las estructuras fúngicas para su caracterización morfológica
Elaborado por: Ulloa, 2022**



Anexo No. 6.

**Recolectando las muestras de hongos en sustrato de arroz cocinado
Elaborado por: Ulloa, 2022**



UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR
Av. 23 de mayo y las Jaramas
Sede: QUITO - ECUADOR
Buenos Aires



Oficio Nro. 001-2022
Guayaquil, 24 de mayo de 2022

Asunto: Informe de Laboratorio

Ing. Elkotb Khalrat Elsalous Ahmed Msc,
DIRECTOR DE LA ESCUELA DE POSGRADO "Ing. Jacobo Bucaram Ortiz, PhD.",
UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR

De mis consideraciones:

Por medio de la presente Sr. Director, en mi calidad de encargado de laboratorio yo el Ing. Joaquín Mocán Bazaña, PhD con cédula de identidad 1202567762, CERTIFICO QUE: El Ing. David Ulloa Bucaram realizó trabajos prácticos y experimentales en relación a su tesis de maestría de Sanidad Vegetal, denominada: "CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE BIOCONTROLADORES SOBRE *Fusarium* Sp., BAJO CONDICIONES CONTROLADAS", el mismo que ha sido elaborado y presentado por el estudiante, quien cumple con los requisitos técnicos y legales exigidos por la Universidad Agraria del Ecuador para este tipo de estudios.

Atentamente,

Ing. Joaquín Mocán Bazaña, PhD.

Ci: 1202567762

Encargado del Laboratorio.

Anexo No. 7. Certificado de aprobación de trabajos prácticos y experimentales, suscrito por el Encargado del Laboratorio de la UAE. Elaborado por: Ulloa, 2022