

EFFECTO COMPARATIVO DE UNA LOCAL NATIVA Y OTRA COMERCIAL DE *Trichoderma*
spp.. PARA EL CONTROL DE *Fusarium* spp.. PRESENTE EN UN CULTIVO DE LECHUGA
(*Lactuca sativa* L..) PAMPLONA – NORTE DE SANTANDER.

Magda Katerine Pérez Flórez



UNIVERSIDAD DE PAMPLONA
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
DEPARTAMENTO BIOLÓGÍA
PAMPLONA NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA

2021

EFFECTO COMPARATIVO DE UNA CEPA LOCAL Y OTRA COMERCIAL DE *Trichoderma*
spp.. PARA EL CONTROL DE *Fusarium* spp.. PRESENTE EN UN CULTIVO DE LECHUGA
(*Lactuca sativa* L..) PAMPLONA – NORTE DE SANTANDER.

MAGDA KATERINE PÉREZ FLÓREZ

Trabajo de grado presentado para optar por el título de:

BIÓLOGA

Director

CRISTIAN SCHMELINK RAMOS MONTERROSA Msc

Co-Directora

ANGELA MARITZA CAJIAO PEDRAZA Msc.

UNIVERSIDAD DE PAMPLONA

FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS

DEPARTAMENTO BIOLOGÍA

PAMPLONA NORTE DE SANTANDER, COLOMBIA

2021

Este trabajo primero que todo se lo dedico a Dios quien me dio la sabiduría y fortaleza en todo momento, a mis padres Oscar Eduardo Pérez Rojas y Rosa Helena Florez Contreras quienes son mi apoyo y mi motivación en mi diario vivir, y a mis hermanos por siempre darme voz de aliento cuando lo necesite.

A ustedes les dedico este triunfo.

Gracias.

Agradecimientos

Agradezco a Dios por permitir cumplir con el desarrollo de este proyecto y estar siempre presente
en mi diario vivir.

A mis Padres y hermanos por el apoyo incondicional en cada una de mis metas.

Agradezco a mis tutores de tesis Cristian Schmelink Ramos Monterrosa y Ángela Cajiao por su
paciencia, comprensión, sabiduría y apoyo incondicional desde el inicio de este proyecto de
investigación.

Agradezco a mis amigos Bladimir Becerra, Lina Galvis e Ingrid Blanco, y a mi pareja Winston
Jácome por acompañarme en este proceso, llenarme de amor en cada momento y siempre tener una
voz de aliento cuando pensaba desistir, ustedes son parte importante de este proyecto y de mi vida.

A mi alma Mater por brindarme todos mis conocimientos, permitiendo una vez más ser parte de su
familia.

A cada persona que estuvo apoyándome, dándome voz de aliento y compartiendo su sabiduría a
ellos gracias.

A mi alma Mater por brindarme los conocimientos, permitiendo una vez más ser parte de su familia.

“La gente positiva es la que se cae, se levanta, se sacude, se cura los raspones, le sonrío a la vida y
dice: ¡ahí voy de nuevo!”.

Tabla de contenido

Resumen	1
Abstract	3
Introducción	4
Capítulo I	6
Planteamiento del problema	6
Justificación	8
Objetivos	10
Objetivo General	10
Objetivo específico	10
Capítulo II.....	11
Marco referencial	11
Antecedentes Internacionales	11
Antecedentes Nacionales y locales	13
Marco Teórico	16
Lactuca Sativa L.	16
Variedades	16
Suelo	17
Clima	17
Humedad relativa	18
Trasplante	18

Distanciamiento de siembra	18
Fertilización de la lechuga	19
Plagas del suelo	20
Enfermedades de la lechuga	21
Marchitez vascular <i>Fusarium spp.</i>	21
Pruebas identificación de hongos	22
Observación microscópica	22
Técnica de adhesión a cinta	22
Método microcultivo	22
Pruebas bioquímicas	23
Pruebas de identificación preliminar y lectura inmediata	22
Catalasa	23
Oxidasa	23
Fermentación de azúcares	24
Actividad enzimática	24
Organismos antagonicos	26
Antagonista <i>Trichoderma spp.</i>	27
Competencia	29
Producción metabolitos	30
Métodos de aplicación	30
Capítulo III	32

Metodología	32
Obtención, aislamiento y caracterización de las cepas antagonicas	32
Aislamiento y crecimiento del agente fitopatogeno	34
Evaluación de la actividad antagonista in vitro de los controladores biológicos contra el fitopatogeno <i>Fusarium spp.</i>	35
Antagonismo de las cepas (TN1, TN2, TN3, TN4 y TC) contra (FS1, FS2, FS3)	35
Caracterización bioquímica	37
Prueba celulasa	37
Prueba amonificación	37
Prueba amilasa	37
Prueba reducción de nitrato	37
Preparación en masa y conteo de conidios del agente biológico	38
Análisis de la eficiencia protectora de los controladores biológicos en condiciones de campo abierto	39
Área de estudio	39
Preparación del terreno y establecimiento del cultivo	40
Riego	41
Control de malezas	41
Diseño Experimental	41
Diseño de los tratamientos en parcela experimental	42
Aplicación del patógena y los tratamientos.....	43
Variables de estudio	43

Capítulo IV	44
Resultados y análisis	44
Aislamiento, caracterización morfológica y observación microscópica de los controladores biológicos y hongos fitopatógenas	44
Cepas de trichoderma spp.	49
Caracterización bioquímica en las cuatro cepas de <i>trichoderma spp.</i> , y en los hongos fitopatógenas presentes en el cultivo de lechuda del Colegio Normal Superior	50
Determinación del crecimiento miceliar de las cepas de <i>Trichoderma app.</i> , sobre las cepas de <i>fusarium spp.</i> , presentes en el cultivo de lechuga del colegio Normal Superior	53
Escala de evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo)	57
Biopreparados para la dosificación de los hongos antagonistas.	58
Efecto protector de las cepas TN4 y TC en condiciones de campo abierto	58
Incidencia	58
Capítulo V	61
Conclusiones	61
Recomendaciones	62
Bibliografía	63
Apéndice	71

Listado de tablas

P.

Tabla 1. Grupos enzimáticos	25
Tabla 2. Escala empleada para la evaluación de la capacidad antagónica de los microorganismos	36
Tabla 3. Diseño en bloques completamente al azar (BCA).....	42
Tabla 4. Descripción de los tratamientos	43
Tabla 5. Actividad enzimática de los hongos fitopatógenas	51
Tabla 6. Resultados escala del grado de capacidad antagónica	57
Tabla 7. Concentración de los conidios en los biopreparados	63
Tabla 8. Resultados de ANOVA variables fitosanitarias, incidencia.....	63

Listado de figuras

Figura 1. Lote de los predios del colegio Normal Superior de Pamplona sitio donde se aisló el <i>Trichoderma Spp.</i>	33
Figura 2, Plantas recolectadas con lesiones típicas que ocasionan el hongo <i>Fusarium</i> y procedimiento a los cuales fueron sometidos.....	34
Figura 3. Mediciones del crecimiento radial del patógeno y antagonista en el día 3 con la ayuda de un calibrador (pie de rey).	36
Figura 4. Preparación de arroz para la elaboración de medios de cultivos artesanales.....	38
Figura 5. Localización espacial del proyecto, inicialmente el departamento Norte de Santander, luego el municipio de Pamplona, y posteriormente se ubica el área de estudio.....	40
Figura 6. Preparación y trasplante.....	41
Figura 7. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN1).	44
Figura 8. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN2).	45
Figura 9. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN3).	46
Figura 10. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN4).....	47
Figura 11. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TC).....	48
Figura 12. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (FS1)	49
Figura 13. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (FS2)	49
Figura 14. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (FS3)	50
Figura 15. Competencia por espacio y nutriente de las cepas TN1, TN2, TN3, TN4 Y TC vs FS1. 53	
Figura 16. Competencia por espacio y nutriente de las cepas TN1, TN2, TN3, TN4 Y TC vs FS2. 54	
Figura 17. Competencia por espacio y nutriente de las cepas TN1, TN2, TN3, TN4 Y TC vs FS3. 55	
Figura 18. Crecimiento del antagonista TN1 frente a FS3 y FS2, día 14.....	56
Figura 19. Porcentaje de incidencia en las hojas.....	59

Listado de apéndice

	P.
Apéndice A. Pruebas bioquímicas de los hongos.....	71
Apéndice B. Pruebas bioquímicas en tubo, resultado positivo evidencia color morado.....	71
Apéndice C. Prueba tras 10 días de incubación a 25°C	72
Apéndice D Tabla de ANOVAS; Patógeno FS1 frente a los Antagonistas de <i>Trichoderma Spp.</i> , TN1, TN2, TN3, TN4, y TC	72
Apéndice E Tabla de ANOVAS; Patógeno FS2 frente a los Antagonistas de <i>Trichoderma Spp.</i> , TN1, TN2, TN3, TN4, y TC	72
Apéndice F Tabla de ANOVAS; Patógeno FS3 frente a los Antagonistas de <i>Trichoderma Spp.</i> , TN1, TN2, TN3, TN4, y TC	73
Apéndice G. Actividad de Campo, preparación del terreno.....	73
Apéndice H. Apéndice H. <i>L. sativa L. var. Capitata L</i> , Lista para ser comercializada	73

Resumen

Trichoderma spp., es un hongo antagonista usado ampliamente en la agricultura, por su versatilidad en el empleo de sustratos en la producción artesanal, uso en numerosos cultivos, lo que convierte en una medida de control biológico poco usada en la región, con beneficios en la Fitosanidad y productividad de los cultivos estudiados. En los predios de la Normal Superior de Pamplona se realizó el estudio de este antagonista en el cultivo de lechuga en la variedad de *Capitata L.*, encontrándose una enfermedad en particular conocida como *Fusarium spp.*, que tienen un posible patio de infección sobre los cultivos de lechuga. Por esta razón este estudio se enfocó en la obtención de una cepa cepa nativa de *Trichoderma spp.* con potencial biocontrolador para su uso en un cultivo de lechuga (*Lactuca sativa L.*), para ello se hizo un análisis comparativo con una cepa comercial de *Trichoderma spp.*. Las pruebas *in vitro* se realizaron en cultivos duales, comparando la capacidad antagónica de cuatro cepas (TN1, TN2, TN3, TN4) autóctonas aisladas del suelo en un cultivo de lechuga del Colegio Normal Superior Pamplona), y de la cepa comercial (TC), frente a tres cepas de *Fusarium spp.*, (*FS1, FS2, F3*) Todas las cepas evaluadas *in vitro* mostraron inhibición en el crecimiento radial del fitopatógeno, se encontraron diferencias significativas entre los antagonistas, la cepa que mostro un mayor crecimiento frente a las demás fue la TN4. En cuanto a la acción micoparasítica solo las cepas TN4 y TC presentaron ¼ de la invasión total característica que hace referencia a la escala en grado 2. Para evaluar la capacidad protectora en campo abierto en el cultivo de lechuga, se seleccionó la cepa TN4 quien fue la que presento un crecimiento mayor para ser comparada con la cepa comercial (TC), para esta fase se empleó un Diseño en Bloques Completamente al Azar, con 8 tratamientos y 3 repeticiones. De los resultados obtenidos, se puede concluir que la cepa nativa TN4, mostró una eficacia comparable a la observada para la cepa comercial, en el cultivo se ve reflejado en el rendimiento en las plantas donde se aplicó los tratamientos con *Trichoderma spp.*, dándole bases al productor del beneficio de emplear esta clase de organismos biológicos en un cultivo.

Palabras claves: cepa, autóctono, biocontrolador, Trichoderma, enfermedades fúngicas.

Asbtrac

Trichoderma spp., Is an antagonist fungus widely used in agriculture, due to its versatility in the use of substrates in artisanal production, use in numerous crops, which makes it a little used biological control measure in the region, with benefits in Phytosanitary and productivity of the studied crops.

In the estates of the Normal Superior of Pamplona, a study of this antagonist was carried out in the cultivation of lettuce in the variety of Capitata L., finding a particular disease known as *Fusarium spp.*, Which have a possible infection yard on the crops of lettuce. For this reason, this study focused on obtaining a native strain of *Trichoderma spp.* with potential biocontroller for its use in a lettuce crop (*Lactuca sativa L .*), for this a comparative analysis was made with a commercial strain of *Trichoderma spp .* The in vitro tests were carried out in dual cultures, comparing the antagonistic capacity of four native strains (TN1, TN2, TN3, TN4) isolated from the soil in a lettuce crop from the Colegio Normal Superior Pamplona), and from the commercial strain (TC), against three strains of *Fusarium spp.*, (FS1, FS2, F3) All the strains evaluated in vitro showed inhibition in the radial growth of the phytopathogen, significant differences were found between the antagonists, the strain that showed the highest growth compared to the others was TN4. Regarding the mycoparasitic action, only the TN4 and TC strains presented ¼ of the characteristic total invasion that refers to the grade 2 scale. To evaluate the protective capacity in the open field in the lettuce crop, the TN4 strain was selected, which was the one that presented the highest growth to be compared with the commercial strain (TC), for this phase a Completely Random Block Design was used. , with 8 treatments and 3 repetitions. From the results obtained, it can be concluded that the native strain TN4, showed an efficacy comparable to that observed for the commercial strain, in the cultivation it is reflected in the yield in the plants where the treatments with *Trichoderma spp.* Were applied, giving it bases to the producer of the benefit of using this class of biological organisms in a crop.

Keywords: *strain, autochthonous, biocontrol, Trichoderma, fungal diseases*

Introducción

La producción de lechuga en los últimos años ha aumentado tanto a nivel mundial como nacional, debido a sus características nutricionales y organolépticas. Buscando el desarrollo económico, los agricultores han buscado soluciones rápidas, utilizando una gran cantidad de productos químicos como lo son los fungicidas e insecticidas. No obstante, esta medida no ha sido tan eficaz bajo ciertas condiciones, a lo anterior le sumamos la excesiva contaminación e impacto ambiental (Zhou *et al.*, 2015); además, este cultivo requiere grandes cantidades de recursos: como una cantidad considerable de agua para el establecimiento de las plantaciones, un suelo preferiblemente ligero, arenoso-limosos con un buen drenaje, donde su pH óptimo este entre los 6,7 y 7,4, y se requiere también de láminas de polietileno negro o transparente durante los días de invierno.

Desafortunadamente el hombre, con el fin de proteger los cultivos de lechuga al efecto pernicioso de múltiples organismos vivos (insectos, hongos, nemátodos, etc.) y aumentar la producción viene utilizando desde hace décadas productos fitosanitarios. Que una vez aplicados, son absorbidos por las plantas sufriendo procesos de volatilización, lavado y degradación biótica y abiótica en el suelo que conducen a la formación de nuevos productos, más móviles, persistentes y más peligrosos que los compuestos de partida. Es por esto que a través del control biológico se ha logrado reducir el uso indiscriminado de agroquímicos como medio de supresión y erradicación de enfermedades, haciendo necesario la incorporación de tratamientos biológicos que sean rentables y respetuosos con el medio ambiente (Porta *et al.*, 2003).

Las enfermedades que suelen afectar a la lechuga van desde las podredumbres blandas y fétidas causada por bacterias, podredumbres polvorientas causadas por mohos y nódulos por nematodos. Cada una de ellas desarrolla una fisiopatía diferente, que van desde la formación de esclerocios, mildes vellosos y polvorientos, manchas anulares café o amarillas, que finalmente deterioran el

producto hasta su pérdida total, disminuyendo los rendimientos, la calidad en el campo y en el mercado. Así mismo se convierten en un foco de diseminación en el suelo y ambiente en el que se desarrollan, por tal motivo se buscan indagar estrategias que mitiguen su presencia en un cultivo de grandes extensiones y continua explotación agrícola, impacte de manera positiva en el medio ambiente, sus costos sean asequibles para los productores y que estos vean resultados contundentes en la aplicación de un controlador biológico como lo es el hongo *Trichoderma spp.*, Sin alterar las características propias del suelo, pero si otorgándole beneficios biológicos a este.

En control biológico se han realizado investigaciones aplicando la acción de hongos antagonistas, encontrándose diferentes especies de los géneros, y entre ellos el género *Trichoderma spp.*, que ha sido reconocido por sus habilidades como biocontrolador de bacterias y patógenos del suelo (Mishra *et al.*, 2014). Se ha observado en diferentes investigaciones que el control de enfermedades con especies de *Trichoderma spp.*, han reducido no solo la severidad sino que también induce la estimulación del crecimiento de las plantas (Cubillos *et al.*, 2009), conjuntamente presenta diferentes mecanismos de acción biocontroladora sobre hongos fitopatógenos compitiendo por espacio y nutrientes, micoparasitando y realizando antibiosis, lo cual tiene una acción directa sobre el hongo patógeno (Infante *et al.*, 2009). Por esto el propósito del presente estudio es evaluar el efecto protector de una cepa nativa de *Trichoderma spp.*, y una cepa comercial (*Trichoderma harzianum*) como agentes controladores de *Fusarium sp* en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.) en el municipio de Pamplona.

Capítulo I

Planteamiento del problema

Las enfermedades del suelo han acarreado diferentes daños en los cultivos de corto y largo ciclo, desaniman al productor, la inversión para lograr minimizarla es alta, se buscan alternativas a corto plazo y no medidas que realmente den solución a esta clase de fenómenos biológicos. Los agentes causales de estas enfermedades tienen la particularidad de permanecer por un buen número de años, lo que los convierte en enfermedades cíclicas y resistentes a las diversas moléculas químicas a las que se les enfrentan que a la final van a parar a las cuencas hídricas y suelos sin uso agrícola que ocasionan problema a largo plazo.

Los agricultores hacen uso de químicos para el control de plagas y para minimizar las pérdidas en los cultivos, la falta de comunicación genera que sean pocos los agricultores que de primera mano puedan probar e incluir en sus planes de manejo integrado de los controladores biológicos, ya que estos son muy reducidos en la región. La zona escogida dentro del presente trabajo es el municipio de Pamplona, caracterizado por su riqueza natural y producción de alimentos. Debido al clima, está anclado en una buena ubicación geográfica para la explotación de cultivos como la *Lactuca sativa* L.. Las condiciones climáticas de la zona (clima húmedo y temperaturas suaves (15-22°C)) favorecen la aparición de diversas enfermedades entre ellas *Fusarium spp.*, este hongo es causante de daños tales como marchitamiento vascular, podredumbre radicular, podredumbre del pie y del tallo, lesiones de las hojas y podredumbre del fruto, que afectan directamente al cultivo y pueden provocar grandes pérdidas para los agricultores.

El desconocimiento del uso de agentes biológicos, que minimicen el uso irracional de agroquímicos, como un medio de supresión y erradicación de enfermedades, hacen necesario el

empleo de la incorporación de medidas biológicas para el control de enfermedades y para ellas se tiene al antagonista *Trichoderma spp.*, un hongo del suelo, degradador de materia orgánica, de fácil reproducción en laboratorio y campo, usado como herramienta en el control de enfermedades fúngicas del suelo.

Justificación

La presencia de enfermedades fúngicas en los cultivos de lechuga en el municipio de Pamplona, hacen notar que no se toman las medidas adecuadas para su eliminación, o simplemente buscan medidas a corto plazo que limiten el crecimiento de estos patógenos. En la mayoría de estos cultivos el uso indiscriminado de fungicidas ha causado no solo un daño en los cultivos, sino que también al medio ambiente, al suelo y lo más relevante es que se ha relacionado con enfermedades en la población consumidora.

Con este trabajo se busca implementar técnicas de control biológico sobre el cultivo que contribuye al control eficaz de las plagas y a incrementar los estándares de calidad, en un mercado cada vez más exigente y competitivo, y a su vez ayudar al medio ambiente a no usar agroquímicos, para poder llevar un monitoreo de plagas y proteger la lechuga (*Lactuca sativa L.*) ya que el control biológico en la región es reducido. Para el control de enfermedades se tiene al antagonista *Trichoderma spp.*, un hongo del suelo, degradador de materia orgánica, de fácil reproducción en laboratorio y campo, usado como herramienta en el control de enfermedades fúngicas del suelo, que no solo benefician a los cultivos, sino que también ayuden al medio ambiente y a la economía del pequeño y mediano productor, quienes en su producción se ven afectados por la presencia de enfermedades que originan daños en las hojas, tallo y raíz, hasta conducir a la muerte de la planta. Se espera que los resultados sirvan para cimentar una nueva alternativa de control limpio a los pequeños agricultores, que tengan acceso fácil a ello, y lo mantengan como alternativa para ser empleado en sus próximos cultivos y así disminuir la dependencia a los fungicidas químicos, los cuales desequilibran la composición microbiológica del suelo, ya que finalmente es el encargado de transformar los elementos en forma asimilable por parte de la planta. Esto se evidenciará en una

producción rentable, segura, limpia, con matices agroecológicos para el consumidor y el medio ambiente.

Objetivos

Objetivo General

- Evaluar el efecto protector de diferentes cepas nativas de *Trichoderma spp.*, y una cepa comercial (*Trichoderma harzianum*) como agentes controladores de enfermedades fúngicas de la lechuga *Lactuca sativa* L., en el municipio de Pamplona.

Objetivos Específicos

- Determinar la eficiencia de los controladores biológicos *Trichoderma spp.* (local) y *Trichoderma harzianum* (comercial) a campo abierto contra *Fusarium spp.*
- Verificar el efecto antagónico "in vitro" de *Trichoderma spp.* y una cepa comercial (*Trichoderma harzianum*) contra *Fusarium spp.* que afecta el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L).

Capítulo II

Marco Referencial

La investigación sobre las especies de *Trichoderma* alrededor del mundo es muy enriquecedora, pues aporta información no solo del microorganismo, sino de las características de los entornos que favorecen su presencia, las técnicas empleadas para su estudio e identificación, y su comportamiento al ser ensayado para aplicaciones en los campos de la exploración agrícola se han generado aportes fundamentales para reconocer al microorganismo como lo es hoy en día, especialmente por su efecto antagónico ante un amplio espectro de patógenos.

Antecedentes Internacionales

Guédez *et al.* (2009) “**Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* Rifai., sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria spp.*)**”, Venezuela. Se desarrolló al comparar el crecimiento del biocontrolador con cada uno de los hongos patógenos, el análisis de varianza indicó que el crecimiento de *T. harzianum.*, difirió significativamente ($p < 0,01$) del crecimiento de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb., *Mucor spp.*, *Penicillium digitatum* Pers., *Rhizoctonia solani* Kunh., *Aspergillus niger* Tiegh y *Pythium spp.* Con respecto al control que ejerce *T. harzianum.*, sobre los hongos no hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0,01$), porque el crecimiento de este hongo fue similar en todas las placas de Petri, en este estudio pudieron concluir que debido a la rapidez del crecimiento de *T. harzianum.*, se pudo reducir el crecimiento de *R. stolonifer.*, *Mucor spp.*, *P. digitatum.*, *R. solani.*, *A. niger.*, y *Pythium spp.* En fresa, este hongo se considera un controlador biológico efectivo en enfermedades postcosecha, aplicándose también antes de la cosecha para disminuir pérdidas durante el transporte y su estadía en las fruterías.

Así mismo, Pavone (2012), realiza la investigación “**Biocontrol de *Rhizoctonia solani* kuhn por *Trichoderma spp.*”** en su tesis doctoral. Donde evaluó la capacidad biocontroladora en cultivos duales en medio sólido, líquido, crecimiento en suelo y vivero. Encontrando gran variabilidad de cepas evidenciando, cuál de las cepas tuvo mayor capacidad de biocontrol, las cepas TV21 (*T. hazianum*), TV118 (*T. virens*) y TV190 (*T. asperellum*), con concordancia entre los resultados *in vitro* y vivero fueron las más eficientes.

Prosiguiendo encontramos el trabajo de Quinatoa (2015). Titulado, “**Evaluación del control de *Botrytis (Botrytis cinérea pers.)* en el cultivo de mora (*Rubus glaucus Benth*) mediante el uso de *Trichoderma* y emas en la comunidad de Misquillí de la parroquia Santa Rosa, provincia de Tungurahua**”. Mostró que aplicando *Trichoderma* (Bio Fungo) (P1), se obtuvieron los mejores resultados, por cuanto los tratamientos que lo recibieron, reportaron los más bajos porcentajes de incidencia y severidad del ataque de *Botrytis*, al observarse el menor porcentaje de incidencia en infrutescencias a los 60 días (5,11%), menor porcentaje de severidad en infrutescencias a los 60 días (4,75%) y a los 90 días (3,33%), por lo que se alcanzaron los mejores rendimientos (5,25t/ha).

Desde la misma perspectiva, López (2018) en su investigación “**Producción y formulación de *Trichoderma asperellum* para el manejo de patógenos de la raíz de caña de azúcar**” para optar el título de Maestro en Manejo de Recursos Naturales, tuvo como objetivo general evaluar la producción de conidios de *T. asperellum* en dos sustratos naturales y proponer una formulación para su aplicación en campo. Se evaluaron los sustratos de granos de arroz y sorgo con diferente contenido de humedad con tiempos variados de esterilización, bajo un diseño completamente al azar con 16 tratamientos, un testigo y cuatro repeticiones para cada sustrato. Las variables respuesta fueron: la producción de conidios y la cantidad de biomasa (mezcla de residuos del sustrato y conidios). Asimismo, se determinó la cantidad óptima de inóculo de *T. asperellum* para la producción masiva de conidios en sustrato de arroz. Y encontraron los siguientes resultados: La

mayor producción de conidios (9.34×10^8 conidios/g) se presentó en el sustrato de arroz con un contenido de humedad de 28.58% esterilizado durante 15 minutos y la mayor cantidad de biomasa se obtuvo con el sustrato con un contenido de humedad del 29.44% y fue esterilizado durante 15 minutos ($P \leq 0.05$, Tukey). En el sustrato de sorgo se registró la mayor producción de conidios/g (1.49×10^8) cuando presentó una humedad de 20.87% y fue esterilizado por 15 minutos ($P < 0.05$); sin embargo, el análisis de varianza para la cantidad de biomasa no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, presentando menos de 0.56 g.

Siguiendo en la búsqueda, Astorga *et al.* (2014). “**Evaluaron antagonismo de *Trichoderma spp.* y *Bacillus subtilis* contra tres patógenos del ajo**”, y determinaron su actividad antagónica y efecto inhibitorio utilizando el crecimiento en platos duales. La cepa de *B. subtilis* mostró un potencial con valores bajos de PICR: 14,087 ante *S. cepivorum* y 3,328 ante *Penicillium spp.*, por lo que se clasifica como un mal biocontrolador. Por su parte, *Trichoderma* presentó un potencial muy alto, con valores de PICR de 40,210 frente a *S. cepivorum* y de 45,034 ante *Penicillium spp.*, lo que indica que es un muy buen controlador.

En cuanto a producción artesanal de *Trichoderma spp.* Sivila y Álvarez (2013) realizaron la siguiente investigación “**Producción artesanal de *Trichoderma***” donde se mostró la metodología en la producción artesanal y Control de Calidad del hongo antagonista *Trichoderma spp.*, que fue tomada como referente.

Antecedentes Nacionales y Locales

Con el fin de observar algunos avances sobre agricultura sostenible, basada en control biológico de *Trichoderma spp.*, se encontró que existe un interés amplio en el cual se puede referenciar, el trabajo de Parra (2018), titulado “**Evaluación del antagonista *Trichoderma spp.*, contra**

enfermedades radiculares de *Lactuca sativa* L. var. Inybasea (Hort) y Capitata L., en el municipio de Pamplona”. Donde se sugiere el empleo del antagonista *Trichoderma spp.*, el cual posee cualidades de competencia por nutrientes y espacio, producción de metabolitos, hiperparasitismo, resistencia inducida, que al ser evaluados *in vitro* frente a los patógenos, *Sclerotinia sclerotiorum* Libert de Bary., *Fusarium oxysporum*, Schldl. *Fusarium moniliforme* Sheld., obteniéndose resultados altamente favorables que corroboran estas características; a nivel de campo el efecto bioestimulante sobre la planta se ve reflejado en el rendimiento en las plantas donde se aplicaron los tratamientos con *Trichoderma spp.*, dándole bases al productor del beneficio de emplear esta clase de organismos biológicos en un cultivo.

Checa, y otros (2016) de la Universidad de Nariño realizó la publicación “**Antagonismo de cepas de *Trichoderma spp.* contra la marchitez del guisante (*Pisum stivum* L.) causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. pisi.**” estableciendo el efecto antagónico de 12 cepas entre las que se encuentran *T. harzianum*, *T. asperellum* y *T. longibrachiatum* *in vitro*, en invernadero y campo en cultivos de arveja ubicados en los municipios de Pupiales, Ipiales y Gualmatan.

Siguiendo en la búsqueda en los avances en cuanto al uso de *Trichoderma spp.*, se encontró la investigación realizada por Chávez (2006), el trabajo titulado “**Producción de *Trichoderma spp.*, y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dentranthema grandiflora*)**”, donde se evaluó la capacidad antagónica de dos cepas de *Trichoderma spp.*, en el control *in vitro* de los hongo patógenos de plantas *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia spp.*, y *Fusarium spp.* Y resalta que los resultados obtenidos de este hongo antagonista, además de tener un efecto protector y preventivo contra hongos fitopatógeno, también se evidencia un incremento en el crecimiento y peso de planta, convirtiéndose en una alternativa viable para el tratamiento de cultivos ornamentales,

Desde la misma perspectiva Eraso *et al.*, (2014) evaluaron “**Cepas de *Trichoderma spp.* para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*”**”, donde apreciaron el crecimiento micelial y halo de inhibición en siembras duales, que sirvieron como criterio de selección para pruebas en invernadero, donde se evaluaron la altura de planta, longitud de raíces, materia seca de raíces y porcentaje de incidencia. En campo usaron un diseño de bloques al azar, para evaluar componentes de rendimiento, altura de la planta y longitud de raíz con las mejores cepas. En laboratorio, se seleccionaron C2 (Córdoba 2), C7 (Gualmatán 3), C14 (Puerres 2), C20 (Potosí 4) y C21 (Lab. Perkins) por presentar mejor actividad antagonística; en invernadero, C7, C14 y C21 fueron las cepas más antagonísticas; en campo, se obtuvieron diferencias significativas entre C14 y C21, respecto a C7 y el testigo. Las cepas C14 y C21 tienen capacidad antagónica consistente y pueden usarse en el manejo del hongo *F. oxysporum* en arveja.

Avanzando en el tema encontramos el trabajo de Cubillos, Valero, y Mejía, (2009) titulado “***Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener)**”, donde tenían como objetivo comprobar la potencialidad de la cepa nativa TCN-014, frente a la cepa comercial TCC-005 de *T. harzianum*, como inoculante biopromotor del crecimiento del maracuyá, mediante la evaluación de su efecto sobre la germinación y el desarrollo temprano de las plantas, con el propósito de aportar una estrategia para el manejo integrado del cultivo, mediante la elaboración, evaluación y aplicación de bioproductos con un efecto multifuncional ocasionado por la actividad biocontroladora de patógenos, sumada a la actividad fitoestimuladora y biofertilizante. Encontrando los tratamientos TCN-014 106 TCC-005 108, y TCN-014 108, en su orden, presentaron mayores efectos sobre la longitud del tallo (LT) con diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$), con respecto al control. Todos los tratamientos, excepto TCC-005 104, presentaron efecto positivo significativo sobre el grosor del tallo en la base (GTB), siendo TCN-014 106 el tratamiento con mejor efecto. Todos los tratamientos ocasionaron un efecto superior significativo sobre el número de hojas verdaderas (NHV) con respecto al control,

siendo TCN-014 108 el tratamiento con mayor efecto, el número de hojas osciló entre 7-8 por plántula tratada y de 5 por plántula no tratada. Todos los tratamientos mostraron efecto positivo sobre la longitud de la raíz (LR), con mejores resultados para las plantas tratadas con TCN-014 108, TCC-005 108 y TCN-014 106, con incrementos de 89%, 73% y 63%, respectivamente, en comparación con el tratamiento testigo. Los tratamientos TCN-014 108, TCN-014 106 y TCC-005 106 y TCC-005 108 presentaron resultados significativamente superiores sobre el peso seco total (PST), con incremento de 210%, 125%, 125% y 117%, respectivamente, con respecto al control.

Marco Teórico

Lactuca sativa L.

lechuga (*Lactuca sativa L.*) es una hortaliza de gran importancia dentro del mercado nacional e internacional, la duración del cultivo suele ser de 50-60 para variaciones tempranas y de 70-80 días para las tardías. Sus hojas al comienzo de su desarrollo adoptan la forma de roseta, para formarse más tarde y formar un cogollo, las hojas son lampiñas, ligeramente dentadas y de formas variadas, las hojas pueden ser mantecosas o crujientes, con aspecto ondulado, liso o rizado (Eroski, 2009).

Dentro de las características físico-químicas de la lechuga esta la importancia de vitaminas y minerales; es rica en calcio, hierro y vitamina A, el pH se encuentra entre 5,76 – 6,35 (Avila, 2015).

- Variedades

- **Lechuga de cabeza, arrepollada o Crisp Head (*L. sativa var. Capitata (L)*):** Presenta cabeza cerrada, en el interior se forma un cogollo apretado y firme, mientras que, en el exterior, sus hojas son abiertas, gruesas, crujientes y su funcionalidad es proteger el cogollo (Avila, 2015).

- **Lechuga mantequilla, Butter Head o lechuga lisa (*L. sativa* var. *Capitata*(L):** Presenta cabeza cerrada o semiabierta, su interior no es apretado, sus hojas son verdes-amarillas, muy lisas, con texturas suaves y un poco aceitosa (Avila, 2015).
- **Lechuga cos o romanas (*L. sativa* var. *Longifolia* (L):** Sus hojas son alargadas, con nervio central ancho y bordes enteros, forman un cogollo ligeramente apretado, color verde oscuro (Avila, 2015).
- Lechuga sin cabeza, de hojas sueltas (*L. Sativa* var. *Intybacea* (L): Sus hojas son sueltas, de textura suave, pueden ser crespas o lisas; su color varía entre verde claro a verde oscuro y de rojo a morado en diferentes tonalidades (Avila, 2015).

- *Suelos*

La lechuga prospera en suelos de naturaleza física variada con tal de presentar una estructura estable, que permita una buena retención de agua en la superficie para garantizar su alimentación hídrica sin altibajos(Eroski, 2009). En general todos los suelos son adecuados para el cultivo de lechuga dada su alta adaptabilidad a suelos desde arenosos hasta arcillosos, que presenten un alto contenido de materia orgánica. La lechuga es tolerante a pH ácidos y es medianamente tolerante a la salinidad (Avila, 2015).

- *Clima*

Es un cultivo principalmente de zonas altas, donde su mejor desarrollo y calidad lo obtiene por encima de los 1,100 msnm. con una temperatura media alrededor de los 18°C. Es bastante tolerante a las bajas temperaturas, pero a altas temperaturas su calidad desmejora y la vida de anaquel se limita bastante. Para un desarrollo normal de la planta, es necesario que las temperaturas durante la fase de crecimiento permanezcan entre 20 y 24o C. Para poder iniciar la fase de inducción floral necesita entre 10 y 15° C durante varias horas del día (Eda, 2009).

- ***Humedad relativa***

El sistema radicular de la lechuga es muy reducido en comparación con la parte aérea, porque es muy sensible a la falta de humedad y solo soporta un periodo de sequía, aunque este sea muy breve. La humedad relativa conveniente para la lechuga es de 60 al 80%, la alta humedad puede llegar a favorecer varias enfermedades y generar problemas en el cultivo de lechuga (Alzate.J. y Loaiza.L., 2008).

- ***Trasplante***

El trasplante es el paso de las plántulas del semillero al sitio definitivo. Las plántulas se llevan a campo cuando hayan adquirido determinado desarrollo. Como norma general se puede tomar el número de hojas, tres a cuatro bien formadas; es decir, cuando la plántula tenga entre ocho y diez, lo cual generalmente se alcanza 25 a 30 días después de la germinación (Jaramillo et al., 2016).

- ***Distancias de siembra***

La distancia entre plantas es variable y depende de diversos factores: arquitectura de la planta, variedad o híbridos empleados, pendiente del terreno, condiciones físicas y de fertilidad del suelo, humedad relativa y luminosidad, entre otros. Igualmente varía de acuerdo con las exigencias del mercado en cuanto al tamaño y peso de las cabezas o pellas. En la elección del espaciamiento se debe tener en cuenta también que a menores distancias cada cabeza tendrá menor peso, pero se obtendrá mayor número y por lo tanto mayor rendimiento por hectárea. En general, a mayor distancia de siembra, mayor peso y tamaño de las cabezas. El marco de plantación depende de la envergadura que alcance la variedad; en el caso de variedades de tamaño pequeño se pueden plantar hasta 18 plantas por metro cuadrado, sembrando en eras o en llano total a distancias de 25 cm por 25 cm o en caballón a una distancia de 50 cm entre caballones y dos hileras por planta por caballón, separadas 25 cm entre sí (Jaramillo et al., 2016). La siembra en caballón se recomienda cuando

existen riesgos de exceso de humedad en el suelo, para evitar pudriciones del cuello de la planta o el ataque del moho blanco *Sclerotinia sclerotiorum* Libert de Bary., la distancia de siembra más utilizada en la producción de lechuga Batavia o de cabeza es de 35 a 40 cm entre plantas y 40 cm entre surcos. A una distancia de siembra de 40 cm por 40 cm se tiene una población de 56.100 plantas por hectárea (Semillas arroyave, 2004). Para lechugas tipo mantequilla y romana, las distancias son de 30 cm por 30 cm. Para las lechugas foliares se utilizan distancias de siembra entre 20 y 30 cm entre plantas y de 20 a 30 cm entre surcos. La lechuga es un cultivo de ciclo muy corto, así que una heterogeneidad en el desarrollo de las plantas por déficit de riego al inicio del cultivo será difícil de corregir más adelante. Al inicio las plántulas exploran solo un pequeño volumen de suelo; por esta razón, se requiere un sistema de riego con mucha uniformidad, buen cubrimiento y caudal adecuado. Es recomendable que los riegos se hagan en la mañana, de manera que el follaje se pueda secar rápido y permanezca así el resto del día y la noche para prevenir problemas Fúngicos (Cooman, 2000).

- ***Fertilización de la lechuga***

La necesidad de fertilizantes en el cultivo depende de la disponibilidad de nutrientes del suelo, del contenido de materia orgánica, de la humedad, la variedad, la producción y la calidad esperada del cultivo. Por esto, las aplicaciones de fertilizantes estarán sujetas al resultado del análisis químico del suelo, análisis foliares y observaciones de campo. Una fertilización eficiente es la que, con base en los requerimientos nutricionales de la planta y el estado nutricional del suelo, proporciona los nutrientes en las cantidades suficientes y épocas precisas para el cultivo (Jaramillo et al., 2016). Un adecuado plan de nutrición se debe ajustar a los requerimientos del cultivar, condiciones de fertilidad, disponibilidad de los elementos en el suelo, sustrato de crecimiento, intensidad en el manejo del cultivo en términos de densidad de siembra, control de variables climáticas, especialmente luz, temperatura y precipitación, y expectativas de rendimiento por planta o por unidad productiva (Vallejo, 2004). La lechuga es una planta exigente en potasio; sin embargo, un

exceso de este puede inducir una mayor absorción de magnesio, con el consiguiente desequilibrio carencial de este elemento. También es exigente en molibdeno, por lo cual es conveniente dar un tratamiento foliar con molibdato de amonio, siete a diez días después del trasplante; así mismo es conveniente realizar una aspersión en el semillero unos dos o tres días antes del trasplante (Serrano, 2014).

- ***Plagas del suelo***

Nematodos (*Meloidogyne sp*): Son animales muy pequeños en forma de gusanos microscópicos, causan heridas y daños en las raíces como nódulos, pudriciones, agallas, reducción de raicillas, que son puerta de entrada a hongos como los que producen la secadera (Avila, 2015).

Chizas (*Ancognata scarabaelodes*): Las larvas se conocen como Mojojoy y se alimentan de raíces, ocasionando daño en las plantas al interferir con la toma de nutrientes por las heridas ocasionadas.

Las heridas a su vez permiten el ingreso de hongos patógenos que afectan la producción y pueden causar la muerte de la planta; los adultos normalmente se conocen como ronrón de mayo. En época de llenado de vainas se reducen drásticamente los rendimientos (Avila, 2015).

Gusano Alambre (*Agrotis lineatus*): La hembra (que es un escarabajo) deposita los huevos en el suelo cerca de la raíz, emergiendo larvas de color café amarillento; éstas se alimentan de las raíces debilitando la planta hasta ocasionarle la muerte. En las plántulas recién trasplantadas, la mortalidad por esta plaga es mayor (Avila, 2015).

Babosas (*Milax gagates*) Descripción: En el día se esconden debajo de residuos de material vegetal, piedras o terrones. Las babosas se desarrollan en el suelo prefiriendo las condiciones húmedas; atacan el follaje tierno (Avila, 2015).

- ***Enfermedades de la lechuga***

Mildeo Velloso *Bremia lactucae* Regel, bot. Ztg

Mancha de la hoja de la lechuga, *Septoriosis*, *Septoria lactucae* Peck

Cercosporiosis, *Cercospora longissima* Cooke y Ellis

Pudrición blanda, moho blanco, *Sclerotinia sclerotiorum* Libert. de Bary.,

Sclerotinia minor Jagger.

Moho gris, pudrición basal *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.

Marchitez vascular, *Fusarium spp* (*Fusarium oxysporum f. sp. lactucae* (Sacc.)

Snyder & Hans.

Antracnosis de la lechuga *Marssonina panattoniana*. (Berl.) Magnus

- **Marchitez vascular, *Fusarium spp* (*Fusarium oxysporum f. sp. lactucae* (Sacc.) Snyder & Hans.**

La marchitez vascular es causada por el hongo *Fusarium oxysporum* Schltdl., es un hongo que pertenece al reino: Fungi, División: Deuteromycota, Clase: Sordariomycetes, orden: Hypocreales, pertenece a la orden de los Moniliales (Hifomicéталos) y a la familia de Tuberculariáceas (López Moreta, 2017). Son hongos con el micelio dividido en compartimentos cuya reproducción sexual se desconoce. La multiplicación asexual hace intervenir las esporas llamadas conidios producidas por brote de micelios especializados, conidióforos. Estos conidióforos son cortos, simples, asociados en un cojinete (Cámara de Comercio, 2015). Los síntomas más característicos son el amarillamiento y detenimiento del crecimiento de la planta. Las plántulas del semillero afectadas se marchitan y mueren. Los tejidos vasculares de las raíces, coronas y peciolo se decoloran y toman un aspecto pardo rojizo. Es típico el sabor amargo de las plantas. La enfermedad es más destructiva durante los periodos calientes. El hongo se establece en el suelo y subsiste en forma de

clamidospora. La penetración se realiza principalmente a través de las raíces jóvenes (Agrosiembra, 2018).

Pruebas de identificación para hongos

- Observación microscópica

• Técnica de adhesión a cinta

Esta técnica es una de las más usadas, debido a que se conserva la yuxtaposición original de las esporas y segmentos de hifas (Koneman, 1987). Además de permitir observar las estructuras fúngicas casi sin alteración (Arenas, 1993). Para su realización, se toma una tira de cinta de 4cm, con el lado adhesivo hacia afuera, sosteniéndose con pinzas y presionando firmemente contra la superficie de la colonia del hongo que se desea estudiar. Posteriormente, la tira de cinta se coloca en un portaobjetos con una gota de azul de lactofenol.

• Método de microcultivo

Según Arenas (1993), este método es el más preciso y permite observar las estructuras fúngicas in situ. Para su realización se tomó una cama de Petri con un caballete de vidrio en U, se deposita 5 mL de agua estéril en la caja que evitará la desecación posterior; se coloca un portaobjetos sobre el caballete y con una pipeta estéril se pone una capa de agar en la superficie de lámina, se siembra en el centro un fragmento del cultivo y se coloca una laminilla estéril sobre éste para después incubar a la temperatura seleccionada. Se retira la laminilla y se coloca sobre una gota de azul de lactofenol observando al microscopio en aumento de 40X (Casas, 1989; Arenas, 2003).

- **Pruebas bioquímicas**

Las pruebas bioquímicas permiten determinar las características metabólicas de las bacterias u hongos objeto de identificación. Algunas de estas pruebas son técnicas rápidas, ya que evalúan la presencia de una enzima preformada y su lectura varía entre unos segundos hasta unas pocas horas. Otras pruebas requieren para su lectura el crecimiento del microorganismo con una incubación previa de 18 a 48h; a este grupo pertenecen la mayoría de las pruebas que detectan componentes metabólicos o aquellas que determinan la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia dada tras cultivo en medios de identificación que contienen el sustrato a metabolizar. No obstante, algunas de estas pruebas pueden realizarse de forma rápida tras incubación de unas 2-6h; en general, se trata de reacciones enzimáticas cromogénicas o pruebas convencionales modificadas (Murray, 2003).

- ***Pruebas de identificación preliminar y con lectura inmediata***

- **Catalasa**

La catalasa es un enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas (Murray, 2003).

- **Oxidasa**

Sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo el

cual es reducido por el oxígeno molecular produciéndose agua o peróxido de hidrógeno según la especie. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa solo se encuentra en las bacterias aerobias, algunas anaerobias facultativas y, excepcionalmente, en alguna microaerofila (*Vibrio fetus*), pero las bacterias anaerobias estrictas carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que esta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica (Murray, 2003).

- **Fermentación de azúcares**

En esta se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira a color amarillo en medio ácido. Los resultados de la prueba deben ser leídos luego de 18 a 24 horas de incubación. Si la lectura se efectúa a tiempos menores pueden existir falsos positivos por la presencia de acidez o la acidez generada no sea suficiente para producir el viraje del indicador rojo de fenol del color rojo al amarillo. Si se lee luego de 24 horas se pueden obtener resultados negativos por consumo de peptonas durante el crecimiento de los microorganismos con la consecuente alcalinidad del medio de cultivo (MacFaddin, 1985).

- ***Actividad Enzimática***

En general, la biorremediación requiere el uso de microorganismos junto con sus enzimas para poder realizar la degradación y/o transformación de los contaminantes presentes en el medio (suelo o agua), convirtiéndose en una forma menos tóxica para el medio ambiente, además, un método menos costoso, seguro y efectivo (Sharma et al., 2018). Las principales enzimas presentes en cualquier proceso de biorremediación en general son oxidorreductasas

e hidrolasas (Kadri et al., 2016). En la tabla 1 describen los principales grupos de enzimas basados en la capacidad de biodegradación y su aplicación en tecnologías de biorremediación.

Tabla 1. Grupos Enzimáticos

Tipos de enzimas	Ejemplos	Descripción	Referencias
Oxidoreductasa	Deshidrogenasa	Desempeñan un papel importante en la oxidación biológica de la materia orgánica del suelo transfiriendo hidrógeno de sustratos orgánicos a aceptadores inorgánicos.	(Wasilkowski, Swędzioł, y Mrozik, 2012)
	Catalasa	Enzima antioxidante encargada de catalizar el H ₂ O ₂ en agua y oxígeno.	(Panahi et al., 2019)
	Oxigenasa	Desempeñan un papel clave en las rutas de biodegradación aeróbica de compuestos aromáticos como bifenilos clorados, olefinas alifáticas aromáticos	(Musumeci et al., 2019a)
Hidrolasas	Deshalogenasa	Son reductivas y su principal objetivo es degradar alifáticos halogenados simples hasta los compuestos aromáticos policíclicos más complejos, como las dioxinas halogenadas.	(Jugder et al., 2015)
	Celulasa	Enzima con gran importancia para degradar (Mehta, Bodh, y Gupta, 2017; la celulosa e hidrocarburos poliaromáticos.	Yang et al., 2016)

	Lipasa	Pueden catalizar muchas reacciones diferentes, como la hidrólisis o síntesis de ésteres, esterificaciones, aminaciones, transesterificaciones, alcoholisis, etc.	(Saraiva, Bandeira, y Pessoa, 2018)
--	--------	--	-------------------------------------

Fuente: Adaptado de Rojas, (2018).

- *Organismos antagónicos*

El control de los fitopatógenos se puede lograr biológicamente en forma total o parcial, mediante el uso de organismos biocontroladores antagónicos (que reducen la cantidad de inóculo, causan inhibición o lisis, es decir, muerte), y por lo general ocurre en la naturaleza. La acción de los organismos antagónicos se puede realizar a través de fenómenos como el hiperparasitismo, la protección cruzada e interferencia, resistencia inducida, los suelos supresivos, las plantas antagónicas y las plantas trampa. Sin embargo, se debe aclarar que los resultados exitosos de los biocontroladores se han basado en pruebas in vitro interactuando el antagonista y el patógeno, sin tener en cuenta la planta y otros factores del patosistema. Recientemente se ha incrementado el uso de biofertilizantes (microorganismos enzimáticos benéficos) particularmente para las enfermedades con origen en el suelo. Los casos más conocidos de hiperparasitismo son el micoparasitismo, los bacteriófagos y los hongos nematófagos (predación). El micoparásito de *Trichoderma spp.*, particularmente la especie *T. harzianum Rifai.*, es la alternativa de control biológico más importante en las enfermedades del suelo (rizoplana); igualmente los géneros *Gliocladium sp.*, y *Paecilomyces sp.*, se han reportado como antagonistas. Entre las bacterias se tiene los géneros *Bacillus sp.*, y *Pseudomonas (P. fluorescens Migula.,(López, 2001)).*

- **Antagonista *Trichoderma spp.***

Trichoderma spp., es un tipo de hongo anaerobio facultativo que se encuentra de manera natural en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Según Alexopoulos et al., 1996 *Trichoderma spp* se encuentra clasificado como:

Reino: Fungi,

División: Mycota,

Subdivisión: Eumycota,

Clase: Hyphomycetes,

Orden: Moniliales,

Familia: Moniliaceae.

Género: *Trichoderma*

Especie: *harzianum*, *hamatum*, *viridae*, *longibranchiatum*, entre otras.

De este género existen más de 30 especies, todas con efectos benéficos para la agricultura y otras ramas. Este hongo se encuentra ampliamente distribuido en el mundo, y se presenta en diferentes zonas y hábitat. *Trichoderma spp.*, tiene diversas ventajas como agente de control biológico. Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permitan ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico. Lleva a cabo la toma de nutrientes de los hongos (a los cuales degrada) y de materiales orgánicos ayudando a su descomposición, por lo cual las incorporaciones de materia orgánica y compostaje lo favorecen; también requiere de humedad para poder germinar, su velocidad de crecimiento es bastante alta, por esto es capaz de establecerse en el suelo y controlar enfermedades. *Trichoderma spp.*,

probablemente sea el hongo beneficioso, más versátil y polifacético que abunda en los suelos capaces de aportar una inmensa gama de beneficios que demuestran su incalculable valor desde el punto de vista agrícola, beneficios que lo convierten en un microorganismo de imprescindible presencia en los suelos y cultivos (Ríos, 2014). Los antagonistas contribuyen a la atenuación de los daños que causan las enfermedades, en los agroecosistemas donde existan condiciones para su desarrollo y conservación. Para lograr este objetivo los microorganismos beneficiosos presentan diferentes modos de acción que les permitan ejercer su efecto biorregulador. Estos atributos, de conjunto con la capacidad de multiplicarse abundantemente, se encuentran entre los de mayor importancia para su selección como agentes de control biológico (Danay Infante*, B. Martínez*, 2009).

Baker y Cook (1974) definen el control biológico como “la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de enfermedad de un patógeno o parásito, en su estado activo o durmiente, mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del huésped o del antagonista, o por la introducción masiva de uno o más antagonistas. Por su parte, el agente biocontrolador se define como el microorganismo (hongo o bacteria) con capacidad de limitar o evitar de manera más o menos selectiva el crecimiento de un hongo patógeno, sin interferir en el crecimiento de la planta. *Trichoderma spp.*, están entre los más promisorios agentes de biocontrol por sus propiedades antagonicas frente a los hongos patogénicos de plantas, sobre todo porque ellos pueden estar en la rizosfera y colonizar y proteger las raíces de las plantas, como también colonizar flores, semillas y/o hojas reduciendo daños de enfermedades en un amplio rango de cultivos, *Trichoderma spp.*, puede afectar distintas estructuras de los hongos patógenos: conidios, esclerocios, hifas. Otra de las ventajas es la amplia gama de hongos patogénicos que puede controlar, entre los que se encuentran hongos de suelo que causan enfermedades radiculares y/o vasculares, y hongos que producen manchas foliares, mildius o tizones.

La utilización de algunos microorganismos como agentes de CB ha demostrado ser una alternativa para mantener una alta producción con un bajo impacto económico en diferentes sistemas agrícolas. La utilización de especies de *Trichoderma spp.*, en el CB de enfermedades de plantas se ha relacionado principalmente con sus habilidades antagonistas, observadas hace casi un siglo, frente a hongos y oomicetos fitopatógeno(Hermosa, 2017).

El género *Trichoderma* tiene cinco especies consideradas como antagonistas: *Trichoderma harzianum* Rifai., *Trichoderma koningii* Oudem., *Trichoderma longibrachiatum* Rifai., *Trichoderma pseudokoningii* Rifai., *Trichoderma viride* Pers., en general, los antagonistas no tienen un único modo de acción y la multiplicidad de éstos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico. Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción.

Las diferentes especies de *Trichoderma spp.*, ejercen mecanismos de control mediante: competencia directa (por espacio y nutrientes), producción de metabolitos antibióticos, la inactivación de enzimas del agente patógeno, modificación de las condiciones ambientales, producción de sustancias promotoras del crecimiento vegetal y por micoparasitismo. Se describen(Intagri, 2016).

- **Competencia**

La competencia por espacio y/o nutrientes ha sido considerada uno de los mecanismos clásicos de biocontrol de este género. Tiene una rápida tasa de desarrollo, lo que hace que sea un fuerte competidor por espacio a la hora de colonizar la rizósfera. Por otra parte, tiene una capacidad superior de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, siendo muy versátil para utilizar sustratos como fuente de carbono y nitrógeno, lo que permite colonizar un

medio rápidamente, evitando la proliferación de otros microorganismos en el mismo hábitat(Intagri, 2016).

- **Producción de metabolitos (Antibiosis)**

El género *Trichoderma* tiene la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles y no volátiles, que juegan un papel importante inhibiendo el crecimiento y desarrollo de microorganismos patógenos. En estas interacciones están involucradas enzimas líticas extracelulares, antibióticos y compuestos de bajo peso molecular(Intagri, 2016).

- **Micoparasitismo**

Es un proceso complejo en la interacción antagonista-patógeno, que ocurre en cuatro etapas: crecimiento quimiotrófico, reconocimiento, adhesión y enrollamiento, y la actividad lítica. La última etapa consiste en la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma*. Se ha encontrado que algunas especies de este hongo, especialmente *Trichoderma harzianum* tienen el potencial de aumentar el crecimiento y desarrollo de las plantas. Lo anterior puede explicarse por la inhibición de patógenos menores y a la producción de factores que estimulan el crecimiento de la planta y favorecen la toma de nutrientes(Intagri, 2016).

- **Método de aplicación**

En la práctica se deben tener en cuenta los aspectos que permitan la expresión de los mecanismos de control de la cepa y que están íntimamente ligadas con

un ambiente favorable (temperatura, humedad, presencia de oxígeno, pH), las condiciones del suelo (estructura, contenido de materia orgánica y nutrientes) y horario de aplicación. *Trichoderma* puede ser inoculado al sustrato para semilleros o directamente al suelo en semilleros a campo abierto. También el tratamiento a la semilla (inoculación), se emplea para el combate de hongos fitopatógenos, siendo un método muy rápido, fácil y económico. Otra forma de usarlo es mediante la aplicación en residuos vegetales, que permite disminuir la población de patógenos de los residuos y del suelo. Además, es posible su aplicación de forma foliar. (Intagri, 2016).

Capítulo III

Metodología

El estudio se llevó a cabo en el municipio de Pamplona, Norte de Santander, el desarrollo procedimental del presente trabajo se ejecutó, en el laboratorio del grupo de investigación en Microbiología, Biotecnología GIMBIO con apoyo del CEPARIO y en el laboratorio de Genética ubicados en el campus principal de la Universidad de Pamplona, Km 8 vía Bucaramanga, las pruebas en condiciones de campo se realizaron en el Colegio Normal Superior de Pamplona, Av Santander - B El Zulia.

Obtención, aislamiento y caracterización de las cepas antagonistas

La cepa comercial que fue usada para hacer la comparación, fue denominada **TC** y corresponde al agente biológico del producto FITOTRIPEN WP agente microbial polvo mojable (*Trichoderma spp.*, 1×10^8 esporas/gramo, 95 % pureza), con registro ICA N.º 4658, y producido por Natural Control (La Ceja, Antioquia). Este producto fue adquirido en un establecimiento distribuidor de productos agroquímicos de la ciudad de Pamplona.

Para el aislamiento de las cepas autóctonas, se procedió a muestrear en los predios del colegio Normal Superior, con una temperatura de 14 °C aproximadamente, con un 97% de humedad, a 2369 m.s.n.m a 7° 36'238" N, -72°65'769" W, cuyos linderos son al norte con el patinódromo, al oriente, vía los tanques, occidente, rívera del río Pamplonita, sur escuela normal superior. Es tomada en arriendo por el señor Pedro Villamizar, quien se encarga de realizar las labores agronómicas de los cultivos que desean producir, se cuenta con 1 ha de explotación. Sé recalca que no se cuenta con asistencia técnica y se desconoce totalmente el uso de controles biológicos para el manejo de enfermedades en los cultivos.

El procedimiento se realizó en zig-zag dentro de la zona del cultivo para tomar muestras del suelo a una profundidad de 20 -30 cm, empleando un barreno de cultivos. Se tomaron alrededor de 300 gramos de suelo en recipientes estériles, que se mantuvieron bajo condiciones de refrigeración hasta ser procesadas. La muestra de suelo fue homogenizada en agua peptonada y posteriormente se llevaron a cabo diluciones decimales seriadas, seguidamente se procedió a realizar siembras en superficie en el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), tomando 0,1 ml de cada dilución. El medio de cultivo se incubó a 25° C durante 5 días (Martínez *et al.*, 2003). A partir de los cultivos obtenidos se realizaron repiques, utilizando siembras por punción, de las colonias aisladas y con las características fenotípicas propias del género empleando la clave taxonómica de Kubicek y Harman (2002). A partir de las cepas obtenidas, los conidios fueron recolectados y almacenados en una solución de glicerol (40%) a -20°C. Las cepas fueron codificadas como **TN1, TN2, TN3 Y TN4**, en la figura 1 se muestra el lote de los predios del colegio Normal Superior de Pamplona el en el cual fueron aisladas las cepas de *Trichoderma spp.*.



Figura 1. Lote de los predios del colegio Normal Superior de Pamplona sitio donde se aisló el Trichoderma Spp..

Las cepas fúngicas (TN1, TN2, TN3, TN4) fueron verificadas y caracterizadas según su morfología macroscópica y microscópica siguiendo los criterios taxonómicos descritos por Vidaurre (2016).

Aislamiento y caracterización del agente fitopatógeno

En el mismo predio del colegio Normal Superior se colectaron aproximadamente 10 lechugas que presentaban las lesiones típicas que ocasiona el hongo fitopatógeno *Fusarium spp.*. Las plantas fueron almacenadas en recipientes estériles y se mantuvieron bajo condiciones de refrigeración hasta su procesamiento. Los órganos lesionados fueron sometidos a dos procedimientos de análisis: (1) Para aquellos órganos con presencia de micelio y esporas del hongo fitopatógeno, se les realizó en condiciones de cabina de flujo laminar, el repique del hongo presente en el fruto al medio de cultivo sólido PDA. (2) Mientras que, aquellos órganos con lesiones varias (confluencia de agentes biológicos), fueron homogenizados en agua peptonada, como paso previo de una serie de diluciones decimales seriadas, a partir de las cuales se hicieron siembras en superficie en medio de cultivo sólido PDA (Martínez *et al.*, 2003). El medio de cultivo se incubó a 25 °C durante un máximo de 5 días. Las colonias que presentaron el aspecto típico del género buscado fueron repicadas en una nueva placa Petri con medio PDA. Las colonias fueron caracterizadas según su morfología macroscópica y microscópica siguiendo los criterios de las claves dicotómicas propuestas por Gepp (2009). Los conidios de la cepa correspondiente a las características del género *Fusarium* fueron recolectados y almacenados en una solución de glicerol (40%) a -20°C. Para efectos del presente trabajo, las cepas fueron codificadas como **FS1, FS2, FS3**.



Figura 2, Plantas recolectadas con lesiones típicas que ocasionan el hongo Fusarium y procedimiento a los cuales fueron sometidos.

Evaluación de la actividad antagonista in vitro (cultivos duales) de los controladores biológicos contra el fitopatógeno Fusarium spp.

La evaluación de la acción antagónica de los hongos biocontroladores contra el hongo fitopatógeno, se realizó mediante el enfrentamiento en cultivo dual de los dos microorganismos (patógeno – antagonista) en placas de Petri de 9cm de diámetro sobre medio de cultivo PDA. Se tomaron los microorganismos (patógeno y antagonista), se sembraron por punción equidistantes del borde de la placa a 1cm sobre el medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA) (Lorenzo et al., 2002). Los controles fueron preparados con la misma técnica (punción) en cajas separadas cada antagonista y el patógeno, los cuales correspondían a los controles. Las placas con los microorganismos permanecieron incubadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, realizándose la revisión cada 24 h durante 14 días del crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos.

Antagonismo de las cepas (TN1) (TN2) (TN3), (TN4) y (TC), contra (FS1) (FS2) (FS3).

Este se comprobó estudiando las variables expuestas por Fernández y Suárez (2009); Radio de Crecimiento Antagonista (RCA), Radio de Crecimiento Patógeno (RCP), Micoparasitismo (MICMO) y Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR). La competencia por espacio y nutrientes se valoró comparando la velocidad del crecimiento del patógeno (RCP) y de los antagonistas (RCA) con la ayuda de un calibrador “Pie de Rey”, durante 14 días, cada enfrentamiento se realizó por triplicado (Figura 3). Simultáneamente se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), para el método de Punto, empleando la fórmula de Ezziyyani *et al.* (2004).

$$\text{PICR} = (\text{R1} - \text{R2}) / \text{R1} \times 100$$

Donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

Figura 3. Medición del crecimiento radial



Figura 3. Mediciones del crecimiento radial del patógeno y antagonista en el día 3 con la ayuda de un calibrador (pie de rey). Fuente: el Autor

Para poder determinar el grado de capacidad antagónica se empleó la siguiente escala creada por Elías y Arcos (1984) citada en Ezziyyani *et al.*, (2004) para evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo a la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma spp.*, sobre el fitopatógeno.

Tabla 2. Escala empleada por Ezziyyani y otros (2004) para la evaluación de la capacidad antagónica de los microorganismos

Grado	Capacidad antagónica
0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
1	Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
3	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno
4	Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno esporulación sobre ella

Fuente: propia tomado de Astorga (2013)

Caracterización bioquímica

Para esta caracterización se inoculó parte del micelio de cada hongo en cada uno de los medios específicos como se indican en las pruebas respectivas, e incubando a 25 °C por un periodo de 10 días con seguimiento diario de los cambios que se pudieran presentar.

Prueba de celulasas. El ensayo se realizó en medio agar carboximetilcelulosa (CMC). Para la revelación se siguió el protocolo propuesto por Zamudio y otros (2006), en el cual cada medio con su respectivo crecimiento fúngico fue cubierto con una solución Rojo Congo 0,5% durante 10 minutos, posteriormente esta se retiró y se añadió una solución de NaCl [0,1 N] durante 1 hora; cuando el tiempo terminó, se retiró la solución y por último se añadió ácido acético 2% permaneciendo por 10 segundos, siendo retirado finalmente. Se hizo una evaluación cualitativa en la cual la aparición de un área de aclaramiento alrededor de la colonia se tomó como resultado positivo.

Prueba de amonificación. El ensayo se realizó en medio agar amonio. Se hizo una evaluación cualitativa en la cual la coloración amarilla de la colonia y el medio se tomó como resultado positivo.

Prueba de amilasas. El ensayo se realizó en medio agar almidón. Se hizo una evaluación cualitativa con lugol como agente de revelación, en la cual como la aparición de un área de aclaramiento alrededor de la colonia se tomó como resultado positivo.

Prueba de reducción de nitratos. El ensayo se realizó en medio agar nitrato. Para la revelación se siguió el protocolo propuesto por Zamudio, y otros (2006), en el cual cada medio con su respectivo

crecimiento fúngico fue cubierto con el reactivo de Griess- Ilosvay, haciendo una evaluación cualitativa en la cual una coloración fucsia/ roja del medio se toma como resultado positivo.

Preparación en masa y conteo de conidios de los agentes biológicos

Como parte del proceso preparativo de las cepas fúngicas para el estudio en condiciones de campo abierto, se procedió a su propagación en masa. El método de propagación se basó en el uso de botella con arroz cocido, descrito por Parra (2018) y Flores *et al.* (2018).

Se emplearon botellas de 500 ml a las cuales se les incorporó 100 gramos de arroz y 40 ml de agua como se muestra en la Figura 4. La esterilización fue llevada a cabo con autoclave a 121°C/15 libras de presión por 10 minutos, con el fin de evitar sobre cocción del grano.

Figura 4. Preparación de arroz para la elaboración de medios de cultivos artesanales.

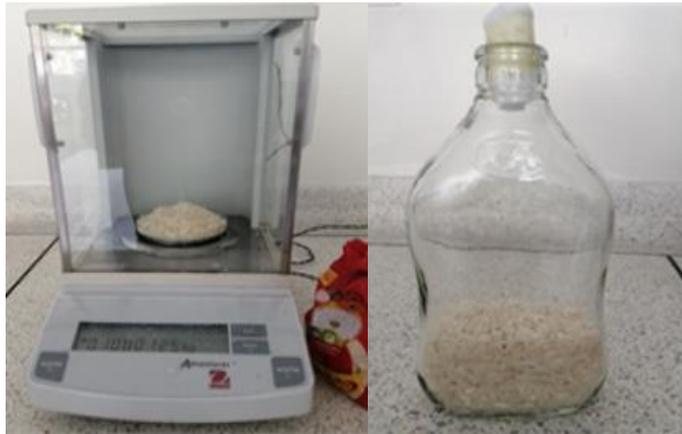


Figura 4. Preparación de arroz, Pesaje de 100g de arroz en una balanza analítica y posteriormente empacados en botellas de 500ml, para luego ser esterilizado.

Pasado el tiempo de esterilización y reposo, se realizó una siembra en botellas independientes con cada una de las cepas en estudio. Las botellas fueron incubadas a 25°C±2°C durante 10 días.

Transcurrido el tiempo de incubación, se emplearon 100 ml de agua destilada estéril como medio diluyente a cada botella (Pineda *et al.*, 2017). Luego se realizó el conteo de conidios en cámara de

Neubauer, (Lumycite, Propper, Manufacturing Co. Inc. Long Island, NY), siguiendo las indicaciones del fabricante y lo sugerido por Arredondo y Voltolina (2014).

Concentración = promedio de esporas x 16 x 25 x 10000 x dilución

Análisis de la eficacia protectora de los controladores biológicos en condiciones de campo abierto

El efecto protector se evaluó comparando la cepa nativa que tuvo un porcentaje mayor sobre el hongo *fusarium spp* con la cepa del producto comercial TC, en condiciones de campo abierto.

Área de estudio

Los experimentos de campo fueron realizados en los predios del Colegio Normal Superior de Pamplona, con una temperatura de 14 °C aproximadamente, con un 97% de humedad, a 2369 m.s.n.m a 7° 36'238" N, -72°65'769" W, cuyos linderos son al norte con el patinodromo, al oriente, vía los tanques, occidente, rivera del rio Pamplonita, sur escuela normal superior. Es tomada en arriendo por el señor Pedro Villamizar, quien se encarga de realizar las labores agronómicas de los cultivos que desean producir, se cuenta con 1 ha de explotación. Sé recalca que no se cuenta con asistencia técnica y se desconoce totalmente el uso de controles biológicos para el manejo de enfermedades en los cultivos.

Figura 5. Localización espacial del proyecto, inicialmente el departamento Norte de Santander, luego el municipio de Pamplona, y posteriormente se ubica el área de estudio.

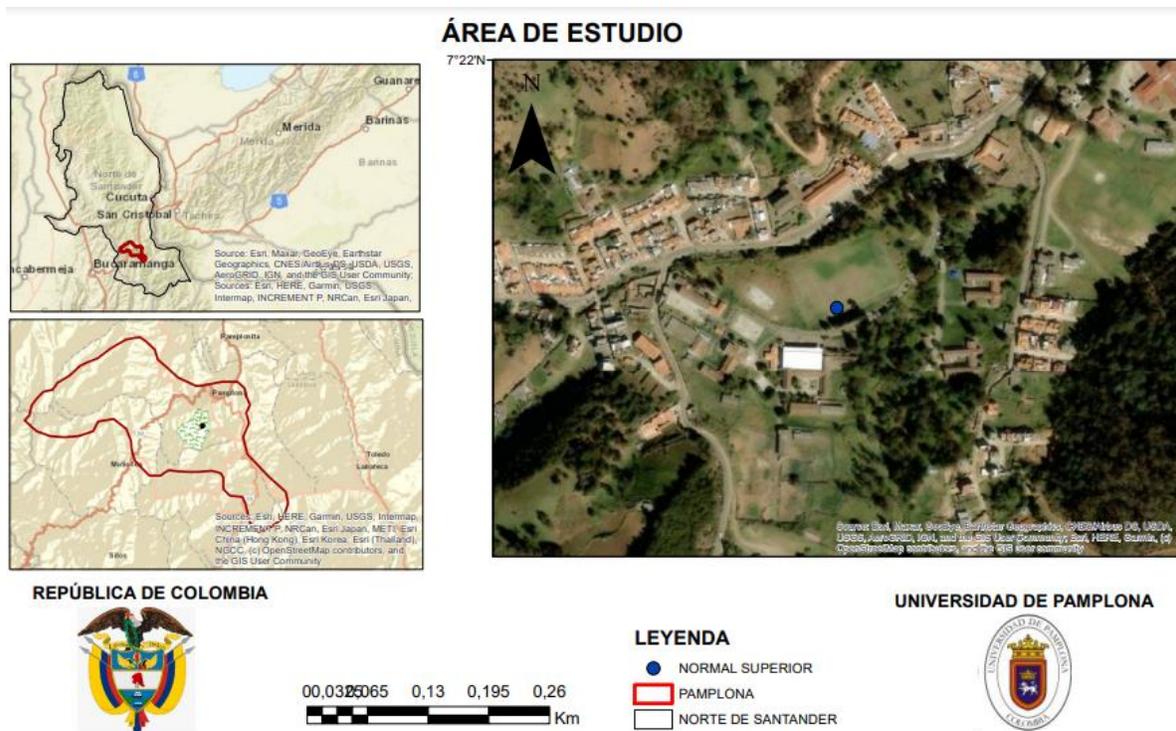


Figura 5. Localización espacial del proyecto, Fuente: spatial analysis software (ARCGIS)

Preparación del terreno y establecimiento del cultivo

La preparación del terreno se realizó de manera manual utilizando azadón, con el fin descompactar el suelo para permitir el buen desarrollo de las raíces y el respectivo drenaje del mismo; ésta se hizo a una profundidad de 20 a 35 cm. El suelo se dejó reposar durante diez días, luego se le pasó un rastrillo (Figura 6A) con el fin de nivelar y soltar terrones y pulirlo para que quede mullido y listo para la siembra.

Los trasplantes fueron seleccionados de un cultivo ya establecido y desinfectados por el agricultor, y se mantuvieron húmedos, luego se colocaron en las parcelas (Figura 6B) con las raíces extendidas hacia abajo de manera que las raíces estén bajo el nivel del suelo y la corona del tallo esté arriba del nivel del suelo y se regó inmediatamente después de plantar.

Figura 6. Preparación y trasplante.



Figura 6. Preparación del terreno. A preparación de las parcelas. B. Trasplante de la lechuga ((Lactuca sativa L.) C. Parcelas y sembrado.

Riego

El riego se aplicó mediante aspersores, este tipo de riego consiste en hacer llegar el agua en forma de lluvia, utilizando para ello una serie de aspersores. La frecuencia de riego fue cada día y dependió de las condiciones climáticas prevalecientes durante el ensayo.

Control de malezas.

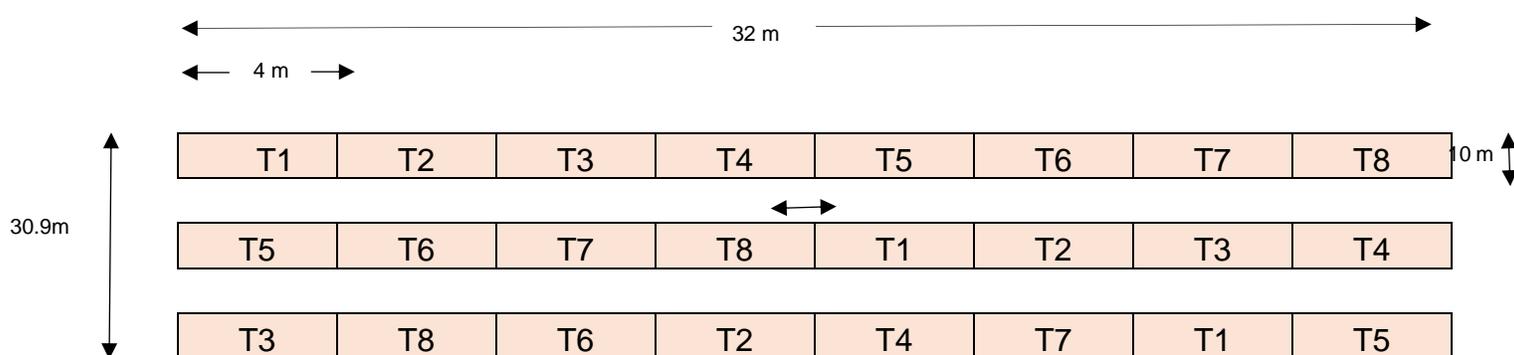
El control de maleza se realizó de manera manual en las eras o camas y calles del cultivo, esto ayuda a que no haya competencia por nutrientes entre las plantas no deseadas y las del cultivo de la fresa.

Diseño experimental

Para este experimento se empleó un diseño en bloques completamente al azar (BCA) con el propósito de tener las unidades experimentales de forma tan uniforme como sea posible, de manera que las diferencias observadas sean fundamentalmente debidas a los tratamientos (Fernández, Trapero y Domínguez, 2011).

Para tal diseño, se hicieron arreglos de tres bloques con siete tratamientos y uno en blanco, cada una con 40 plantas, 20 de las cuales hacían parte del efecto borde (Tabla 2). El cultivo se sembró de manera similar a lo que habitualmente hacen los productores, Las parcelas experimentales fueron de 10m de alto x 4 m de ancho, cada uno, una separación de 0,30 m entre calles y una distancia de siembra de 0,30 m

Tabla 3. Diseño en bloque completamente al azar (BCA)



Fuente: Autor

Distancia de siembra: 0.30 m x 0.30 m entre planta

Medidas de las parcelas: 4 m de ancho x 10 m de largo= 40 m²

Número de plantas por parcela: 40 plantas

Descripción de los tratamientos en la parcela experimental

Se aplicaron ocho tratamientos, en los que se consideraron 3 concentraciones diferentes de los biocontroladores (10^3 , 10^5 y 10^7 conidios/ml), y 2 controles uno (sin patógeno y sin controlador biológico) y dos (con FS3 y sin controlador). Tal y como se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Descripción de los tratamientos

Tratamiento	Descripción
T1	FS3 + TN4 (concentración 1×10^7 conidios/ml).
T2	FS3 + TN4 (concentración 1×10^5 conidios/ml).
T3	FS3 + TN4 (concentración 1×10^3 conidios/ml).
T4	FS3 + TC (concentración 1×10^7 conidios/ml).
T5	FS3 + TC (concentración 1×10^5 conidios/ml).
T6	FS3+ TC (concentración 1×10^3 conidios/ml).
T7	Control 2 (con FS3 y sin controlador).
T8	Control 1 (sin patógeno y sin controlador biológico).

Tabla 4. Se observa cada biocontrolador con tres concentraciones diferentes y los controles

Aplicación del patógeno y los tratamientos

Las aplicaciones se hicieron con el mismo método de forma foliar con una bomba de fumigación de 20 litros por parte del productor a cargo de la parcela con el acompañamiento del estudiante. La aplicación del fitopatógeno (cepa FS3) se realizó una única vez al mes y medio del cultivo. La aplicación de los controladores se realizó en 3 oportunidades, siendo la primera, 20 días antes de aplicar el fitopatógeno, la segunda 20 días después de aplicar el fitopatógeno, la tercera en la etapa de floración.

VARIABLES DE ESTUDIO

Incidencia (%): porcentaje del número de plantas enfermas, se tomó la escala que correspondiente al grado de afectación, empujando la siguiente fórmula, se calculó:

$$I = \text{número plantas enfermas} / \text{Total plantas evaluadas} * 100$$

Capítulo IV

Resultados y análisis

Aislamiento, Caracterización morfológica y observación microscópica de los controladores biológicos y los hongos fitopatógenos

En el proceso de aislamiento de las cepas autóctonas, a partir de la muestra del suelo, se obtuvieron 7 colonias aisladas, en la dilución 1×10^{-7} . Después de hacer el aislamiento de c/u de ellas en medio PDA, 4 colonias presentaron las características típicas del género *Trichoderma*, y su caracterización fenotípica fue realizada siguiendo los criterios taxonómicos descritos por Vidaurre (2016); Kubicek y Harman (2002), las cepas así obtenidas fueron denominadas TN1, TN2, TN3, TN4.

Cepas de *Trichoderma spp.*

La cepa TN1 de *Trichoderma spp.* nativa del cultivo de lechuga del colegio Normal Superior, presenta un micelio que cubre la placa después de 5 días a 25°C, presenta un micelio con textura algodonosa, denso, de coloración verde claro con blanco, poseen una colonia circular con hifas aéreas abundantes de color negro, En su microscopia se pueden observar hifas ramificadas septadas, de las cuales se desprenden conidióforos también ramificados, poseen fiálides agrupadas de 2 a 4 con forma de botella y muchas veces con cabezas conidiales (Figura 7).

Figura 7. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN1)

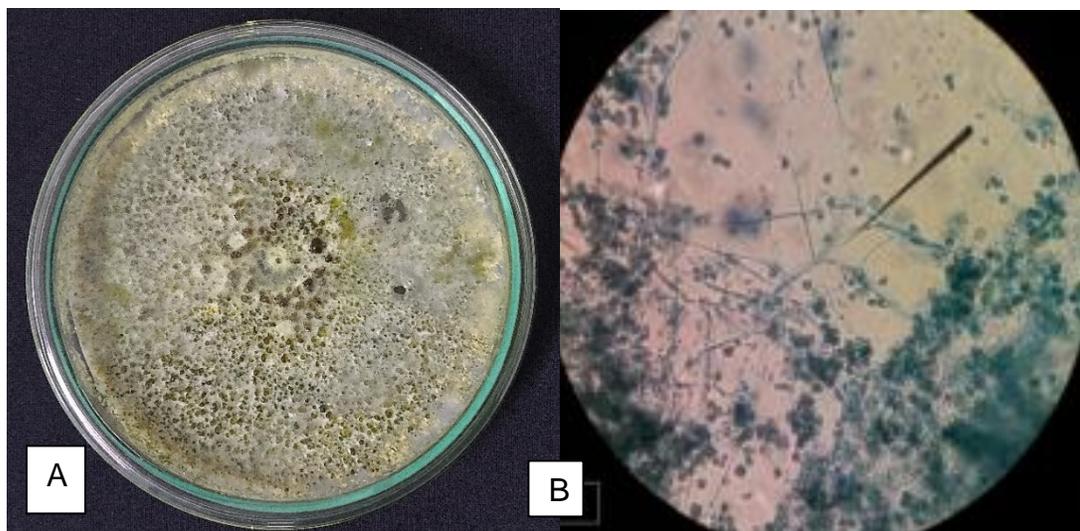


Figura 7. (A) Crecimiento de la cepa TN1 nativa de *Trichoderma spp.* en Agar PDA, (B) vista a 40X, con azul de lactofenol, posee hifas hialinas, fiálides agrupadas de 2 a 4 en forma de botella y con cabezas conidiales.

Fuente: autor.

La cepa nativa TN2 de *Trichoderma spp.*, obtenida del colegio Normal Superior, presenta un crecimiento micelial de coloración verde claro, que más tarde se observa blanco verdoso de aspecto algodónoso. En la microscopía se observan hifas hialinas ramificadas septadas, a partir de los cuales se desarrollan fiálides en forma de botella y los conidios muchas veces en formación de cabezas conidiales (Figura 8).

Figura 8. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN2)

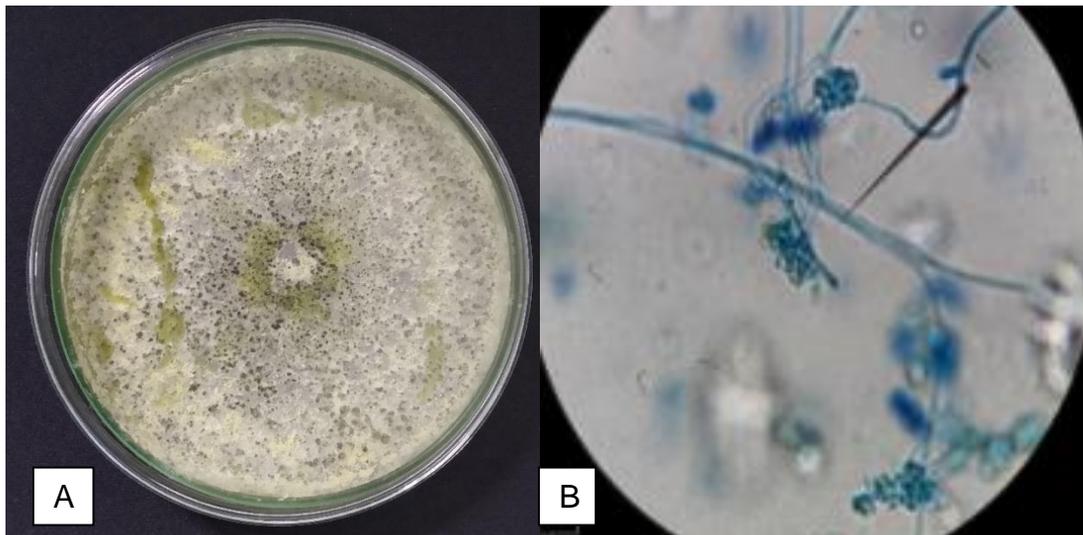


Figura 8. (A) Crecimiento de la cepa TN2 de *Trichoderma spp.* en Agar PDA, (B) vista a 100X, con azul de lactofenol en microscopio óptico, se observan conidios en formación de cabezas conidiales. Fuente: autor.

La cepa nativa TN3 de *Trichoderma spp.*, obtenida del colegio Normal Superior, su crecimiento micelial toma una coloración blanco amarillo y más tarde se observan blanco verdosas con insertos de conidios en tonos verde oliva la textura es correosa. En la microscopía se observan Hifas de pared rugosa, hialinas, ramificadas, septadas que dan origen a conidióforos ramificados irregularmente piramidales, posee fiálides agrupadas (entre 2 y 4), en forma cilíndrica. Los conidios presentan una pared rugosa típicamente de forma globosa y rara vez elipsoidales (Figura 9).

Figura 9. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN3)

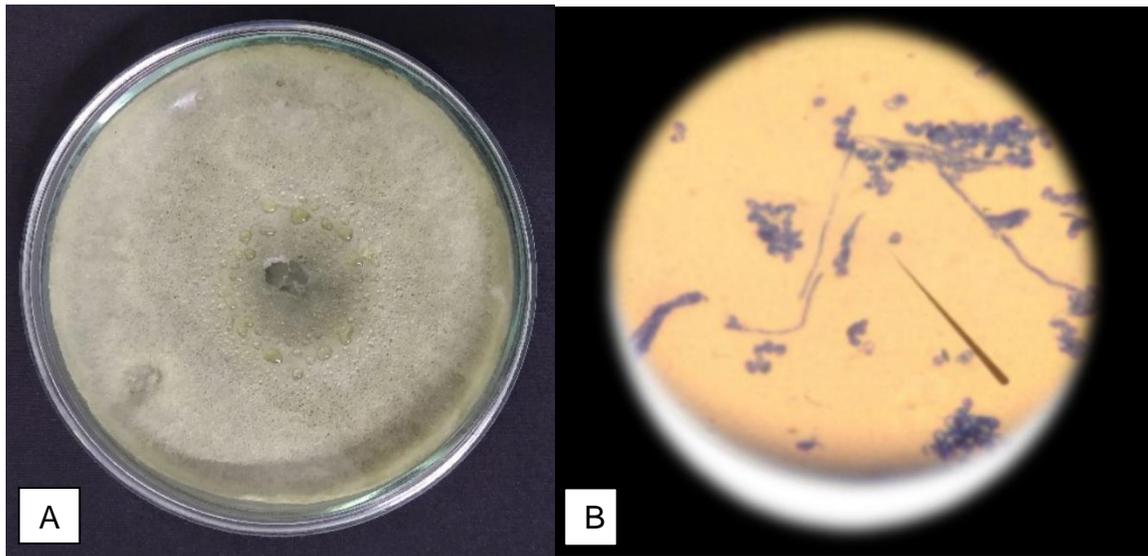


Figura 9. (A) Crecimiento de la cepa TN3 de *Trichoderma spp.* en Agar PDA, **(B)** vista a 100X, con azul de lactofenol, Hifas de pared rugosa, hialinas, ramificadas, septadas que dan origen a conidióforos ramificados irregularmente piramidales, posee fiálides agrupadas.

. Fuente: autor.

La cepa nativa TN4 de *Trichoderma spp.*, obtenida del colegio Normal Superior su desarrollo micelial en el medio de un color verde claro a blanco de consistencia esponjosa abundante, aspecto algodónoso, se puede observar numerosas estructuras pequeñas blanquecinas filamentosas, esporulación verde oliva. En su microscopía se muestra que la cepa TN4 posee conidios elipsoidales, hifas hialinas y septadas, fiálides delgadas en forma de botella y conidióforos mono y biverticilados simétricos que emergen principalmente en ángulos rectos de las hifas superficiales (Figura 10).

Figura 10. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TN3)

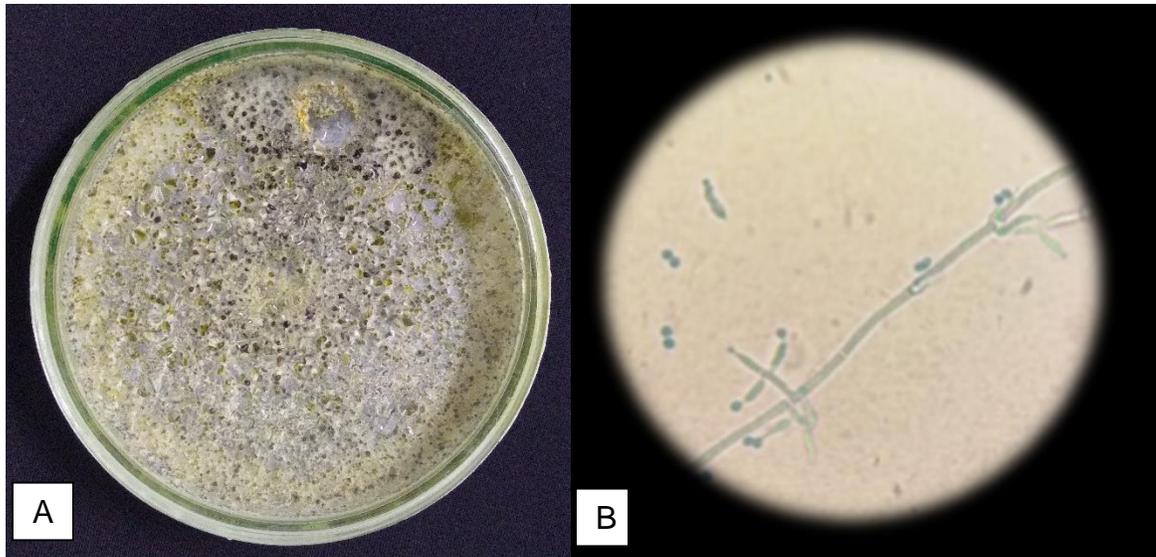


Figura 10. (A) Crecimiento de la cepa TN4 de *Trichoderma spp.* en Agar PDA, (B) vista a 40X, con azul de lactofenol, Hifas hialinas septadas, fialides delgadas en forma de botellas y conidios elipsoidales.
. Fuente: autor.

La cepa comercial TC de *Trichoderma spp.* su desarrollo micelar en el medio de cultivo presenta unas tonalidades blancas cuando es joven, cuando alcanza su máximo crecimiento tiende a tornarse de un color blanco -verde, de aspecto algodonoso, algunas veces pueden observarse estructuras pequeñas blanquecinas, con una esporulación verde oliva de apariencia aterciopelada. En su microscopia se muestran hifas hialinas, septadas, ramificadas de las cuales se desarrollan conidióforos ramificados piramidales, es decir, varias veces ramificados con ramas cortas, fiálides delgadas en forma de botella donde se desprenden conidios de paredes lisas, subglobos cortos y ovoides. Características propias del género según Kubicek y Harman (2002).

Figura 11. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (TC)

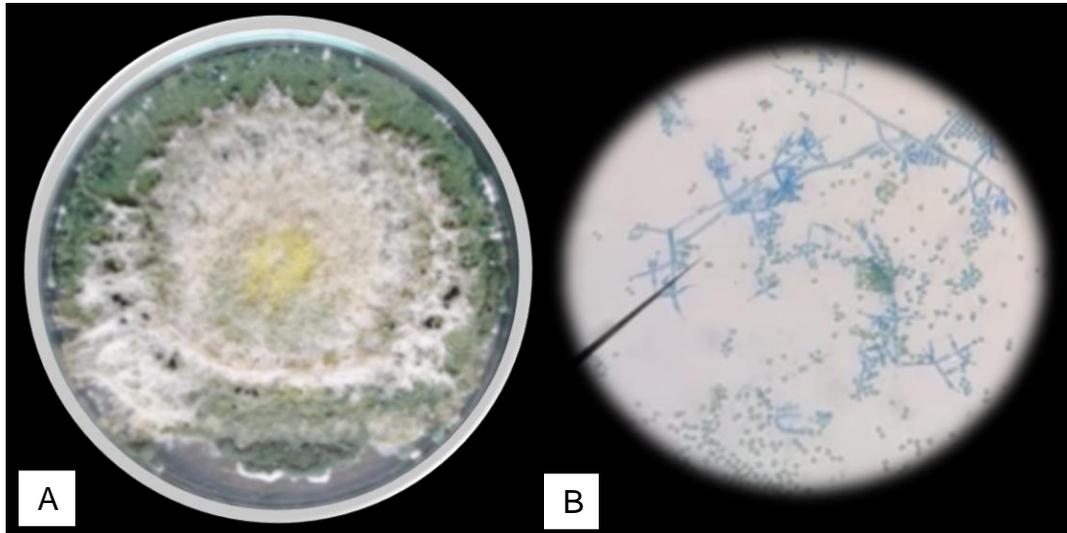


Figura 11. (A). Crecimiento de TC *Trichoderma spp.*, en Agar PDA, (B). Vista a 40X, con azul de lactofenol, hifas hialinas septadas, fialides delgadas en forma de botellas y conidios de pared lisa.

Cepas de los Fitopatógenos

En el proceso de aislamiento de la cepa fitopatógena, a partir de las plantas colectados que presentaron signos típicos de la enfermedad causada por el fitopatógeno *Fusarium spp.*, se obtuvieron colonias aisladas con características típicas del fitopatógeno. Las cepas fueron denominadas: FS1, FS2. FS3.

La cepa FS1 de *Fusarium spp.*, aislado del cultivo de lechuda del colegio Normal Superior, presento micelio algodonoso blanco con una coloración amarillo un poco intenso en PDA, microscópicamente posee microconidios ovales sin septos, agregados en falsas cabezas (Figura 12).

Figura 12. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (FS1)

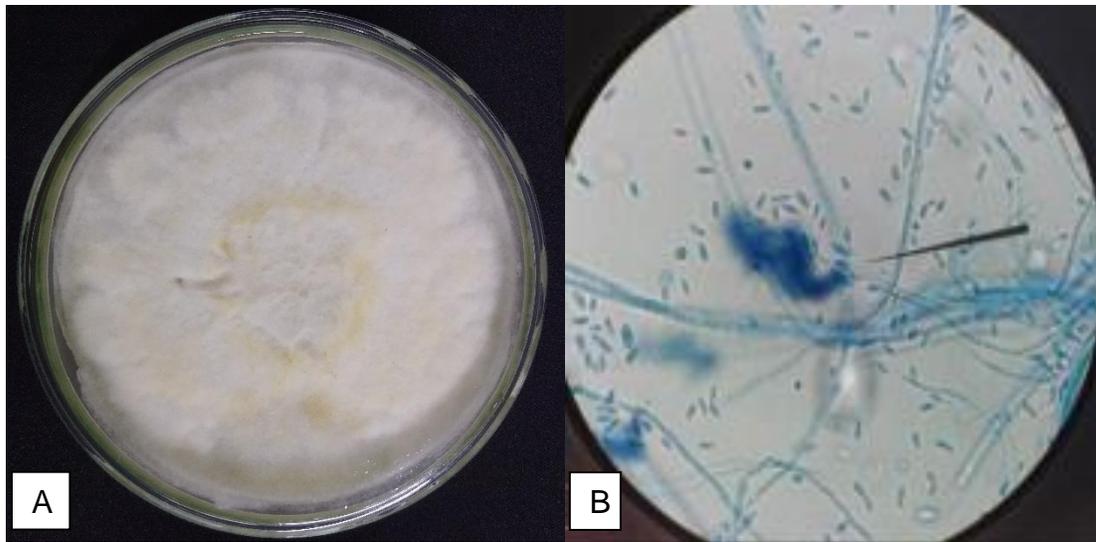


Figura 12. (A) Crecimiento de la cepa FS1 de *Fusarium spp.* en Agar PDA, (B) vista en 100X, con azul de lactofenol en microscopio óptico.

Fuente: autor.

La cepa FS2 de *Fusarium spp.*, asilado del cultivo de lechuda del colegio Normal Superior, su crecimiento micelial toman una amarilla pálida con tonos blanquecinos, la textura es algodonosa. Microscópicamente presenta microconidas, en cadenas en fiálides simples y ausencia de clamidosporas (Figura 13)

Figura 13. Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (FS2)

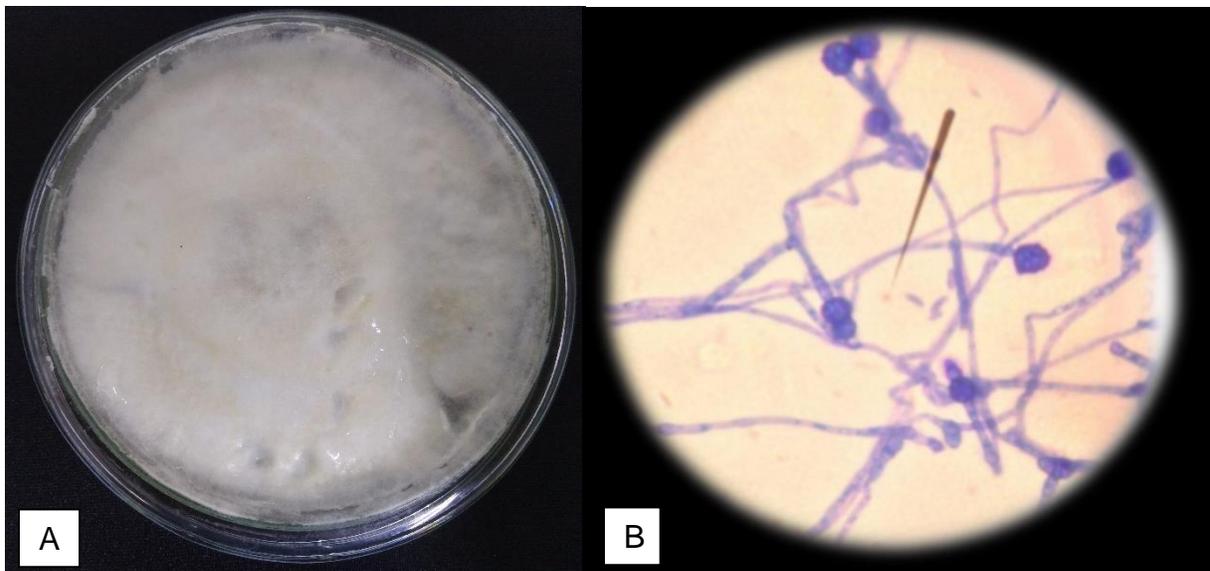


Figura 13. (A) Crecimiento de la cepa FS2 de *Fusarium spp.* en Agar PDA, (B) Microconidas, vista en 100 X en azul de lactofenol. Microscopio óptico. Fuente: autor.

La cepa FS3 de *Fusarium spp.*, aislada del cultivo de lechuga del colegio Normal Superior, presenta micelio blanco, al inicio, que se van transformando en color rojo y posee una coloración en el centro amarilla en el agar PDA. Microscópicamente tienen macroconidias con apariencia larga y delgada, y con cinco o seis septos (Figura 14)

Figura 14. *Características morfológicas y observación microscópica de la cepa (FS3)*

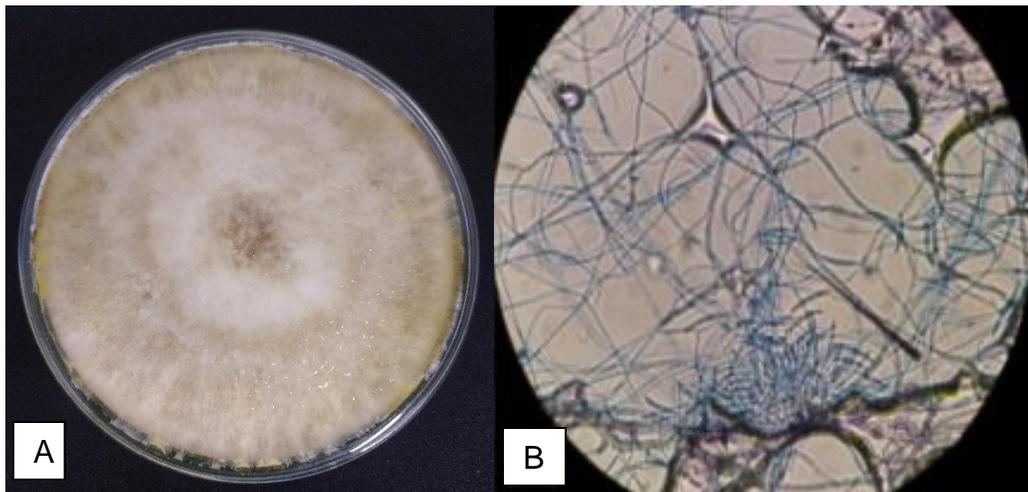


Figura 14. (A) Crecimiento de la cepa 3 de *Fusarium spp.* en Agar PDA, (B) vista en 40X, con azul de lactofenol en microscopio óptico.

Fuente: autor.

Caracterizaciones bioquímicas en las cuatro cepas de *Trichoderma spp.* y en los hongos fitopatógenos, presentes en el cultivo de lechuga del colegio Normal Superior.

En la tabla 4 se presentan los resultados obtenidos de la batería bioquímica evaluada para cada una de las cepas de estudio tras un periodo de incubación de 10 días a 25°C; la evidencia fotográfica se encuentra dispuesta en los anexos.

Tabla 5. Actividad enzimática de los hongos fitopatógenos.

<i>Actividad Enzimática</i>	<i>Medio</i>	<i>Cepa</i>						
		<i>TN1</i>	<i>TN2</i>	<i>TN3</i>	<i>TN4</i>	<i>FS1</i>	<i>FS2</i>	<i>FS3</i>
<i>Celulasa</i>	Agar carboximetilcelulosa (CMC)	+	+	+	+	+	+	+
<i>Amonificación</i>	Agar amonio	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aminolíticos</i>	Agar almidón	+	+	+	+	+	+	+
<i>Nitrificantes</i>	Agar nitrato	+	+	-	-	-	+	+

Fuente: Autor

Las cepas de *Trichoderma spp.*, y las tres cepas de *Fusarium spp.*, presentaron una actividad enzimática en suelo amonificante, amilolítico y nitrificante, que de acuerdo con Atlas et al., (2002) el ciclo de los microorganismo inicia con la materia orgánica muerta, estructurada de compuestos orgánicos complejos ricos en nitrógeno de modo que los hongos presentes en los suelos lo transforman a partir de aminoácidos y proteínas desasiendo el nitrógeno restante en forma de iones amonio, proceso al cual se le denomina amonificación.

Los microorganismos mencionados anteriormente presentaron la capacidad de degradar el almidón y la celulosa, esto se debe principalmente a que estas son las fuentes de carbono más distribuidas en la naturaleza. Dichos polímeros están compuestos de unidades de glucosa, por lo que se requieren diferentes sistemas enzimáticos para degradarlos (Arellano y Olmos, 1999). Los grupos microbianos con actividad amilolítica juegan un papel fundamental en el ciclaje de nutrientes a nivel del suelo, pues actúan sobre el almidón gracias a la producción de enzimas extracelulares denominadas amilasas, liberando la glucosa que es un sustrato más asimilable por el resto de las poblaciones de microorganismos (Beltrán y Lizarazo, 2013). La adecuada proporción de materia

orgánica facilitara el establecimiento de dichas poblaciones a estos agroecosistemas, siendo el humus en suelo, una fuente importante de minerales y nutrientes orgánicos para las poblaciones de microorganismos nativos del cultivo (Cheng et al., 2015).

De acuerdo al orden presentado en la tabla 5, las pruebas hacen referencia a sustratos comunes en la naturaleza que los microorganismos emplean como fuente de carbono; así pues, el sustrato de la celulosa, reconocida por ser un polisacárido estructural complejo de la pared celular de los organismos vegetales. Para el ensayo se empleó un derivado de la celulosa denominado carboximetilcelulosa, en este se observaron dos aspectos: el primero, la capacidad de las cuatro cepas de *Trichoderma spp.*, y las tres cepas de *Fusarium spp.*, de crecer en la superficie del medio y el segundo, la generación de un halo de aclaramiento alrededor de las colonias tras su revelado, estas observaciones confirmaron la teoría de la actividad celulolítica.

El sustrato de almidón, un polisacárido de estructura compleja que actúa como carbohidrato de reserva en los vegetales; las cuatro cepas de *Trichoderma spp.*, y las tres cepas de *Fusarium spp.*, evaluadas dieron positivo para la prueba de amilasas, tras revelar un halo de aclaramiento con lugol alrededor del crecimiento fúngico, es decir que poseen la enzima amilasa. En la prueba de nitrificación que evalúa la capacidad de las cepas para emplear el nitrato (NO₃) como aceptor final de electrones reduciéndolo a nitrito (NO₂) generando un cambio de color del medio a rojizo al añadir el reactivo de Griess fue positiva para: TN1, TN2, FS2 y FS3 y negativa para las especies TN3, TN3 Y FS1 de las cepas analizadas. En la prueba de amonificación se determinó que todas las cepas fueron positivas en la liberación del ion amonio que acidifica el medio.

Determinación del crecimiento micelial de las cepas de Trichoderma spp. Sobre las cepas de fusarium spp., presentes en un cultivo de lechuga del colegio Normal Superior, Pamplona

Para realizar los bioensayos que permiten evaluar la capacidad antagónica de los biocontroladores se utilizó la técnica dual “controlador-patógeno” (Agamez , Barrera y Oviedo, 2009). Los enfrentamientos se configuraron de la siguiente manera: TN1-FS1, TN1-FS2, TN1-FS3; TN2-FS1, TN2-FS2, TN2-FS3; TN3-FS1, TN3-FS2, TN3-FS3; TN4-FS1, TN4-FS2, TN4-FS3 y TC-FS1, TC-FS2, TC-FS3. Las comparaciones del crecimiento radial de los antagonistas (*Trichoderma spp.*) con el crecimiento radial de los patógenos (*Fusarium spp.*) se realizó durante catorce días.

Figura 15. Competencia por espacio y nutriente de las cepas TN1, TN2, TN3, TN4 Y TC vs FS1

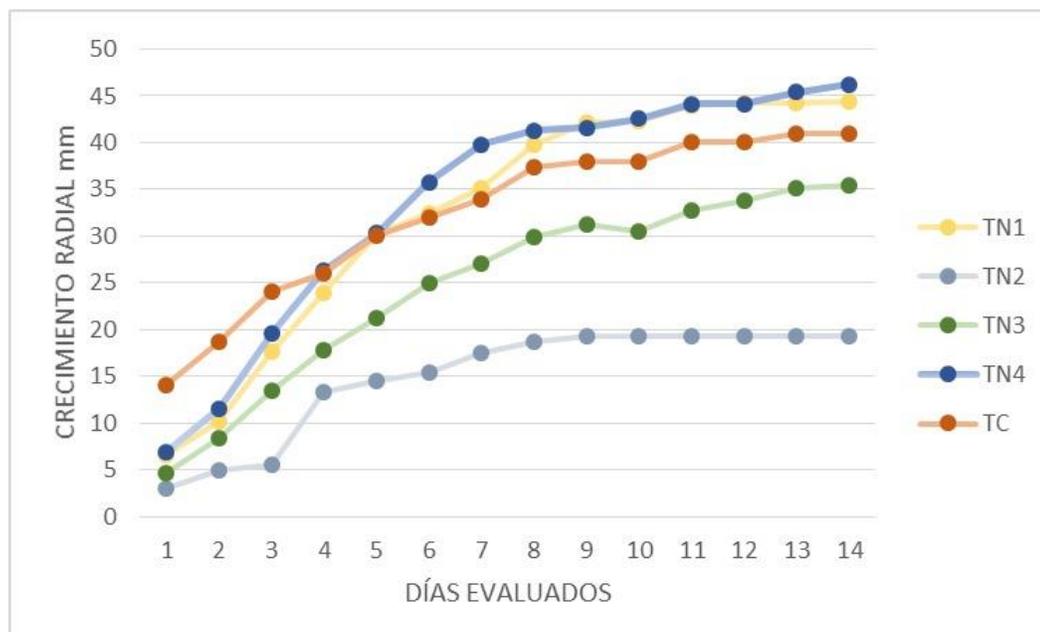


Figura 15. Promedio de crecimiento micelial en enfrentamiento de competencia dual, durante los catorce días evaluados, en las cinco cepas de Trichoderma spp. frente a FS1.

Fuente: autor.

En la figura 15 se observa el promedio de crecimiento micelial durante catorce días evaluados, de las cinco cepas de *Trichoderma spp.* en competencia dual con FS1. La cepa TN1 inicia con un

crecimiento de 6.533mm y finaliza en 44.466, la cepa TN2 quien fue la que obtuvo un menor crecimiento frente a FS1, inicia con 3 mm y del día 9 su crecimiento se mantiene estático finalizando en 19.233, la cepa TN3 inicia con un crecimiento de 4.66 mm y finaliza en 35.4, la cepa TN4 quien fue el controlador que presento un mayor crecimiento frente a FS1 inicia con 6.9 mm y finaliza su crecimiento con 46.2, teniendo mayor efecto en competencia por espacio y nutrientes, y la cepa TC inicia con un crecimiento de 14 mm y finaliza con 41 mm.

Figura 16. Competencia por espacio y nutriente de las cepas TN1, TN2, TN3, TN4 Y TC vs FS2

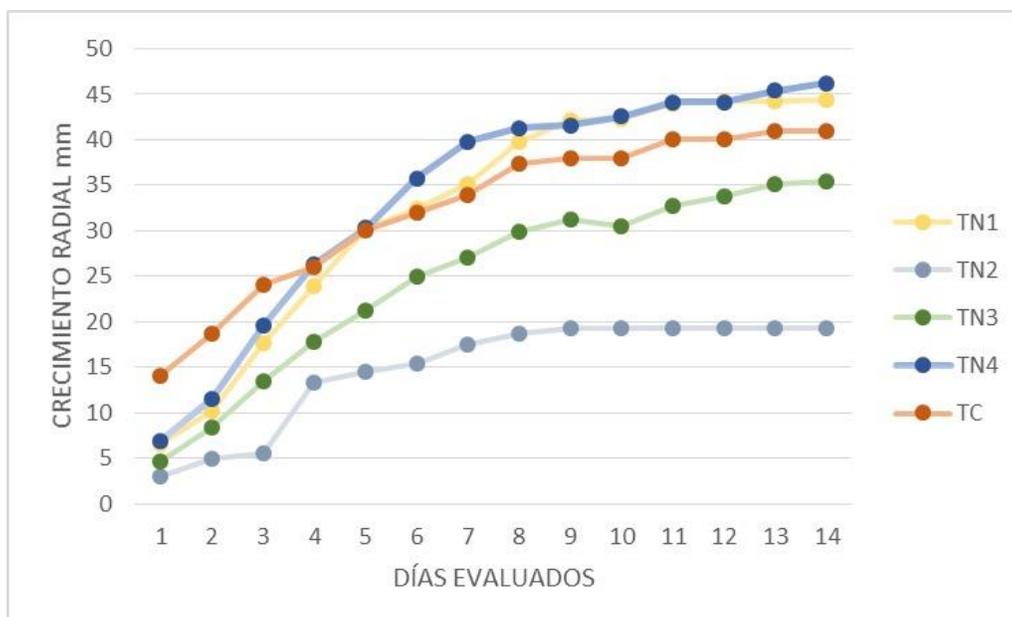


Figura 16. Promedio de crecimiento micelial en enfrentamiento de competencia dual, durante los catorce días evaluados, en las cinco cepas de *Trichoderma spp.* frente a FS2.

Fuente: autor.

En la figura 16 se observa el promedio de crecimiento micelial durante catorce días evaluados, de las cinco cepas de *Trichoderma spp.* en competencia dual con FS2, La cepa TN1 inicia con un crecimiento de 4.133mm y finaliza en 41.03, la cepa TN2 quien fue la que obtuvo un menor

crecimiento, inicia con 2.33 mm y del día 11 en adelante su crecimiento se mantiene estático finalizando en 10.5, la cepa TN3 inicia con un crecimiento de 9.66 mm y finaliza en 40.56, la cepa TN4 quien fue el controlador que presento un mayor crecimiento frente a FS1 inicia con 8.33 mm y finaliza su crecimiento con 53.9, teniendo mayor efecto en competencia por espacio y nutrientes, y la cepa TC inicia con un crecimiento de 10 mm y finaliza con 37.73 mm.

Figura 17. Competencia por espacio y nutriente de las cepas TN1, TN2, TN3, TN4 Y TC vs FS3

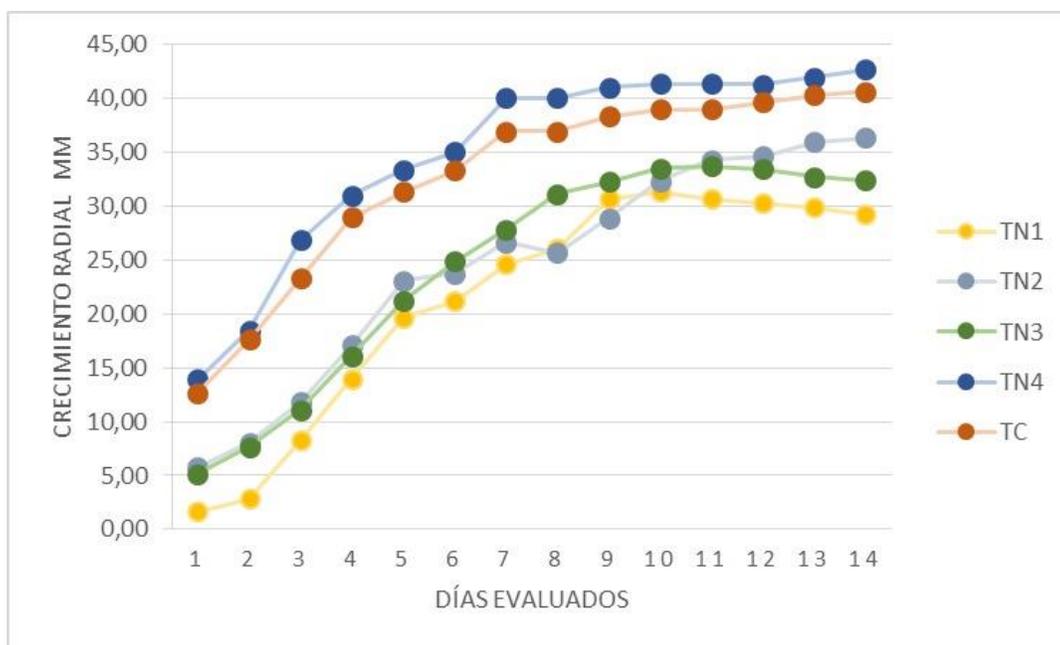


Figura 17. Promedio de crecimiento micelial en enfrentamiento de competencia dual, durante los catorce días evaluados, en las cinco cepas de *Trichoderma spp.* frente a FS3.

Fuente: autor.

En la figura 17 se observa el promedio de crecimiento micelial durante catorce días evaluados, de las cinco cepas de *Trichoderma spp.* en competencia dual con FS3. La cepa TN1 quien fue la que obtuvo un menor crecimiento frente a FS3, inicia con 1.63 mm y finaliza en 29.27 mm, la cepa TN2 inicia con un crecimiento de 5.73 mm y finaliza en 36.40 mm, la cepa TN3 inicia con un

crecimiento de 13.97 mm y finaliza en 32.40 mm, la cepa TN4 quien fue el controlador que presento un mayor crecimiento frente a FS3 inicia con 13.97 mm y finaliza su crecimiento con 42.73, teniendo mayor efecto en competencia por espacio y nutrientes, y la cepa TC inicia con un crecimiento de 12.67 mm y finaliza con 40.67 mm.

Todos los antagonistas, tuvieron un crecimiento rápido en busca de nutrientes. El antagonista que siempre presento mayor crecimiento frente a las demás cepas de *Trichoderma spp.*, fue TN4 como se mencionó anteriormente. Aproximadamente en el día 7 todos tocan a los patógenos, cercando el crecimiento de este. El patógeno que presento mayor competencia por espacio y nutrientes fue FS3 en comparación a los demás patógenos (figura 18A) ya que la mayoría de antagonistas no pudieron impedir su crecimiento.

Figura 18. Crecimiento del antagonista TN1 frente a FS3 y FS2, día 14

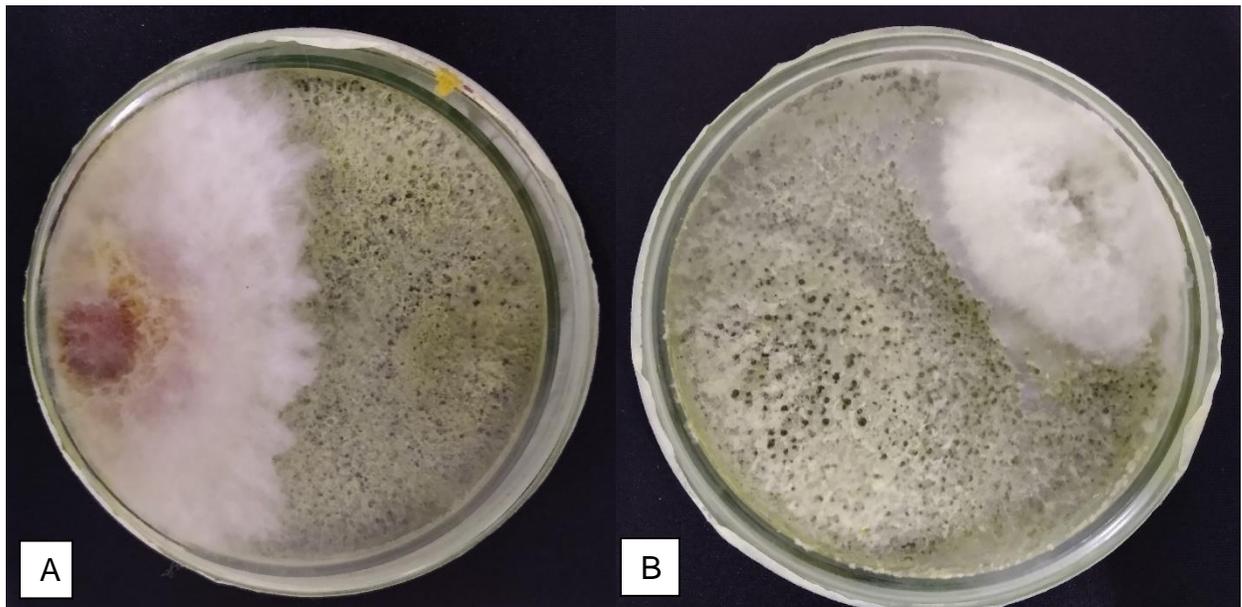


Figura 18. (A) Se ilustra que la invasión de la cepa TN1 de *Trichoderma spp.*, sobre FS3, no fue tan efectiva sobre el patógeno, (B) se observa que la invasión de la cepa TN1 de *Trichoderma spp.*, sobre FS2 tuvo mayor crecimiento, fotografías tomadas el día 14 de la evaluación. Fuente: Autor.

Escala de evaluación de la capacidad antagónica (Micoparasitismo)

Al comparar los diferentes grados de la capacidad antagónica *in vitro* de TN1, TN2, TN3, TN4 y TC sobre FS1, FS2 Y FS3., se evidencia que solo alcanzan la escala grado 2, los antagonistas TN4 y TC, que se manifiesta con $\frac{1}{2}$ de la invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno y esporulación sobre ella, la cepa TN3 se manifiesta con $\frac{1}{4}$ de la invacion total de la superficie alcanzando el grado 1, la cepa TN1 t TN2 no presentó ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo fitopatógeno con una escala de grado 0 (Tabla 6).

Este proceso de micoparasitismo se debe a que el hongo antagonista crece quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas del mismo, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatógeno y conduciendo a una muerte lenta. Todo este proceso está acompañado de la delimitación por espacio y nutrientes (Hernández, Ferrera, y Alarcón, 2019).

Tabla 6. Resultados escala del grado de capacidad antagónica

Antagonista	Grado	Capacidad antagónica
TN1	0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
TN2	0	Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno
TN3	1	Invasión de 1/4 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
TN4	2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno
TC	2	Invasión de 1/2 de la superficie de la colonia del hongo patógeno

Tabla 6. Escala creada por Elías y Arcos (1984) citada en Ezziyyani et al., (2004) para evaluación de la capacidad antagónica (micoparasitismo), de acuerdo a la medida de la invasión de la superficie, colonización y esporulación de *Trichoderma spp.*, sobre el fitopatógeno

Biopreparados para la dosificación de los hongos antagonistas.

Las cepas mostraron crecimiento micelial típico de las características macroscópicas de cada especie en el medio de cultivo preparado con arroz de manera artesanal después de los 10 días de incubación, además se logró observar los conidios de cada uno, usando la tinción con azul de lactofenol en montaje en la cámara de Neubauer, para así conocer la aproximación de producción de conidios en cada botella con el biopreparado de cada hongo como se muestra en la Tabla 7, para luego realizar la dosificación que se usa en los tratamientos de campo.

Tabla 7. Concentración de conidios en los biopreparados

Microorganismos	Concentración de conidios/ml
TC	2.58*10 ⁹ conidios/ml
TN4	1.7*10 ⁹ conidios/ml
FS3	1.9*10 ⁹ conidios/ml

Tabla 7. Conteo final de conidios en cada biopreparado realizado en la cámara de Neubauer

Efecto protector de las cepas TN4 y TC en condiciones de campo abierto

En este proceso para realizar la comparación de la cepa nativa TN4 y la cepa comercial TC en un cultivo de lechuga a campo abierto, se empleó un diseño en bloques completamente al azar. Para este estudio se tuvo en cuenta la incidencia como variable fitosanitaria

Incidencia

En la figura 19, el porcentaje de incidencia de la enfermedad causada por *Fusarium spp.*, varían en los diferentes tratamientos. T7 con un promedio de 69,3233 % siendo este el mas alto porcentaje de incidencia de la enfermedad y continúan T8 con 38,9800%, T6 con 23,6033%, T5 con 19,2600%, T3 con 19,1000% y T2 con 11,0000%, los cuales su incidencia fue significativa. Mientras que en los tratamientos T1 Y T4 no se presentó ningún porcentaje de incidencia de la enfermedad en las

hojas. Esto quiere decir que la concentración de $1 \cdot 10^7$ conidios/ml y $1 \cdot 10^5$ conidios/ml, tanto para la cepa TN4 y TC, presentaron una inhibición total de *Fusarium spp.*, en el cultivo de lechuga.

Figura 19. Porcentaje de incidencia en las hojas

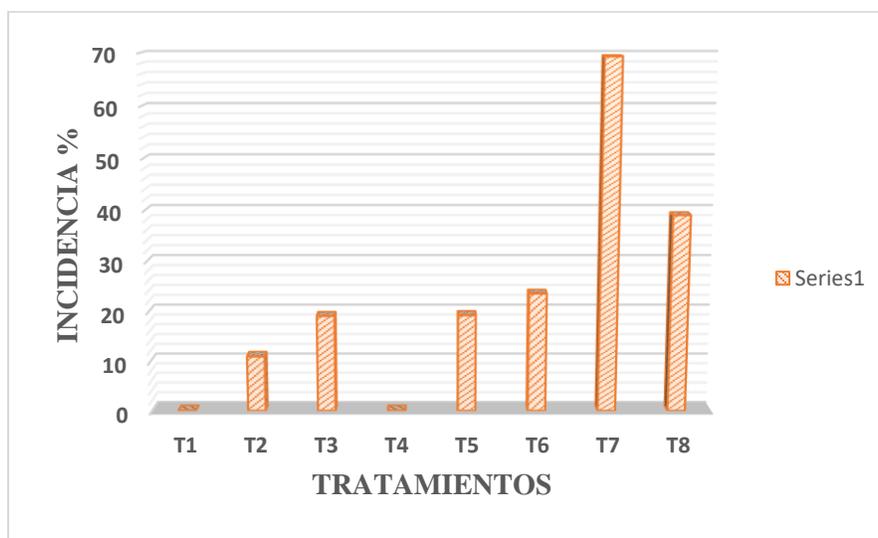


Figura 19. Registro de la Incidencia en % de las hojas. Fuente: Autor.

Al realizar el análisis de varianza ANOVA para comparar la incidencia en hojas, para los 8 tratamientos, se encontró que hay diferencia significativa con un P-valor (0,00) con un nivel de significancia del ,000%. (Tabla 8).

Tabla 8. Resultado de ANOVA, variable fitosanitaria incidencia

INCIDENCIA						
HSD Tukey ^a						
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
T1	3	,0000				
T4	3	,0000				
T2	3		11,0000			
T3	3			19,1000		

T5	3			19,2600			
T6	3				23,6033		
T8	3					38,9800	
T7	3						69,3233
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Tabla 8. Incidencia producida por la enfermedad *Fusarium spp.*, en las hojas.

En la Tabla 8, los resultados de ANOVA del porcentaje de incidencia en las hojas bajo los 8 tratamientos se aprecian 6 grupos, donde comienza T1 y T4 que no presentan ningún porcentaje de severidad formando así el primer grupo, continua T2 con una severidad de 11,0000% quien forma el grupo 2, seguido T3 y T5 quienes forman el grupo 3 con un porcentaje de 19,1000% y 19,2600% de severidad, el grupo cuatro y cinco está formado por T6 con 23,6033% y T8 con 38,9800% de severidad y por último se encuentra T7 con el mayor porcentaje con 69,3233% de severidad.

Capítulo V

Conclusiones

Todas las cepas estudiadas TN1, TN2, TN3 y TN4, tienen un efecto antagónico in vitro, ya que lograron inhibir el crecimiento del fitopatógeno. La cepa nativa TN4 aislada del mismo cultivo presentó una mayor velocidad en la competencia por espacio y nutrientes.

La prospección en campo de lechuga en el colegio Normal Superior de Pamplona permitió la obtención de cuatro cepas de *Trichoderma spp.*, que fueron incorporadas al banco de cepas de *T. spp.*, de la Universidad de Pamplona.

Las cepas TN4 y TC a una concentración de $1 \cdot 10^7$ y $1 \cdot 10^5$ conidios/ml, ejercen un papel protector similar sobre el cultivo de lechuga en cuanto a la incidencia de los síntomas de la enfermedad causada por el fitopatógeno *Fusarium spp.*

Se logró evidenciar que la cepa de los fitopatógenos evaluados que ejerció mayor competencia frente a los antagonistas de *Trichoderma spp.*, fue FS3 haciendo que se efectuara una alta velocidad de crecimiento y competencia de espacio por parte de *Trichoderma spp.*

La cepa nativa de *Trichoderma spp.*, TN4 tiene un mayor efecto antagónico en campo y in vitro en comparación con la cepa de *Trichoderma* comercial TC.

Recomendaciones

Realizar una caracterización genotípica para identificar taxonómicamente las cepas nativas a nivel de especie.

Aumentar en el municipio de Pamplona el uso del antagonista *Trichoderma spp.*, en los cultivos de lechuga y de esta manera observar el potencial estimulante y antagónico que posee esta cepa.

Fomentar el uso de sustratos de fácil y bajo precio, (cascarilla de arroz, café residuos de cosecha para la producción artesanal de *Trichoderma spp.*

Emplear prácticas de limpieza y desinfección de maquinaria con el fin de que estos no sirvan como focos de patógenos.

Referencias bibliográficas.

- Abdelgale, S., Badawy, M., Mahmoud, N. F., & Marei, A.-S. M. (2019). Acaricidal activity, biochemical effects and molecular docking of some monoterpenes against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). *Elsevier*, 156, pp. 105-115.
- Achicanoy , H. (2001). Estrategias integradas para el control de enfermedades de las plantas. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín*, 54, pp.1251-1273.
- Agamez , E., Barrera , J., & Oviedo, L. (2009). Evaluación del antagonismo y multiplicación de trichoderma sp. en sustrato de plátano en medio líquido estático. *Acta Biológica Colombiana*, 14(3), pp. 61-70.
- Agruco-Compas. (2010). *Desarrollo Endógeno (no. 15 2010)*. Cochabamba: Agruco-Compas .
- Albarracín, D. M. (2019). Elaboración de biocompostaje y su influencia en cultivos de *Lactuca sativa* L (LECHUGA), *Beta vulgaris* variedad cicla (ACELGA) y *Apium graveolens* var. Dulce (APIO ESPAÑA). *Trabajo de de grado para optar el título de Magister en Biología Molecular y Biotecnología*, Universidad de Pamplona. Pamplona, Colombia.
- Arévalo, E., Cayotopa, J., Olivera, D., Gárate, M., Trigoso, E., Costa, d., & Leon, B. (2017). Optimización de sustratos para la producción de conidias de *Trichoderma harzianum*. Por fermentación sólida en la región de San Martín. Perú. *Rev. Investig. Altoandin*, 19(2), pp. 135-144.
- Avila, E. P. (2015). Manual Lechuga. *Camara de Comercio de Bogotá*, 7–54.
<https://bibliotecadigital.ccb.org.co/bitstream/handle/11520/14316/Lechuga.pdf?seque>
- Bary, D., El, R., & Bary, L. De. (2007). Evaluación de tres métodos de control del Moho blanco (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.). *Agronomía*

Colombiana, 25(1), 131–141.

- Batta, Y., 2004. Postharvest biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in an invert emulsion. *Crop Protection* 23(1): 19-26.
- Beltrán, M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(1), 101-113
- Benitez, S., & González, L. (2003). Aceleración de procesos de compostaje utilizando *Azotobacte*, *Azospirillum*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Trichoderma harzianum*. Disertación previa a la obtención del título de Licenciado en Microbiología Clínica y aplicada. Quito, Ecuador: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- Cámara de Comercio. (2015). Manual del cultivo de lechuga. Obtenido de <https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CUL>
- Campbell, R. (1989). *Biological control of microbial plant pathogens*. Cambridge University Press. New York. Usa 218p.
- Cárdenas Pardo, N. J., Darghan, A., Sosa Rico, M. D., & Rodriguez, A. (2017). Análisis espacial de la incidencia de enfermedades en diferentes genotipos de cacao (*Theobroma cacao* L.) en El Yopal (Casanare), Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 22(2), pp. 209-220.
- Castro R. 2007. Unidad de producción de microorganismos antagonistas y entomopatógenos. Departamenteo de sanidad vegetal. Espoch. Riobamba Ecuador.
- Chavez, M. P. (2006). Producción de *Trichoderma spp.* y Evaluación de su Efecto en Cultivo de Crisantemo (*Dentranthema grandiflora*). *Tesis de Pregado, Pontificia Univeridad Javeriana*. Bogotá, Colombia.
- Cooman. (2000). Suelos, fertilización y riego. Recuperado el 1 de mayo de 2017, de Manual de produccion de lechuga lisa bajo invernadero: <https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20LA%20LECHUGA.pdf>

- Danay Infante*, B. Martínez*, N. G. y Y. R. (2009). MECANISMOS DE ACCIÓN DE *Trichoderma* FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS. *Estudios De Asia Y África*, 24(2), 14–21.
- Diana.Vinchira-Villarraga & Nubia Moreno-Sarmiento. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XXI.
- Denmark, H. A. (2011). Cyclamen Mite, *Phytonemus pallidus* (Banks) (Arachnida: Acari: Tarsonemidae). *Entomology and Nematology Department, Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida*. 4 p. Obtenido de <https://edis.ifas.ufl.edu/pdffiles/IN/IN33500.pdf>
- Durán, O. (28 de septiembre de 2017). Uso de registros en evaluación de incidencia y severidad de plagas. *Uso de registros en evaluación de incidencia y severidad de plagas*, 42. Pamplona, Norte de Santander, Colombia: Universidad de Pamplona. Recuperado el 11 de agosto de 2018 an.
- Vinchira-Villarraga & Nubia Moreno-Sarmiento. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna. *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. XXI.
- Elad , Y., Chet, I., & Katan, J. (1980). *Trichoderma harzianum*: A Biocontrol Agent Effective Against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 70(N. 2), pp. 119-121.
- Eraso, C., Acosta, J., Salazar, C., & Betancourth, C. (2014). Evaluación de cepas de *Trichoderma* spp. para el manejo del amarillamiento de arveja causado por *Fusarium oxysporum*. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 15(2), pp. 237-249
- Eroski. (2009). La Lechuga. *Escuelas Idea Sana Eroski*, 21. http://ideasana.fundacioneroski.es/web/es/13/escuela_5/escuela5_lechuga.pdf
- Estrada, G. I., & Ramírez , M. C. (2019). *Micología general*. Manizales: Universidad Católica de Manizales. Obtenido de Obtenido de http://www.ucm.edu.co/wp-content/uploads/libros/Micologia_general.pdf

Felipe, R. A. (2003). Tipificación del daño de *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) en plantas de pimentón cv. California Wonder. *Trabajo de Grado. Unidad Centroccidental Lisandro Alvarado*. Barquisimeto , Estado Lara, Venezuela. 33 P.

Fernandez , J. S. (2019). Evaluación de repelentes para control de Thrips (*Frankliniella occidentalis*) en el cultivo de rosa bajo invernadero en la finca hosa Providencia – Madrid, Cundinamarca. [*Trabajo de grado Ingeniería Agronómica*] *Universidad de Cundinamarca*. Facatativá .

Fernández , R., Trapero, A., & Domínguez, J. (2011). *Experimentación en agricultura*. Sevilla: Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Obtenido de <https://www.juntadeandalucia.es/export/drupaljda/1337160941EXPERIMENTACION.pdf>

Fernández Barbosa, R. J., & Suárez Meza, C. L. (2009). Antagonismo in vitro de *Trichoderma Harzianum* Rifai sobre *Fusarium Oxisporum* Schlecht f. sp *passiflorae* en maracuyá (*Passiflora edulis* Sims var. *Flavicarpa*) del Municipio zona bananera de Colombia. *Rev.Fac.Nal.Agr.Medellin*, 62(1), pp.4743-4748.

Flórez, E., González, G., Pulido, S., & Salamanca, H. (2012). Cultivos de hortalizas. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores. Recuperado el 1 de mayo de 2017, de Cultivos de hortalizas. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores: <https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20LA%20LECHUGA.pdf>

García Pinilla, A. M. (2017). Uniminuto. (Uniminuto, Ed.) Recuperado el 17 de abril de 2018, de Uniminuto-tesis-ingeniería: <https://www.google.com.co/#>

García, L. (junio de 2015). evaluación del antagonismo de cepas de *Trichoderma spp.* Frente a cepas de *Fusarium spp.* Y *Colletotrichum spp.* Aisladas de cultivos orgánicos de Sábila (*Aloe*

- vera) y Arándano (*Vaccinium corymbosum*). *Tecken*, 1, 56-66. Recuperado el 2018 de agosto de 20.
- Geilfus, F. (2009). *80 herramientas para el desarrollo participativo: diagnóstico, planificación, monitoreo, evaluación*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 2002, San José, Costa Rica.
- Gepp, V. (08 de 2009). *Fagro. Curso de Fitopatología*. Obtenido de http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/cursos/fitopato/practicass/Clave_hongos.pdf
- Gómez, J. A., Picazo, A., & Martínez, E. R. (2008). Agricultura, desarrollo rural y sostenibilidad medioambiental. *CIRIEC-España N° 61*, pp.103-126.
- Hernández, D. J., Ferrera, R., & Alarcón, A. (2019). *Trichoderma*: agricultural and biotechnological importance, and fermentation systems for producing biomass and enzymes of industrial interest. *Chilean J. Agric. Anim. Sci., ex Agro-Ciencia*, 35(1), pp. 98-112.
- Hesperia. (2011). La agricultura sostenible. En *Guía comunitaria para la salud ambiental* (págs. 278-317). Obtenido de http://hesperian.org/wp-content/uploads/pdf/es_cgeh_2011/es_cgeh_2011_cap15.pdf
- Hincapié Echeverri, O., Saldarriaga Cardona, A., & Díaz Diez, C. (21 de diciembre de 2017). Alternativas biológicas, botánicas y químicas para el control de enfermedades en el cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth). *Facultad Nacional de Agronomía*, 70(2), 8169- 8176. doi:10.15446/rfna.v70n264521
- Instituto Internacional de Cooperación para la Agricultura. (29 de Enero de 2016). Perspectivas de la Agricultura y del Desarrollo Rural de las Américas: Una mirada hacia América Latina y el Caribe 2015-2016. Recuperado el 7 de Agosto de 2018, de Repositorio IICA: <http://opackoha.iica.int/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=67>
- Intagri. (2016). *Trichoderma Control de Hongos Fitopatógenos. Artículos Técnicos de Intagri*. <https://www.intagri.com/articulos/fitosanidad/trichoderma-control-de-hongos-fitopatogenos>

Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.*, 24(1), pp.14-21.

Jaramilo, J., & et al. (2016). Modelo tecnológico para el cultivo de lechuga bajo buenas prácticas de agrícolas en el oriente antioqueño. (A. F. Montoya, Ed.) Medellín, Antioquia, Colombia.

Recuperado el 01 de mayo de 2017, de

<https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20LA%20LECHUGA.pdf>

Jiménez Paneque, R. (1998). *Metodología de la investigación elementos básicos para la investigación clínica*. la habana: Ciencias Médicas.

., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.*, 24(1), pp.14-21.

Lee, R., & Escobar, H. (2000). Manual de lechuga bajo invernadero. Chía, Cundinamarca, Colombia. Recuperado el 17 de agosto de 2018, de

<https://conectarural.org/sitio/sites/default/files/documentos/MANUAL%20DEL%20CULTIVO%20DE%20LA%20LECHUGA.pdf>

Manayay, C., Córdoba, L., García, J., & Vásquez, J. (2016). Efecto antagónico de una cepa de *Trichoderma sp* sobre *Fusarium sp*. En planta de tomate Río Grande (*Solanum lycopersicum*). UCV-HACER, 5(1), 1-8. Recuperado el 20 de agosto de 2018, de <http://www.redalyc.org/service/redalyc/downloadPdf/5217/521753139008/7>

Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), pp. 1-11.

Martínez, C. (2019). Responsabilidad social universitaria, transferencia tecnológica y desarrollo endógeno. Estrategias de vinculación comunitaria. *Revista Latinoamericana de Difusión Científica*, 1(1), pp.55-67.

Mosquera, J. (2006). Arquitectura y Desarrollo. Revista Científica UNET. Vol.18 (2), ISBN 1316-869X11C San Cristóbal, Venezuela. pp. 47-56

- Mosquera, J., y Suarez, S. (2008). Mapa Cultural Digital para Pamplona, en “Paisaje e Itinerarios Culturales como estrategias para el desarrollo”. Compilación María Isabel Tello. ISBN 978-958-44-4415-8. Segundo Encuentro Internacional de Restauradores Sin Fronteras A-RSF. Escala S.A. Bogotá, pp. 135-141
- Morales, L. A., Andrade, P., Valencia, M. A., & Romero, O. (2020). Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Mexican Journal of Phytopathology*, 38(3), pp 434-449.
- Murruga Juárez, M. N., Gutiérrez Tolentino, R., Vega y León, S., Pérez González, J. J., Schettino Bermúdez, B., Ruíz Rojas, J. L., & Yamazaki Maza, A. (2017). Presencia de plaguicidas organoclorados en forraje para ganado en unidades de producción de leche orgánica en Tecpatán, Chiapas. *Mex Cienc Pecu*, 8(2), 157-166.
- Nava, E., García, C., Camacho, J. R., & Vázquez, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3b), pp. 17-29.
- Nugra, A. N. (2018). Evaluación de Sustratos Orgánicos para la Propación de trichoderma spp. *Trabajo de pregrado, Universidad Politécnica Salesiana*. Cuenca, Ecuador.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO]. (2014). *Agricultura Familiar en América Latina y el Caribe*. Santiago, Chile. Obtenido de E-ISBN 978-92-5-308364-0
- Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura [UNESCO]. (2012). *Educación para el Desarrollo Sostenible, libro de consultas*. 7, place de Fontenoy, 75352 París 07 SP, Francia.
- Ríos, E. L. V. (2014). Caracteres principales, ventajas y beneficios agrícolas que aporta el uso de *Trichoderma* como control biológico. *Research Policy*, 9(2), 155–162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.respol.2011.09.003> <https://doi.org/10.1016/j.worlddev.2020.104995> <http://dx.doi.org/10.1016/j.worlddev.2009.12.011> <http://publicaciones.eafit.edu.co/index.php/ecoseconomia/article/view/1969/1978> <https://doi.org/10.1016>

Parra , D. M. (2018). Evaluación del antagonista *Trichoderma spp.*, contra enfermedades radiculares de *Lactuca sativa L. var. Inybasea (Hort)* y *Capitata L.*, en el municipio de Pamplona. *Tesis de Pregrado, Universidad de Pamplona*. Pamplona, Colombia.

Pineda , J. A., Benavides , E. N., Duarte , A. S., Burgos , C. A., Soto, C. P., Pineda , C. A., . . .

Álvarez , S. E. (2017). Producción de biopreparados de *Trichoderma spp.*: una revisión.

ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar, 51(1), pp. 47-52.

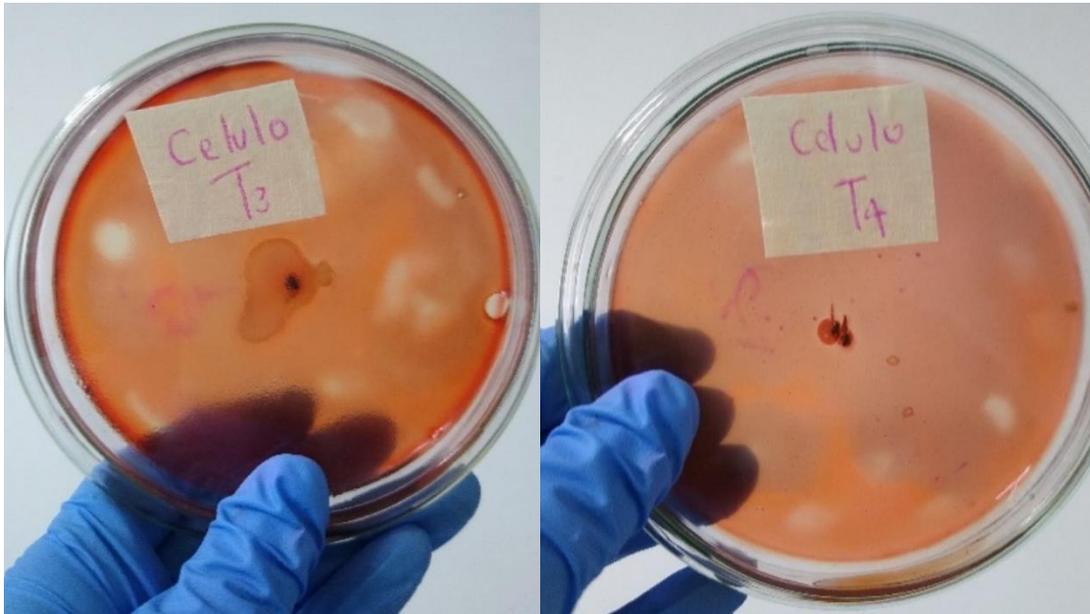
doi:file:///D:/Users/Usuario/Downloads/ProduccindebiopreparadosdeTrichodermaspp.pdf

Segura Morilla, A. (2017) Optimización y puesta a punto de métodos para la determinación de plaguicidas organoclorados mediante técnicas cromatográficas. Automatización de métodos. Universidad de Alicante

Villamizar, E. (2008). Aproximación al desarrollo endógeno de pamplona, *Revista Face* 10, 179–201.

Apéndice

Apéndice A Pruebas bioquímicas de los hongos

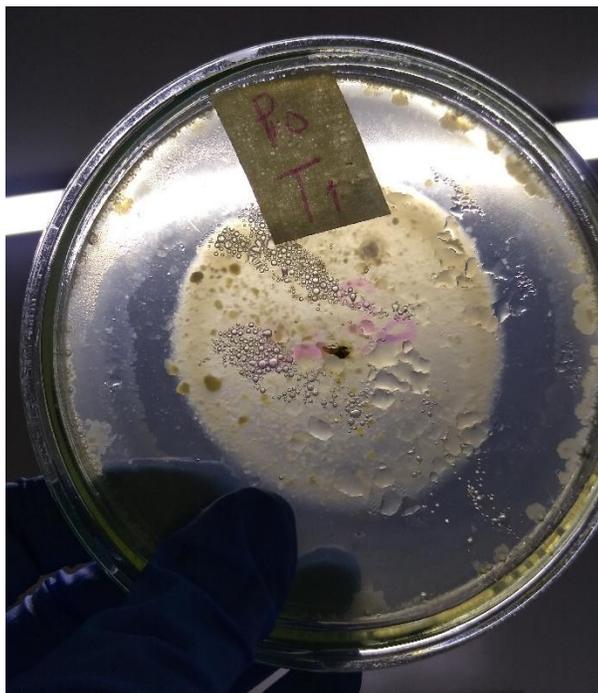


Prueba de celulasas en el medio CMC tras 10 días de incubación a 25°C. Resultado positivo evidenciado por la presencia de un área de aclaramiento alrededor del crecimiento fúngico

Apéndice B pruebas bioquímicas en tubo, resultado positivo evidencia color morado.



Apéndice C prueba tras 10 días de incubación a 25°C



Apéndice D Tabla de ANOVAS; Patógeno FS1 frente a los Antagonistas de *Trichoderma Spp.*, TN1, TN2, TN3, TN4, y TC

ANOVA					
CRECIMIENTO MICELIAR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3762,527	4	940,632	8,065	,000
Dentro de grupos	7581,025	65	116,631		
Total	11343,552	69			

Apéndice E Tabla de ANOVAS; Patógeno FS2 frente a los Antagonistas de *Trichoderma Spp.*, TN1, TN2, TN3, TN4, y TC

ANOVA					
CRECIMIENTO MICELIAR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.

Entre grupos	8690,917	4	2172,729	7,557	,000
Dentro de grupos	18688,118	65	287,510		
Total	27379,034	69			

Apéndice F Tabla de ANOVAS; Patógeno FS1 frente a los Antagonistas de *Trichoderma Spp.*, TN1, TN2, TN3, TN4, y TC

ANOVA					
CRECIMIENTO MICELIAR					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1902,877	4	475,719	4,785	,002
Dentro de grupos	6461,748	65	99,412		
Total	8364,625	69			

Apéndice G. Actividad de Campo, preparación del terreno



Apéndice H. *L. sativa L. var. Capitata L*, Lista para ser comercializada.

