



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE RECURSOS NATURALES

CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL

**“CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS
BIOCONTROLADORES DE *TRICHODERMA SPP* Y
EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR EN *ALISO* (*Alnus
acuminata* Kunth) EN VIVERO”**

TRABAJO DE TITULACIÓN

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PARA TITULACIÓN DE GRADO

PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL TÍTULO DE INGENIERO FORESTAL

JUAN LUIS GUERRA BUENAÑO

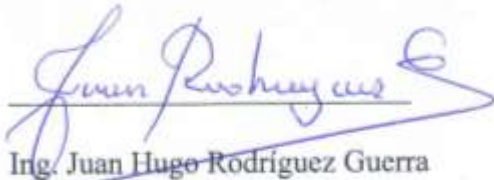
RIOBAMBA – ECUADOR

2019

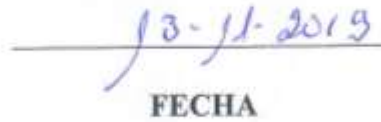
HOJA DE CERTIFICACIÓN

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA, que el trabajo de investigación titulado: "CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS BIOCONTROLADORES DE TRICHODERMA SPP Y EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR EN ALISO (*Alnus acuminata* Kunth) EN VIVERO" de responsabilidad del señor Juan Luis Guerra Buenaño, ha sido prolijamente revisado, quedando autorizada su presentación.

TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN


Ing. Juan Hugo Rodríguez Guerra

DIRECTOR


FECHA


Ing. Daniel Arturo Román Robalino

ASESOR


FECHA

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Juan Luis Guerra Buenaño, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales. Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor, asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.



Juan Luis Guerra Buenaño

1724514243

AUTORÍA

La autoría del presente trabajo investigativo es de propiedad intelectual del autor y de la carrera de Ingeniería Forestal de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



Juan Luis Guerra Buenaño

1724514243

DEDICATORIA

A mi padre Wilmo Guerra que desde el cielo guía mi camino, sus consejos han servido para sobrellevar muchos problemas que nos depara la vida, a mi madre Lorena que es una verdadera guerrera, que ha sabido apoyarme en todo momento, ella ha sido el pilar fundamental para poder cumplir con esta meta. Sin duda los mejores padres del mundo.

A mis hermanos Gerardo, Yulisa y Angeles que siempre han estado prestos para brindarme su apoyo, en especial mi hermano con quien a pesar de nuestras diferencias tuvimos que aprender a compartir y convivir juntos, han sido 5 años en los cuales hubo de todo pero siempre logramos salir adelante juntos.

A mi esposa Valeria y a mi preciosa hija Emily sin duda ahora ellas son mi motor para seguir adelante con mis proyectos y metas, a pesar de los difíciles momentos Dios nunca nos desamparó y nos mantuvo unidos como la familia que somos.

A mis tías y tíos porque siempre tuvieron las palabras de aliento y fuerzas para que no desfalleciera en este duro caminar

Decirles que este logro es tan suyo como mío y que es el primero de muchos más.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por la vida y por guiarme durante el camino hacia este sueño.

A mis padres Wilmo y Lorena porque desde muy temprana edad me enseñaron que con disciplina y carácter se puede lograr todas nuestras metas, y que a pesar de las diferencias económicas el querer es poder.

A mis maestros, por sus enseñanzas para desarrollarme profesionalmente, en especial al Dr. Michel Leiva, al Ing. Danilo Román e Ing. Hugo Rodriguez quienes supieron direccionarme en mi investigación y así poder culminarla.

Al Ing Alvaro Rivera por todo su apoyo y paciencia durante el periodo de investigación y por compartir sus conocimientos que me fueron de gran ayuda en la misma, al Ing. Fernando Rivas por permitirme trabajar en el laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales.

Al Ing. Manolo Espinoza y a la Ing. Mayra Bastidas quienes me colaboraron en las salidas de campo para la recolección de muestra, mis sinceros agradecimientos por su predisposición y espíritu de colaboración.

A los propietarios de los diferentes viveros forestales que se encuentran dentro de la provincia de Chimborazo por su apertura y acogida además por ayudarnos con la información requerida y muestras solicitadas.

A mis amigos, y compañeros por hacer de mi vida universitaria la mejor etapa de mi vida, pero especialmente a Dayana Ortiz, Esteban Toaza y Jimmy Arias quienes me demostraron que el verdadero valor de la amistad no está determinado por los años, más bien por las situaciones de apoyo y predisposición en los momentos donde crees estar solo.

Finalmente quiero agradecer a todos quienes con sus consejos me motivaron a terminar mi profesión.

TABLA DE CONTENIDO

I. “CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS BIOCONTROLADORES DE <i>TRICHODERMA SPP</i> Y EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR EN <i>ALISO</i> (<i>Alnus acuminata</i> Kunth) EN VIVERO”	1
II. INTRODUCCION	1
A. JUSTIFICACION	2
B. OBJETIVOS	3
1. Objetivo General	3
2. Objetivos Específicos	3
III. HIPOTESIS	4
1. Hipótesis nula – H0	4
2. Hipótesis alternante –H1	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	5
A. ALISO	5
1. Origen	5
2. Distribución mundial	5
3. Distribución en el Ecuador	6
4. Taxonomía	6
5. Condiciones Bioclimáticas	7
6. Sistemas de Producción	9
7. Importancia	10
8. Problemas Fitosanitarios	11
a. Plagas	11
b. Enfermedades	12
B. PATOGENOS	13
1. Fúngicos	13
a. Phytium	14
b. Phytophthora	15
c. Fusarium	16
d. Rhizoctonia	17
2. Aislamiento de hongos	18
a. Cámara Húmeda	18
b. Inclusión de fragmentos	18
3. Medio de cultivo	19

4.	Caracterización de Patógenos fúngicos.....	19
a.	Caracterización Cultural.....	19
b.	Características Morfológicas.....	20
c.	Caracterización Molecular.....	20
d.	Técnica de microcultivo.....	21
C.	TRICHODERMA.....	22
1.	Generalidades.....	22
2.	Taxonomía.....	22
3.	Mecanismos de acción de trichoderma.....	23
a.	Competencia.....	23
b.	Micoparasitismo.....	24
c.	Antibiosis.....	25
d.	Producción de enzimas.....	26
e.	Inducción de resistencia.....	26
f.	Mecanismo Promotores de Crecimiento.....	27
4.	Importancia industrial de <i>Trichoderma</i>	28
V.	MATERIALES Y METODOS.....	29
A.	CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR.....	29
B.	MATERIALES.....	29
a.	Materiales de campo.....	29
b.	Equipos de campo.....	29
c.	Materiales de laboratorio.....	29
d.	Equipos de laboratorio.....	29
e.	Materiales de oficina.....	30
f.	Reactivos e insumos.....	30
C.	METODOLOGIA.....	30
1.	AISLAMIENTO DE HONGOS.....	30
a.	Ubicación del área de estudio.....	30
b.	Muestreo y etiquetado.....	31
c.	Procesamiento.....	32
d.	Selección de fragmentos.....	32
e.	Siembra en medio Agar.....	32
f.	Siembra en medio PDA.....	33
g.	Cultivo monospórico.....	33
2.	Conservación de Aislados.....	33
a.	Criopreservación.....	33

b.	Conservación en PDA.....	33
3.	Caracterización de los aislados fúngicos.....	34
a.	Caracterización Cultural.	34
b.	Caracterización Morfológica.....	34
4.	Evaluación del crecimiento radial de los aislados fúngicos.	34
5.	Evaluación de mecanismos biocontroladores	35
a.	Inhibición de Crecimiento.....	35
VI.	RESULTADOS Y DISCUSION	36
A.	PROCESO DE AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS	36
1.	Cepas aisladas.....	36
2.	Cepas Conservadas	38
B.	PROCESO DE CARACTERIZACION DE AISLADOS FUNGICOS.	39
1.	Caracterización Cultural y Morfológica de los aislados fúngicos.	39
a.	Vivero Ceas	39
b.	Vivero Videfor	44
c.	Vivero Plantas.....	50
d.	Vivero Totorillas.....	55
e.	Vivero Villagómez	62
2.	Caracterización molecular de los aislados	70
C.	EVALUACION DEL CRECIMIENTO RADIAL DE LOS AISLADOS FUNGICOS.	
	73	
D.	EVALUACION DEL EFECTO PROTECTOR DEL MECANISMO DE INHIBICION DE CRECIMIENTO.	75
VII.	CONCLUSIONES	76
VIII.	RECOMENDACIONES	76
IX.	RESUMEN.....	76
X.	SUMMARY	76
XI.	BIBLIOGRAFÍA	80
XII.	ANEXOS.....	88

Índice de Gráficos

Gráfico 1. Ubicación del área de estudio.	31
Gráfico 2. Cepas monospóricas aisladas del total de muestras recolectadas.	36
Gráfico 3. Aislados monospóricos por Vivero.	37
Gráfico 4. Cepas de aislados monospóricos conservados.	38
Gráfico 5. Cepas identificadas molecularmente.	72
Gráfico 6. Evaluación de la velocidad de crecimiento.	74

Índice de Tablas

Tabla 1. Codificación de las muestras de campo.	31
Tabla 2. Códigos de aislados monospóricos.	37
Tabla 3. Resultados de los análisis moleculares de los aislados fúngicos obtenidos. ...	70
Tabla 4. Crecimiento micelial (mm.d-1) de cepas de hongos fitopatógenos Aliso- viveros.	73
Tabla 5. Crecimiento micelial (mm.d-1) de cepas de <i>Trichoderma</i> sp.	74
Tabla 6. Conformación de los tratamientos.	75
Tabla 7. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento T4.	75
Tabla 8. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento T5.	76

Índice de Fotografías

Fotografía 1. Aislado MC1 (A) anverso y (B) reverso.	39
Fotografía 2. Aislado MC1 Microcultivo observado al microscopio. A, B y D lente de 40X y C lente de 100X.	39
Fotografía 3. Aislado MC3 (A) anverso y (B) reverso.	40
Fotografía 4. Aislado MC3 Microcultivo observado al microscopio. A y B lente de 40X, C y D lente de 100X.	41
Fotografía 5. Aislado MC5 (A) anverso y (B) reverso.	42
Fotografía 6. Aislado MC5 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X y B, C y D lente de 40X.	42
Fotografía 7. Aislado MC8 (A) anverso, y (B) reverso.	43
Fotografía 8. Aislado MC8 Microcultivo observado al microscopio. A lente de 10X, B, C y D lente de 40X.	43
Fotografía 9. Aislado MD1 (A) anverso, y (B) reverso.	44

Fotografía 10. Aislado MD1 Microcultivo observado al microscopio. A y B lente de 40X, C y D lente de 100X.....	45
Fotografía 11. Aislado MD2 (A) anverso y (B) reverso.	46
Fotografía 12. Aislado MD2. Microcultivo observado al microscopio. A y B lente de 40X.....	46
Fotografía 13. Aislado MD3 (A) anverso y (B) reverso.	47
Fotografía 14. Aislado MD3 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X y B, C y D lente de 40X.	47
Fotografía 15. Aislado MD5 (A) anverso y (B) reverso.	48
Fotografía 16. Aislado MD5 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X y B, C y D lente de 40X.	48
Fotografía 17. Aislado MD6 (A) anverso y (B) reverso.	49
Fotografía 18. Aislado MD6 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X B y C lente de 40X y D lente de 100X.....	50
Fotografía 19. Aislado P3A, (A) anverso y (B) reverso al 3 día.	51
Fotografía 20. Aislado P3A, (C) anverso, y (D) reverso al 7 día.....	51
Fotografía 21. Aislado P3A microscopio	51
Fotografía 22. Aislado P3B, (A) anverso y (B) reverso al 3 día.	52
Fotografía 23. Aislado P3B, (C) anverso, y (D) reverso al 7 día.	52
Fotografía 24. Aislado P3B microscopio.	53
Fotografía 25. Aislado MP6, (A) anverso y (B) reverso.	53
Fotografía 26. Aislado MP6 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X B y C lente de 40X y D lente de 100X.....	54
Fotografía 27. Aislado MP10, (A) anverso y (B) reverso.	54
Fotografía 28. Aislado MP10 Microcultivo observado al microscopio en lente 40X...	55
Fotografía 29. Aislado MT2, (A) anverso y (B) reverso.	56
Fotografía 30. Aislado MT2 Microcultivo observado al microscopio en lente 40X. ...	56
Fotografía 31. Aislado MT5, (A) anverso, y (B) reverso.....	57
Fotografía 32. Aislado MT5. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D con el lente 100X.....	57
Fotografía 33. Aislado MT6, (A) anverso y (B) reverso.	58
Fotografía 34. Aislado MT6. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D el lente 100X.	58
Fotografía 35. Aislado MT8, (A) anverso y (B) reverso.....	59

Fotografía 36. Aislado MT8 Microscopio.....	59
Fotografía 37. Aislado MT8, (A) anverso y (B) reverso.	60
Fotografía 38. Aislado MT9. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D el lente 100X.	60
Fotografía 39. Aislado MT10, (A) anverso y (B) reverso.	61
Fotografía 40. Aislado MT10. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D el lente 100X.	61
Fotografía 41. Aislado MV2, (A) anverso y (B) reverso.	62
Fotografía 42. Aislado MV2. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 10X y C y D el lente 40X.	63
Fotografía 43. Aislado MV3, (A) anverso y (B) reverso.	64
Fotografía 44. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio en lente A, B, C y D con lente 40X.	64
Fotografía 45. Aislado MV4, (A) anverso y (B) reverso.	65
Fotografía 46. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio A y B, lente 40 X C y D con lente 100X.	65
Fotografía 47. Aislado MV5, (A) anverso y (B) reverso.	66
Fotografía 48. Aislado MV5. Microcultivo observado al microscopio A y B, lente 40 X C y D con lente 100X.	66
Fotografía 49. Aislado MV8, (A) anverso y (B) reverso.	67
Fotografía 50. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio en lente A, B, C y D con lente 40X.	68
Fotografía 51. Aislado MV10, (A) anverso y (B) reverso.	69
Fotografía 52. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio A y B, lente 40X, C y D con lente 100X.	69

Índice de Anexos

Anexo 1. Permiso de Investigación del Ministerio del Ambiente de Chimborazo.	88
Anexo 2. Recolección de muestras en vivero.	90
Anexo 3. Procesamiento de las muestras.	90
Anexo 4. Aislamiento por inclusión de fragmentos en medio de cultivo Agar.	91
Anexo 5. Repique de aislados para purificación.	91
Anexo 6. Cultivo monospórico.	92
Anexo 7. Aislados monospóricos	92
Anexo 8. Conservación de aislados en cajas Petri con medio PDA.	93
Anexo 9. Aislados conservados en Glicerol para refrigeración.	93
Anexo 10. Elaboración de microcultivo.	94
Anexo 11. Microcultivo bajo microscopio para identificación morfológica.	94
Anexo 12. Muestras enviadas para análisis molecular.	95
Anexo 13. Evaluación de crecimiento radial.	95
Anexo 14. Evaluación de la Inhibición de Crecimiento.	96
Anexo 15. Limpieza y adecuación del laboratorio y materiales del Proyecto.	97
Anexo 16. Limpieza de cristalería.	97
Anexo 17. Cajas de Petri en Incubación.	98
Anexo 18. Desinfección de cámara de flujo laminar.	98
Anexo 19. Clave de colores para la caracterización cultural.	99

I. “CARACTERIZACIÓN DE MECANISMOS BIOCONTROLADORES DE TRICHODERMA SPP Y EVALUACIÓN DEL EFECTO PROTECTOR EN ALISO (*Alnus acuminata* Kunth) EN VIVERO”

II. INTRODUCCION

El aliso (*Alnus acuminata* Kunt), es una especie forestal que gracias a su rápido crecimiento, asociación con fijadores de nitrógeno, y ventajas ecológicas, tiene un enorme potencial entre las especies leñosas. Los alisos son árboles de uso múltiple y de rápido crecimiento en la zona de los bosques en donde juegan un papel importante en la protección de las cuencas hidrográficas, en el control de la erosión, al tiempo que son empleados en sistemas agroforestales (Bartholomaus, 1998).

Dentro del Plan Nacional de Restauración Forestal del Ministerio de Ambiente del Ecuador, se identificó a *Alnus acuminata* como la especie más representativa utilizada por los gobiernos autónomos parroquiales de las provincias de Chimborazo, Cotopaxi y Tungurahua para programas de Restauración Forestal (Caranqui, 2017).

Por otra parte alisos son bien conocidos por su afinidad con el agua. Su hábitat más típico son las orillas de los ríos y quebradas, los lugares pantanosos y sitios con suelo fértil y húmedo (Galeano, Rada & Morales, 2012).

La calidad de una planta la determina su capacidad para desarrollarse adecuadamente una vez plantada y condicionada por su origen genético y por las fases de producción, desde la colecta de semilla y la germinación hasta su establecimiento en una plantación, donde uno de los parámetros de mucha importancia evaluados es la sanidad y vigorosidad de la planta (Prieto & Saenz, 2011).

El manejo integrado de enfermedades es la forma más práctica y segura en semilleros y viveros de árboles. La detección temprana de enfermedades y el uso coordinado de diferentes técnicas de prevención y manejo integrado evita que los patógenos alcancen niveles que puedan causar daño económico. Las técnicas que se utilizan son preventivas, culturales, químicas y biológicas (Almodovar, 2005).

El control de los fitopatógenos se puede lograr biológicamente en forma total o parcial, mediante el uso de organismos biocontroladores antagonistas (que reducen la cantidad de inóculo, causan inhibición o lisis, es decir, muerte), y por lo general ocurre en la naturaleza. Los casos más conocidos de hiperparasitismo son el micoparasitismo, los

bacteriófagos y los hongos nematófagos (predación). El micoparásito del género *Trichoderma* particularmente la especie *T. harzianum*, es la alternativa de control biológico más importante en las enfermedades del suelo (rizoplana); igualmente los géneros *Gliocladium* y *Paecilomyces* se han reportado como antagonistas (Achicanoy, 2001).

A. JUSTIFICACION

El aliso es una de las especies con mayor importancia en la Sierra centro de nuestro país, es muy apreciado especialmente por ser una especie fijadora de nitrógeno, además de que sus hojas contienen gran cantidad de proteínas y pueden servir de forraje o para mejorar las características del suelo.

La falta de información relacionada a los agentes fitopatógenos del suelo que provocan la marchitez en Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) es sin duda alguna de mucha importancia para los viveristas de nuestra provincia, ya que son causales de daños económicos y reducción de la calidad de las plantas.

La protección al medio ambiente y el desarrollo humano sustentable van de la mano. Sin embargo, uno de los problemas importantes que se viven a nivel mundial es el uso excesivo e inadecuado de productos químicos que poseen propiedades tóxicas y de alta residualidad.

La alternativa al uso de estos productos es el Control biológico, mismo que desde hace varios años ha ido tomando mucha relevancia en este tema, ya que mediante el uso de organismos entomófagos especialmente de *Trichoderma* busca eliminar o reducir daños causados por agentes perjudiciales y con esto restablecer de alguna manera el perturbado equilibrio ecológico en el que nos encontramos.

Es necesario conocer la importancia del control biológico como un componente vital de la producción en viveros forestales, de manera sustentable y sostenible que preserve los recursos naturales y el ambiente mediante la utilización de microorganismos seleccionados por su alta eficiencia e inocuidad.

Con el desarrollo de este trabajo de investigación se dará a conocer los mecanismos de acción efectuados por *Trichoderma* para el control de agentes fúngicos en *Alnus acuminata Kunth*, como método para reducir el uso de sustancias químicas y disminuir la contaminación que se genera en los viveros forestales de nuestra provincia.

B. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Caracterizar los mecanismos biocontroladores de *Trichoderma spp* y evaluar el efecto protector en Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en vivero.

2. Objetivos Específicos

- a. Identificar los patógenos fúngicos causantes de la marchitez de las posturas de Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en 5 viveros forestales de la provincia chimborazo.
- b. Caracterizar los mecanismos de acción biocontroladora *in vitro* de *Trichoderma spp* asociados con la rizosfera de plantas de Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en condiciones de campo.

III. HIPOTESIS

1. Hipótesis nula – H0

No se dispone de aislados de *Trichoderma* a partir de la rizosfera de árboles de aliso en condiciones de campo, cuyos mecanismos de acción biocontroladora hayan sido caracterizados *in vitro* y en condiciones de vivero, lo cual limita el control biológico de la marchitez de posturas de esta especie.

2. Hipótesis alternante –H1

Se dispondrá de al menos un aislado de *Trichoderma* spp. con sus mecanismos de acción biocontroladora caracterizados *in vitro* y probados en condiciones de vivero.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

A. ALISO

1. Origen

Takhtajan (1969), consideró el subgénero *Clethropsis* el grupo más primitivo de *Alnus* y la hipótesis de que *Alnus* se originó de áreas subtropicales de Asia al sudoeste. Murai, (1964) sin embargo, sugirió que la sección *Japonicae* es el linaje más primitivo porque *A. inokumae* de esta sección tiene el número de cromosoma diploide más básico ($2n = 14$). Murai, (1964) colocó especies latinoamericanas junto con especie asiática en su sección *Japonicae* y sugirió que esta sección está estrechamente relacionada con la sección *Clethropsis*. Él hipotetizó que las especies latinoamericanas se deriva de las poblaciones que emigraron de Asia a través de Australia al sur de América antes de la separación de estos continentes. Las especies latinoamericanas (*A. acuminata* y *A. jorullensis*) están más estrechamente relacionados con el oeste de América del Norte especies (*A. rhombifolia* y *A. oblongifolia*), y juntos son hermanas del complejo circumpolar de *A. incana*.

Furlow (1979), por su parte expone que las especies latinoamericanas de *Alnus* emigraron de Asia a través del Puente de tierra de Bering y oeste de América del Norte. La ruta alternativa de migración entre Euroasia y América del Norte es el puente terrestre del Atlántico norte. Esta explicación concuerda con el registro fósil de *Alnus* en Euroasia (Budantsev, 1997) y Oeste de América del Norte (Manchester, 1999).

Estudios recientes han demostrado una fuerte conexión florística entre el mediterráneo, el Himalaya oriental y China occidental (Sun, 2002).

2. Distribución mundial.

El género *Alnus* (Betulaceae) tiene alrededor de 30 especies en el mundo. Que están distribuidos principalmente en los países más fríos del hemisferio norte, pero también se extiende a elevaciones más altas de Centro y Sur América a lo largo de los Andes hasta Perú, Bolivia y el norte de Argentina. Los alisos van desde arbustos hasta árboles de madera de valor como *A. rubra* en Norteamérica, *A. acuminata* y *A. jorullensis* en América Centro y Sur; y *A. glutinosa* en Europa (Holdridge, 1951).

Alnus acuminata H.B.K. (Aliso andino) es generalmente considerado para ser la única especie de *Alnus* en los Andes (Furlow, 1979). *A. acuminata* se distribuye desde el sur

México (latitud 17 N) al noroeste de Argentina (latitud 28 S). En zonas montañosas de centroamérica y los andes. En Ecuador y Perú, *A. acuminata* se distribuye desde 1500 msnm hasta 3400 msnm de elevación en bosque nuboso montano, donde la precipitación presenta rangos de 350mm a 3000mm anuales y temperaturas van de 4 a 27 °C (Furrow, 1979; Davis et al., 1997). Debido a su capacidad de fijación de nitrógeno y tolerancia a la luz, *A. acuminata* puede prosperar en casi todo tipo de suelos. Es una especie pionera después de la perturbación, y a menudo se encuentra a lo largo de laderas de barrancos y pequeñas arroyos. (Furrow, 1979).

3. Distribución en el Ecuador

Se estima que en el Ecuador existen aproximadamente cien mil hectáreas cubiertas con aliso, de las cuales la mayoría son rodales producto de la regeneración natural y un pequeño porcentaje por plantaciones agro-silvopastoriles (Rios, 2007).

El aliso se lo encuentra en toda la Sierra desde: Carchi hasta Loja, y en las estribaciones de las cordilleras hacia el Litoral y la Amazonía. Crece desde los 800 msnm, hasta los 3.500 msnm, el aliso no tolera las heladas o cambios bruscos de temperatura, por lo que las aberturas de las cordilleras hacia el Litoral y el Oriente, donde, debido al choque del aire cálido y húmedo del Litoral o de la Amazonía con el aire frío de las alturas de la Sierra, se observa la formación de mucha neblina, constituyéndose en el hábitat ideal para la especie (Rios, 2007) mientras que, (Palacio, 2011) menciona que el aliso “crece en bosques húmedos. En el occidente por arriba de los 900 m y en el lado oriental entre 1900 y hasta los 3500msnm. A menudo forma rodales puros sobre deslaves, taludes de carreteras y áreas disturbadas”.

4. Taxonomía

Taxonomia.	
Reino:	Plantae
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fagales
Familia:	Betulaceae
Género:	Alnus

Subgénero: Alnus
Especie: Alnus acuminata Kunth

Alnus acuminata fue descrita por Carl Sigismund Kunth y publicado en *Nova Genera et Species Plantarum* en 1817.

El nombre científico del “Aliso” con su género *Alnus*, proviene del latín *al* cerca y *lan* río, por crecer cerca de los ríos (Añazco, 1996).

5. Condiciones Bioclimáticas

Altitud

La altitud más baja de estas formaciones corresponde al bosque húmedo – Pre Montano, 800msnm cerca de Alluriquin (Pichincha), y la más alta al bosque húmedo – Montano, 3450msnm en sitio Chulte vía a San Isidro (Carchi) (Añazco, 1996).

Clima

Los tipos de clima donde se encuentra la especie son: frío y húmedo (altas montañas andinas), templada y húmedo (cuencas Interandinas), y templado y muy húmedo (estribaciones de cordilleras). La temperatura y la precipitación determinan la presencia del aliso. Galloway & Flores (1986) indican que en la sierra estos factores están en gran medida en función de altitud a mayor altitud más humedad y temperaturas más bajas (más problemas de heladas). Sin embargo la mayor concentración de los bosques de aliso se encuentra en las aberturas de las cordilleras hacia la costa y al oriente, donde, debido al choque del aire cálido y húmedo de la costa o amazonia con el aire frío de las alturas, se observa la formación de mucha neblina, constituyéndose en el hábitat ideal de la especie (Añazco, 1996).

Temperatura

En forma natural se encuentra en sitios con temperaturas promedio que oscilan entre 10 °C (San Isidro-Cañar) y 21°C (Tandapi/Alluriquin). La especie no tolera las fuertes heladas o cambios bruscos de temperatura (Añazco, 1996).

Precipitación

Las zonas húmedas, como aquellas que se hallan junto a los ríos o quebradas 8por ejemplo, vía Papallacta-Cuyuja), son lugares donde se encuentran grandes rodales de

aliso; también en áreas de ladera que reciben neblina (Las Canteras del Cotopaxi), se puede observar abundante regeneración natural. El crecimiento y desarrollo en estos sitios demuestra que es exigente en humedad, sin embargo crece aceptablemente en lugares con menos cantidad de humedad (San Isidro), lo que permite establecer un rango aproximado del comportamiento del Aliso en relación a la precipitación entre los 435 y 3100 mm/año (Añazco, 1996).

Los sitios de mayor precipitación donde existen alisos son los de Oyocanchi, Cuyuja y Alluriquin, con 3100 mm/año aproximadamente; y los de menor precipitación, Cañar con 495,3 mm/año y Ambato con 435,6 mm/año. En estas zonas de baja pluviosidad se tiene entre 2 y 4 meses secos por año, generalmente entre julio y septiembre, donde además se presentan fuertes vientos, los cuales causan problemas a los árboles, llegando en varios casos a derribarlos (Añazco, 1996).

Humedad relativa

En las zonas entre un 80% y 86% de humedad relativa, se encuentra creciendo bien la especie. También se la encuentra en Cañar, donde existe 73,1% de humedad relativa, La Argelia (Loja) con 74% y Alluriquin con 90% durante los meses secos (Añazco, 1996).

Evaporación

Se encuentra donde la evaporación promedio es de 1171,4 mm (Añazco, 1996).

Nubosidad

Sitios donde existe un promedio anual 7/8 (nublado) (Añazco, 1996).

Heliofania

Se lo encuentra en lugares donde la heliofania total anual es de 1400 a 1600 horas. La especie es exigente en luz, razón por la cual tiene inconvenientes para crecer bajo la sombra (Añazco, 1996).

Evapotranspiración

En sitios donde exista evapotranspiración de 1200 mm/año a 1400 mm/año la especie se desarrollara sin dificultades (Añazco, 1996).

6. Sistemas de Producción

En Ecuador la especie se propaga sexual (semillas) o asexual (partes vegetativas). El aliso blanco tiene mayor facilidad para propagarse vegetativamente; en el sistema por semillas no se ha observado diferencias significativas en ambas variedades (Añazco, 1996).

Propagación sexual

El aliso tiene una alta capacidad para reproducirse en forma natural, pero presenta problemas de sobrevivencia por falta de luz y humedad, su propagación se hace por semilla, con alta viabilidad aunque pierden su poder germinativo rápidamente, en semillero se siembran a 5mm de profundidad a 2 cm entre sí en líneas separadas de 10cm. Posteriormente se cubren con una muy delgada capa de paja y se riegan dos veces al día. El trasplante se efectúa cuando la plántula alcanza 20cm, es de rápido crecimiento y soporta sequía y suelos pobres (Bartholomaeus, 1990).

Propagación vegetativa

Consiste en utilizar partes vegetativas para la producción, de acuerdo a las procedencias. En Ecuador se prefiere el aliso blanco, es decir aquel que tiene las “raíces preformadas” (Añazco, 1996).

Las ventajas de la propagación vegetativa frente a la sexual, son las siguientes:

- Se conservan mejor las características de los progenitores
- Se obtiene mayor crecimiento en menor tiempo
- El manejo de la producción a nivel de vivero es más sencillo
- El costo de producción es menor
- Se evita pérdida de plántulas por causas como: damping-off, pájaros, roedores, etc.
- Se evita el riesgo de tener raíces mal formadas por un deficiente repique.

La presencia de yemas en el desarrollo es un requerimiento para el enraizamiento y que la intensidad de la producción en la raíz debe estar directamente correlacionada con la proporción del desarrollo de la yema. Estacas con yemas inactivas suelen fracasar en el enraizamiento, aun bajo las mejores condiciones, pero cuando las yemas renuevan su actividad, el enraizamiento ocurre. Indica también que la extracción de un anillo en la corteza de una pequeña sección del tronco debajo de las yemas también a formar raíces (CONIF, 2002).

Regeneración Natural

Donde hay regeneración natural de aliso es relativamente fácil tener una producción en pequeña escala trabajando en brinzales. Se puede repicar las plántulas (3-5 cm.) en camas de vivero bajo tinglado o transplantar en época de lluvia a raíz desnuda de una vez al campo definitivo utilizando brinzales de 35-50 cm. de altura. La regeneración natural normalmente sólo ocurre sobre suelo mineral expuesto, tanto a media sombra como a plena luz, pero siempre en lugares húmedos (Nieto, 2007).

Propagación in vitro

Se ha desarrollado un protocolo eficaz para el establecimiento *in vitro* mediante la proliferación de yemas axilares de material procedente de genotipos adultos de aliso. Las estaquillas, obtenidas de árboles de 20-30 años, fueron “forzadas” a brotar y los brotes se cultivaron en medio Woody Plant Medium (WPM) (Corredoira, Janeiro & San Jose, 2011).

7. Importancia

Las especies del género *Alnus* se consideran de gran Importancia porque la raíz se asocia simbióticamente con Actinomycetes, formando nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico, siendo este el principal mecanismo para la Incorporación de nitrógeno reducido en suelos pobres (Normand & Lalonde, 1982).

El género *Alnus* está compuesto por especies realmente interesantes desde el punto de vista biológico, ecológico y económico, en general, y micológico en particular. "Alnus es uno de los pocos géneros de plantas capaz de establecer una asociación tetrapartida de forma simultánea con actinobacterias del género *Frankia* y con hongos que establecen diferentes tipos de micorrizas (simbiosis mutualista entre las raíces vegetales y las hifas de ciertos hongos filamentosos): micorrizas arbusculares (MA) y Ectomicorrizas (ECM)", aclara la investigadora de la UPV/EHU. A través de las micorrizas los hongos obtienen de las plantas la fuente de carbono que precisan para su desarrollo y las plantas, a su vez, reciben a través de los hongos minerales, como el fósforo y nitrógeno principalmente, agua y resistencia frente a patógenos. Esta particularidad les confiere a las especies de alisos una gran tolerancia al estrés medioambiental como pantanos, humedales, zonas riparias y ambientes de alta montaña. Además, las especies de este género se caracterizan por ser pioneras y de rápido crecimiento, adaptadas a un amplio

abanico de hábitats como depósitos glaciares, dunas, suelos volcánicos con depósitos de cenizas o corrimientos de tierra (Nouhra et al., 2014).

El *A. acuminata* es una especie de rápido crecimiento al tiempo que mejora la estructura del suelo y la fertilidad, además de otros rasgos que han potenciado su uso en programas de reforestación para la protección de suelos de ladera y cuencas (Salazar et al., 2014).

En los sistemas agroforestales, *Alnus acuminata* constituye una fuente de fertilización nitrogenada para el pasto, brinda sombra para el ganado y además ayuda a reducir la presión sobre la tala de nuevas áreas de bosque (Bare & Ashton, 2015). Un estudio realizado en la sierra sur del Ecuador, han encontrado que en determinadas condiciones esta especie alcanza tasas de crecimiento incluso mayores que especies exóticas como eucalipto (*E. sp*) y pino (*P. sp*) (Bare & Ashton, 2015).

Alnus acuminata Kunth (aliso) es una especie nativa de los Andes que es utilizada para reforestación; esta especie es apta para asociarla a diferentes sistemas productivos, debido a sus aptitudes de conservación y adaptación, con el fin de disminuir el deterioro ambiental (Pacheco & Quisbert, 2016).

Se ha demostrado que el aliso logra capturar grandes cantidades de Dióxido de Carbono (CO₂) y Óxido Nitroso (N₂O) lo que permite validarla como una especie forestal idónea para actividades de reforestación con fines de brindar este servicio ecosistémico (Silva et al., 2018).

8. Problemas Fitosanitarios

a. Plagas

Brotos: En un vivero en Coronado (San José), se presentó un grupo pequeño de plántulas atacadas por una especie de conejo característico de la zona correspondiente a *Sylvilagus brasiliensis*; se alimenta de tallos, brotes tiernos, hojas y de la corteza de la plántulas atacadas. En plantaciones recién establecidas destaca el ataque a nivel de brote y fuste producido por *Phomopsis* sp. Se observó en arbolitos de 6 a 12 meses de edad. La infección inicia en los meristemas apicales y laterales provocando una quema pardo–negruzca. En la mayoría de los casos el hongo avanza hacia las ramillas y el tallo, donde inicialmente se observan áreas amarillentas y hundidas, las cuales colapsan entre sí produciendo áreas extensivas de corteza necrosadas que anillan el hospedero y pueden producir la muerte del mismo (Macias et al., 2002).

Follaje: En la mayoría de las plantaciones del país se presenta una serie de manchas pardo amarillentas producidas por *Melampsorium alni*, conocida como la “roya del jaúl”. Al inicio del ataque se presentan manchas irregulares color amarillo en el envés de las hojas, posteriormente, éstas pueden colapsar y formar áreas necróticas extensivas color pardo oscuro en ambos lados de la lámina foliar. Cuando el hongo madura, puede atacar tanto láminas foliares como ramillas jóvenes y yemas, produciendo hiperplasias (Sinclair & Lyon, 2005).

Con respecto a insectos defoliadores destaca el ataque de una especie no identificada de microlepidoptera (Lepidoptera). La larva se alimenta por el envés de la hoja y se come en sectores la lámina inferior y el parénquima, dejando solamente la cutícula superior, la cual inicialmente tiene un color pardo-naranja y posteriormente pardo oscuro. Las hojas severamente atacadas mueren y caen. En algunas plantaciones y brinzales ataca en forma severa, causando una disminución en el desarrollo de los mismos; si los árboles son muy jóvenes, puede producir mortalidad (Arguedas & Espinoza, 2007).

Adultos de coleópteros también han sido reportados como defoliadores. En 1996, una plantación de dos años en San Isidro de Heredia, fue severamente defoliada por *Ceraspis brunneipennis* (Scarabaeidae); durante los tres años subsiguientes se realizaron inspecciones en el mismo sitio y no se presentó la plaga. De acuerdo a Evans & Smith, (2007), *C. brunneipennis* se encuentra únicamente en Costa Rica.

Fuste: La plaga más importante en Costa Rica es producida por el “descortezador” *Scolytodes alni* (Scolytidae, Coleoptera). *S. alni* fue reportado la primera vez en 1960, en un tronco caído de jaúl en las laderas del Volcán Irazú. Desde entonces y debido al auge de las plantaciones de esta especie en la región central del país, el organismo ha alcanzado proporciones de plaga (Arguedas, 1992).

b. Enfermedades

El hongo *Botryosphaeria dothidea* produce varios canchales a lo largo del fuste. Los tejidos corticales atacados se necrosan, toman una coloración negra y quedan adheridos al xilema, generalmente se produce una depresión prominente bajo las lesiones; pueden llegar a medir hasta 6 cm de altura. La mayoría de las infecciones se inician por conidias que son transportadas por la escorrentía y el goteo de la lluvia e ingresan a través de las lenticelas ó por heridas, como las producidas durante las podas silviculturales. Se

considera un patógeno oportunista, que aprovecha condiciones de estrés de los hospederos para establecerse (Sinclair & Lyon, 2005).

Los géneros *Fusarium* y *Ceratocystis*, se han reportado en especies forestales asociados al ataque de insectos ambrosiales, especialmente Coleoptera: Scolytidae, ocasionando chancros, marchitamientos vasculares y manchados vasculares (Gil et al., 2004).

Lamprecht (1990), menciona que, en algunos lugares, el aliso es dañado por los hongos *Armillariella puriggarii* y *Pholiota aurivella*.

En viveros, especialmente en Cañar, se han presentado daños a nivel radicular, foliar y en el cuello de las plántulas. Posiblemente se trata de un complejo de hongos patógenos que son muy comunes en viveros, como *Phytium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Phytophthora* o *Botrytis*. La mejor forma de prevenir el ataque de estos hongos ha sido realizando una buena desinfección del suelo y eliminando el material contaminado paradisminuir las fuentes de inoculo (Añazco, 1996).

En general los daños causados por hongos a nivel foliar en aliso no son significativos, la planta se defiende bien. Muestra tolerancia y no se ha detectado patógenos de consideración. Si se hace una comparación de incidencia de ataques fungosos en aliso a nivel radicular como foliar, se encuentra que los mayores daños son causados en las raíces y el cuello. Además, es importante indicar que las plántulas son más frágiles y susceptibles cuando no tienen asociación micorrítica. En el género *Alnus*, como se conoce, la formación de nódulos se debe a la presencia de un actinomiceto que es un activo fijador de nitrógeno, lo que permite un mejor desarrollo de las plántulas y un fortalecimiento de sus defensas (Añazco, 1996).

B. PATOGENOS

1. Fúngicos.

A nivel mundial los hongos fitopatógenos constituyen el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y daño que pueden causar. El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las perdidas en la producción biológica (FAO, 2004).

Se considera que existen más de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas. La mayoría de las plantas pueden ser atacadas por algún tipo de hongo (por uno o varios) y también se sabe que un mismo hongo fitopatógeno puede infectar a uno

o más tipos de plantas, aunque sean de diferentes familias. La mayor parte de los hongos fitopatógenos pasan la mayoría de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped (como parásito) y otra parte en el suelo, en los residuos vegetales que se encuentran ahí (como saprofitos), aunque algunos solo se desarrollan como parásitos. Generalmente los cuerpos reproductores del hongo se forman en la superficie de los tejidos de la planta huésped (o muy cerca de ella), lo cual causa que las esporas se dispersan rápida y fácilmente (García, 2004).

En viveros, se han presentado daños a nivel radicular, foliar y en el cuello de las plántulas y esto posiblemente se deba a complejo de hongos patógenos que son muy comunes: como *Phytium*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Alternaria*, *Phytophthora* o *Botrytis*.

a. *Phytium*

Pythium es un género de Oomycetes parásitos. Muchas especies de *Pythium*, junto con sus parientes cercanos, *Phytophthora*, son patógenos de plantas de importancia económica en la agricultura. *Pythium* ocasiona la podredumbre común de las raíces de las plantas. Esta es una enfermedad muy común en el campo y los invernaderos, donde el organismo mata a las plantas en los semilleros recién plantados. Esta enfermedad por lo general implica relaciones complejas con otros hongos como *Phytophthora* y *Rhizoctonia*. *Pythium* es un hongo que produce un micelio intracelular, segrega una enorme cantidad de enzimas y causa podredumbres húmedas que destruyen las semillas, las plántulas o incluso frutos y órganos carnosos de plantas adultas (ahogamiento o caída de plántulas, conocido también como “peste de los semilleros”). El micelio produce gran cantidad de esporangios, los cuales no emiten directamente las zoósporas, sino que dan lugar a una vesícula donde dichas zoósporas se forman (Pérez, 2017).

Las distintas especies de *Pythium* tienden a ser muy inespecíficos y generalistas en su gama de huéspedes. Cada especie puede infectar a una amplia gama de huéspedes. Las especies de *Pythium* son devastadores en las cosechas, puesto que la rotación de cultivos por sí sola a menudo no puede erradicar al agente patógeno. El barbecho tampoco erradica al patógeno puesto que *Pythium* también es un saprofito y sobrevive mucho tiempo en materia vegetal en descomposición (Pérez, 2017).

Síntomas

Los síntomas son claros: las semillas no germinan, produciéndose marras de nascencia o, si lo hacen, caen y se pudren enseguida (es típico el síntoma llamado “cinturilla”: la base de la plántula se ablanda y estrecha, desplomándose al poco tiempo) (Perez, 2017).

b. Phytophthora

El género *Phytophthora* (del griego *Phyton*: planta; *phthora*: destructor) fue creado por de Bary en 1876 con *P. infestans* de Bary como especie tipo. Este investigador reconoció a dicho hongo como causante del “blight” tardío en la patata, en Europa (1840), previamente identificado como *Botrytis infestans* Montagne y luego como *Peronospora infestans*. Los primeros reportes de la presencia de *Phytophthora* en Cuba fueron dados a conocer por Cook y Horne en 1908, quienes la observaron en limones franceses (*Citrus limon* Burn), bergamotos (*Citrus limettoides* Tan.), naranja china (*Citrus sinensis* Osb.), toronja (*Citrus paradisi* Macf.) y limón silvestre (*Citrus aurantifolia* Swing. Var. “Mexicana”) que fue señalado como muy susceptible (Zentmyer & Erwin, 1970).

Todas las especies del género poseen un micelio hialino, continuo, de paredes paralelas o irregularmente calibradas, donde pueden observarse abundantes gotas oleaginosas. El micelio es cenocítico, observándose solo raramente la presencia de algunos tabiques que normalmente se encuentran separando las partes viejas carentes de protoplasma (Zamora & Casin, 1986).

El género *Pythophthora* pertenece a (Tuset, 1983):

División:	Eumycota
Subdivisión:	Phycomycotina
Clase:	Oomycetes
Orden:	Peronosporales
Subfamilia:	Phythiae
Género(s):	Phytophthora y Pytium

Síntomas

Produce la deshidratación y muerte de la corteza, sin que ocurra la exudación de goma. La lesión frecuentemente es visible junto a la superficie del suelo, pudiéndose observar a

unos centímetros por debajo de este que la corteza aparece podrida igual que la de las raíces principales. Cuando las afectaciones en la base del tallo son considerables las plantas enfermas comienzan a mostrar en su parte aérea los efectos de la alteración. Se observan hojas de color verde pálido, encontrándose a menudo los nervios con una coloración amarillenta; las brotaciones son escasas, con los limbos de las hojas reducidos confiriéndole a la planta un aspecto general de tristeza foliar. La producción de frutos también se ve afectada, siendo escasa y con frutos de menor tamaño que lo normal (Zentmyer & Mitchell, 1986).

c. Fusarium

F. oxysporum es un hongo Deuteromycetes (imperfecto) aparentemente ha perdido el estado perfecto o sexual, es causante del marchitamiento vascular en diversos vegetales como es el caso del Babaco. Es causante además de micosis en animales y humanos. Pertenece a la división Ascomycota, Clase Euascomycetes, Orden Hypocreales (Arias & Piñeros, 2008)

Este agente fitopatógeno se caracteriza por producir colonias de crecimiento rápido, su micelio es generalmente aéreo, abundante, algodonoso, con diferentes coloraciones como blancas, durazno, salmón, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta y es más intenso cuando se aísla y se lo cultiva en agar (Estupiñan & Ossa, 2007).

Se propaga por el suelo en forma de micelio, en ocasiones por esporas, conidios o esclerocios, los cuales son llevados por el viento, agua, herramientas agrícolas, insectos o por esquejes (Hernandez, 2004).

La marcada variabilidad en sus características fisiológicas y morfológicas, explica su capacidad de colonizar diversos nichos ecológicos. La mayoría de estas especies están clasificadas con base a sus características macro y microscópicas de cultivo como son: clamidosporas, monofialide, micro y macroconidias (Estupiñan & Ossa, 2007).

Síntomas

Los síntomas de la marchitez, se manifiestan en hojas, en tallo y en raíces. En las hojas, se caracterizan por la presencia de clorosis, que se inicia en el ápice y bordes y avanza, progresivamente, hacia el centro, hasta cubrir toda la hoja. En la medida en que la enfermedad progresa, se presenta necrosis en las áreas afectadas. En los tallos, se evidencia pérdida de coloración normal y brillo; se tornan oscuros en toda su longitud y, cuando se hace un corte longitudinal, se observa el tejido vascular manchado de color

marrón. En el cuello de las raíces, se exterioriza una pudrición seca, que se extiende por los tejidos de la epidermis, forma una masa corchosa granular, que se deshace fácilmente, cuando se hace disección (Lubbe, Lamprecht, Van Niekerk & Mostert, 2008).

d. Rhizoctonia

El género *Rhizoctonia* fue establecido por De Candolle en 1815 y revisado por Parmeter y Whinther en 1970. Las dos características para elegir este género fueron: la producción de esclerocios de textura uniforme con desarrollo de hifas y la asociación del micelio con raíces de plantas vivas. *Rhizoctonia solani* es un fitopatógeno importante que se distribuye en todo el mundo causando diversas enfermedades en una gran variedad de cultivos (Sneh, Burpel & Ogoshi, 1991).

Agrios, 1998 establece que *Rhizoctonia* pertenece a la División Basidiomycota; Clase Gasteromycetes y Género *Thanatephorus*.

La forma imperfecta, que regularmente se encuentra en la naturaleza y más importante, se caracteriza por la formación de un micelio de color pardo claro a oscuro, con un grosor de 5 a 15 micrómetros, conformado por hifas de células largas, que producen ramificaciones que crecen casi en ángulo recto con respecto a la hifa principal y se estrechan ligeramente al nivel de la bifurcación (Agrios, 1998).

Síntomas

El síntoma típico son canchales castaños rojizos en el cuello de la planta. En ocasiones pueden observarse filamentos amarronados en el interior y por fuera del tallo. La pudrición basal avanza hacia las raíces y hacia la parte superior de la planta. Los tallos tienden a romperse fácilmente. En plántulas causa damping off de pre y post-emergencia con decoloración pardo-rojiza de los hipocótilos. Los daños son mayores en post-emergencia. En plantas adultas se observa marchitamiento y muerte en grandes parches de los lotes (rodales). Su presencia predomina desde emergencia hasta la floración en planta adulta. Los primeros síntomas son lesiones corticales color castaño rojizo sobre el hipocotilo (canchales), raíz principal y raíces secundarias. En la zona basal se pueden observar hifas gruesas marrones y pequeños esclerocios amorfos color marrón adheridos a las partículas del suelo. En plantas adultas causa marchitamiento en rodales y las condiciones ambientales favorables son suelos con humedad fluctuante y temperatura cálida y en general, su ataque se encuentra asociado a otros patógenos, como *Fusarium* spp. y *M. phaseolina*, entre otros (Muzhinji, Woodhall, Truter & Van der Waals, 2018).

2. Aislamiento de hongos

Para el cultivo y crecimiento de hongos en el laboratorio, es decir el desarrollo del micelio en cajas de Petrí, se deben utilizar determinados medios de cultivo, los cuales deben proporcionar al hongo los nutrimentos requeridos para su crecimiento y desarrollo. Por lo regular se emplean medios de cultivo sólidos con agar, los cuales actúan a manera de substrato al solidificar como una gelatina. El medio de cultivo que se utilizará dependerá de la especie de hongo que se quiere cultivar, ya que cada especie tiene sus propios requerimientos nutricionales (Guzman, Mata, Salmones, Soto & Guzman, 1993).

a. Cámara Húmeda

Consiste en colocar la muestra enferma en una bolsa de nylon o un recipiente con un trozo de algodón embebido en agua. Es necesario mantener el recipiente cerrado a temperatura ambiente, hasta que se visulalice el signo del hongo. La muestra a colocar en el recipiente debe estar limpia para que los resultados no se vean alterados por posibles contaminantes.

b. Inclusión de fragmentos

Cuando una enfermedad causada por hongos no puede ser identificada facilmente a través de la consulta bibiligráfica, o la producción de signo en la cámara húmeda es necesario proceder al aislamiento.

El aislamiento consiste en limpiar con un algodón embebido en alcohol 70% el tejido vegetal enfermo, realizar pequeños cortes de la zona de avance de la infección, donde el patógeno está en activo desarrollo. Los trozos son esterilizados con una solución de hipoclorito al 1% durante 1 minuto, enjuagados con agua destilada estéril y sembrados en placas de petri con medios de cultivos específicos para hongos, la mayoría de las veces estos medios contienen sustancias bacteriostáticas para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes. Las placas son incubadas en estufa a 20 o 25°C por 4 a 5 días, posteriormente a partir de los trozos sembrados se verá el micelio del hongo, en función de los tipos de micelio desarrollaados será el número de repiques a realizar para llegar a obtener un cultivo puro. El repique consiste en extraer del borde de la colonia un trozo de agar con micelio, sembrarlo en otra placa de petri conteniendo medio nutritivo para hongos pero sin sustancias bacteriostáticas, e incubar las placas a 20 o 25°C durante el tiempo que demore la formación de las estructuras reproductivas necesarias para la identificación del hongo.

3. Medio de cultivo

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6 – 6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Se puede añadir antibióticos antibacterianos para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras. Los medios pueden ser sólidos o líquidos. Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado. La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque cuando ésta comienza a disminuir, la formación de micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas). El agar empieza a derretirse a partir de 80 °C (Cañedo & Ames, 2014).

4. Caracterización de Patógenos fúngicos

Una de las tareas más grandes de la microbiología es implementar metodologías que permitan la identificación precisa de microorganismos. La identificación por medio de la taxonomía clásica de especies fúngicas se basa principalmente en el uso de características morfológicas. Sin embargo, estas características no permiten la identificación completa de especies relacionadas (Hernandez, 2017).

a. Caracterización Cultural.

El examen macroscópico se realiza a partir de una “macrocolonia” obtenida por sembrado de la especie fúngica en estudio en la parte central de una placa con medio de cultivo (Agar Glucosado Sabouraud). Para ello se emplea una aguja aplanada en uno de sus extremos en forma de espátula. Las placas son luego incubadas a temperatura ambiente (entre 20 y 30 °C) durante 3 a 15 días con observaciones diarias. De esta colonia gigante se describirá (Micología, 2017).

- Velocidad de crecimiento: es el tiempo que tarda la colonia en ocupar las 2/3 partes de la placa
 - Rápido: entre 1 y 2 semanas.
 - Moderado: entre 2 y 3 semanas.

- Lento: entre 3 y 4 semanas.
- Topografía de la colonia:
 - Forma: circular, irregular, filamentosa
 - Elevación: plana y extendida, elevada y limitada, umbilicada
 - Margen: entero, lobulado, desflecado, rizoide
 - Superficie: plegada, con surcos radiados, cerebriforme
- Pigmentación en anverso y reverso de la colonia o pigmento difusible en el medio.
- Textura: granulosa, pulverulenta, vellosa, aterciopelada, algodonosa.
- Tamaño: crecimiento limitado o crecimiento invasivo.

b. Características Morfológicas

Esta técnica se utiliza para detectar el tipo de forma reproductiva (esporas), observando al microscopio: forma, tamaño, agrupamiento, color, etc. También se describirán las características de las hifas: presencia o ausencia de tabiques, grosor, hifas en raqueta, hifas en espiral. Tal observación puede realizarse a partir de los cultivos en placa, mediante una lupa o con el objetivo seco débil del microscopio, empezando desde el fondo hasta la parte superior de la colonia. Luego se hacen observaciones posteriores tomando, con un gancho, una pequeña muestra del micelio en desarrollo, la que se coloca en una gota de lactofenol (Fenol cristalizado, 20g; Ácido láctico, 20g; Glicerina, 40g; Azul cotton, 0,05g o Tinta Parker diluida al 40%, Agua destilada c.s.p. 20 ml.) u otro líquido de montaje (lugol, azul de metileno) que colorea las estructuras y favorece el contraste. El preparado se observa en microscopio óptico con aumento de 10x y 40x. Una manipulación de este tipo rompe y desorganiza las estructuras del organismo, pues la disposición característica de la que depende la identificación se pierde y no es posible clasificarlo, por ello el método recomendado por examinar los hongos es la técnica de cultivo en portaobjetos o microcultivo, ya que permite manejar y observar la especie sin modificar su desarrollo, y el arreglo y acomodo de sus partes permanecen intactas (Micología, 2017).

c. Caracterización Molecular

La caracterización o tipificación molecular, consiste en diferenciar individuos de interés según sus variaciones o polimorfismos en el ADN. Estos polimorfismos pueden darse debido a dos tipos de cambios principalmente: cambios en las bases nitrogenadas por adición, transición, traslocación o delección, y reorganizaciones en la secuencia del

ADN. Estos cambios generalmente son localizados en un sitio específico de la molécula de ADN (Robles, Koreen & Perlin, 2014).

En la práctica, la caracterización se realiza generalmente empleando oligonucleótidos (imprimadores o primers) de secuencia conocida, que sirvan como punto de partida y/o término de la síntesis de fragmentos complementarios a la banda de ADN en estudio, y con ello, mediante la detección de variaciones en los tamaños o secuencias nucleotídicas de los productos amplificados durante el PCR o hibridación por Southern Blot, diferenciar entre géneros, especies y hasta menores grados de clasificación según la técnica empleada y el tipo de organismo. De esta manera se esperaría que, patrones diferentes de las bandas observadas luego del revelado en electroforesis u otros, evidenciaran contrastes genéticos, y por ende, diferencias entre individuos (Claros, 2005).

d. Técnica de microcultivo

1. Se corta un pequeño bloque de agar dextrosa papa o agar harina de maíz previamente vertido en una caja de Petri hasta una profundidad de 4 mm. Esto puede hacerse usando una hoja de bisturí estéril o una espátula con un borde cortante o un tubo de prueba recto estéril.
2. Sobre una segunda caja de Petri estéril se coloca un papel de filtro y dos palitos cortados de un tamaño tal como para encajar en la caja y sobre los mismos se coloca un portaobjetos estéril.
3. Con ayuda de un gancho o un porta estéril se coloca el bloque de agar en la superficie del portaobjeto.
4. Con el gancho estéril se remueven porciones pequeñas de la colonia de hongos que se desea estudiar y se inoculan los cuatro cuadrantes del bloque de agar.
5. Luego de la inoculación, se coloca un cubreobjetos estéril sobre la superficie del agar.
6. Los discos de papel de filtro en el fondo de la caja se mantienen húmedos con agua estéril durante el período de incubación.
7. La colonia crecerá por debajo de la superficie del cubreobjetos. Se examina el montaje periódicamente a simple vista para determinar si la colonia ha madurado. Cuando es evidente un crecimiento suficiente, se retira cuidadosamente el cubreobjeto con pinzas estériles y se coloca en un portaobjetos con lactofenol (Micología, 2017).

C. TRICHODERMA

1. Generalidades

El género *Trichoderma* fue descrito por Persoon en 1794. Posteriormente, Rifai hizo el primer agrupamiento en especies agregadas que se utiliza hasta el presente, a pesar de las dificultades que se presentan para la identificación de especies por este método, debido a la cercanía morfológica y la evolución de las mismas. Son hongos saprofitos del suelo y la madera, de crecimiento muy rápido. Las especies de este género se encuentran ampliamente distribuidas por todas las latitudes, y se presentan naturalmente en diferentes ambientes, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición (Villegas, 2005).

La acción de *Trichoderma* como micoparásito natural se demostró por Weindling en 1932, y su utilización en experimentos de control biológico se implementó a partir de 1970, cuando se incrementaron los estudios de campo para su uso en cultivos de hortalizas y ornamentales. No obstante, la información sobre su empleo en la producción agrícola es insuficiente y dispersa (Chet, 1990).

El género *Trichoderma* en su estado vegetativo presenta micelio con septos simples. Las especies son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucano. Se reproducen asexualmente por conidios. Presentan conidióforos hialinos ramificados, fiálides simples o en grupos, conidios de 3 a 5 μm de diámetro, generalmente ovalados, unicelulares, coloreados (usualmente verdes); de rápido desarrollo en medios sintéticos. Tiene la capacidad de producir clamidosporas en sustratos naturales que, son unicelulares, pero pueden unirse entre dos o más. Estas estructuras son de vital importancia para la sobrevivencia del género en el suelo bajo condiciones adversas. El organismo crece y se ramifica desarrollando típicas hifas, de 5 a 10 μm de ancho (Harman, 2001).

El género *Trichoderma* es un excelente modelo para ser estudiado debido a su fácil aislamiento y cultivo, rápido desarrollo en varios sustratos y por su condición de controlador biológico de una amplia gama de fitopatógenos (Fernandez, 2001).

2. Taxonomía

Trichoderma se ubica taxonómicamente según Villegas, (2005) en:

Reino: Fungi.

División: Mycota
Subdivisión: Eumycota
Clase: Hyphomycetes.
Orden: Moniliales.
Familia: Moniliaceae.
Género: *Trichoderma*

3. Mecanismos de acción de trichoderma

Los mecanismos de acción antagonista con que actúa frente a los hongos fitopatógenos son: competencia por espacio y nutrientes, micoparasitismo, antibiosis, la secreción de enzimas y la producción de compuestos inhibidores (Infante, Martínez, Gonzales & Reyes, 2019).

a. Competencia

La competencia constituye un mecanismo de antagonismo muy importante. Se define como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás. Este tipo de antagonismo se ve favorecido por las características del agente control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, y por otro lado por factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad, entre otros (Ahman & Baker, 1987).

La competencia por nutrientes puede ser por nitrógeno, carbohidratos no estructurales (azúcares y polisacáridos como almidón, celulosa, quitina, laminarina, y pectinas, entre otros) y microelementos. Esta forma de competencia en los suelos o sustratos ricos en nutrientes no tiene importancia desde el punto de vista práctico. Por ello, cuando se emplea fertilización completa o existe exceso de algunos de los componentes de los fertilizantes e inclusive en suelos con alto contenido de materia orgánica, este tipo de antagonismo es poco eficaz (Stefanova, Leiva, Larriganaga & Coronado, 1999).

La competencia por sustrato o espacio depende de si el mismo está libre de patógenos (sustrato estéril) o si hay una microbiota natural. En el primer caso, la velocidad de crecimiento del antagonista no determina la colonización efectiva de los nichos, sino la aplicación uniforme del mismo en todo el sustrato. Sin embargo, en el segundo caso la

velocidad de crecimiento, conjuntamente con otros de los mecanismos de acción del antagonista, es determinante en el biocontrol del patógeno y colonización del sustrato (Martinez, Fernandez & Solano, 1994).

b. Micoparasitismo

El micoparasitismo es definido como una simbiosis antagónica entre organismos, en el que generalmente están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasas, celulasas, y que se corresponden con la composición y estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados (Diaz, 1994).

Las especies de *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crecen 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 (Carsolio, 1999).

El micoparasitismo como mecanismo de acción antagónica en *Trichoderma* spp. ha sido ampliamente estudiado, no obstante, existen aspectos en el mismo que no están totalmente esclarecidos. Este es un proceso complejo que para su estudio se ha separado en cuatro etapas (Perez, 2004).

Crecimiento quimiotrófico: El quimiotropismo positivo es el crecimiento directo hacia un estímulo químico. En la etapa de localización del hospedante, se ha demostrado que *Trichoderma* puede detectarlo a distancia y sus hifas crecen en dirección al patógeno como respuesta a un estímulo químico (Chet & Inbar, 1994).

Reconocimiento: El reconocimiento se realiza a través de interacciones lectinas-carbohidratos. Las lectinas son proteínas enlazadas a azúcares o glicoproteínas, las cuales aglutinan células y están involucradas en las interacciones entre los componentes de la superficie de las células y su ambiente extracelular. La producción de lectinas se ha investigado en *R. solani* y *S. rolfsii*. En todos los casos se encontraron evidencias directas, de que las lectinas están involucradas en el micoparasitismo (Chet & Inbar, 1994)

Adhesión y enrollamiento: Cuando la respuesta de reconocimiento es positiva, las hifas de *Trichoderma* se adhieren a las del hospedante mediante la formación de estructuras parecidas a ganchos y apresorios, se enrollan alrededor de estas, todo esto está mediado

por procesos enzimáticos (Perez, 2004). La adherencia de las hifas de *Trichoderma* ocurre gracias a la asociación de un azúcar de la pared del antagonista con una lectina presente en la pared del patógeno (Martinez, Fernandez & Solano, 1994).

Actividad lítica: En esta etapa ocurre la producción de enzimas líticas extracelulares, fundamentalmente quitinasas, glucanasas y proteasas, que degradan las paredes celulares del hospedante y posibilitan la penetración de las hifas del antagonista (Haram, 1996). Por los puntos de contacto donde se produce la lisis y aparecen los orificios, penetra la hifa del micoparásito en las del hongo hospedante. La actividad enzimática en *Trichoderma* ha sido estudiada extensamente, así como las posibles funciones que desenvuelven en el micoparasitismo.

c. Antibiosis

La antibiosis es la acción directa de antibióticos o metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo sobre otro sensible a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal mecanismo de acción de un antagonista, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico (Infante, Martinez, Gonzales & Reyes, 2019).

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios volátiles y no volátiles, algunos de los cuales inhiben el desarrollo de otros microorganismos con los que no hacen contacto físico. Tales sustancias inhibitoras son consideradas "antibióticos" (Infante, Martinez, Gonzales & Reyes, 2019).

Al inicio se estimó que la actividad inhibitora de aislamientos de *Trichoderma* sobre otros hongos se debía solo a compuestos no volátiles. Dennis & Webster (1971) fueron los pioneros en esta temática, con la realización de los trabajos más completos acerca de la función de los antibióticos producidos por hongos del género *Trichoderma* sobre patógenos de las plantas. Ellos relacionaron la actividad antibiótica de *Trichoderma* spp. con compuestos no volátiles, entre los que se encontraban uno identificado como trichodermina y otros metabolitos peptídicos. En investigaciones posteriores, determinaron que *Trichoderma* sp. produce dos antibióticos más: gliotoxina y viridina. Más tarde Oliver y Germain, citado por (Martinez, 1998), informaron que *T. harzianum* Rifai produce numerosos antibióticos como son: trichodermina, suzukacilina, alameticina, dermadina, trichotecenos y trichorzianina.

Posteriormente, Dennis & Webster (1971) detectaron que la actividad antibiótica de algunos aislamientos se debía también a la producción de compuestos volátiles, y notaron que los aislamientos más activos poseían un fuerte olor a coco, posiblemente relacionado con la actividad antagonista.

Los antibióticos volátiles tienen un efecto esencialmente fungistático, debilitando al patógeno y lo hacen más sensible a los antibióticos no volátiles, lo que se conoce como un "hiperparasitismo" de origen enzimático. Algunas de las enzimas no solo intervienen en el proceso de penetración y lisis, sino que actúan también como antibióticos, tal es el caso de la enzima endoquitinasa (Ech42) que causa hidrólisis en las paredes de *B. cinerea*, y además inhibe la germinación de conidios y el crecimiento de tubos germinativos de varios hongos (Infante, Martínez, Gonzales & Reyes, 2019).

d. Producción de enzimas

Investigaciones recientes de los posibles mecanismos de acción involucrados en el control biológico realizado por las especies de *Trichoderma* sp. Han llevado a varias explicaciones alternas para un biocontrol exitoso. Una de ellas es la producción de enzimas tales como quitinasas y/o glucanasas producidas por este hongo y que pueden ser responsables de la disminución en la presencia de hongos patógenos presentes en suelos agrícolas. Estas enzimas son hidrolíticas y degradan los polisacáridos que otorgan rigidez y estructura a la pared celular de hongos, destruyendo con esto la integridad de los mismos; así mismo se ha establecido que estos hongos pueden producir proteasas que afectan las enzimas de los patógenos perturbando su capacidad de atacar las células de las plantas (Chavez, 2006).

e. Inducción de resistencia

Estudios recientes a niveles celular y molecular explican la diversidad de vías y mecanismos de acción de este hongo. Según Morton et al., (2004) se descubrió, que algunas cepas de *Trichoderma* pueden activar un mecanismo nativo de defensa en las plantas, conocido como Inducción de Resistencia Sistémica (por sus siglas en inglés IRS). Esto supone que puedan controlar a patógenos distantes del lugar donde se encuentra físicamente el antagonista (Chavez, 2006).

Diversas clases de compuestos pueden ser liberados por *Trichoderma* en la zona de la rizosfera y estar relacionados con la IRS en las plantas. La primera clase son proteínas con actividad enzimática o de otro tipo. Algunas de las proteínas secretadas por *Trichoderma* al parecer inducen solo respuestas locales y necrosis, otras activan mecanismos de defensa en plantas como los productos de los genes de avirulencia (Chavez, 2006).

f. Mecanismo Promotores de Crecimiento.

Los microorganismos Promotores de Crecimiento Vegetal promueven el crecimiento de las plantas, pero se puede inferir que pueden inducir el crecimiento vegetal directa e indirectamente. La influencia directa incluye la producción de fitohormonas, por ejemplo, ácido indolacético (AIA) del grupo de las auxinas, ácido giberélico (GA3), citoquininas y ácido abscísico (ABA) o bien, la capacidad de producir la enzima 1-aminociclopropano 1-carboxilato (ACC) desaminasa, que reduce el nivel de etileno en las raíces. Además, los mecanismos directos incluyen la liberación de fosfatos, micronutrientes y la fijación biológica de nitrógeno (Beltran, 2014).

Los efectos indirectos se deben a la modificación del ambiente rizosférico y su ecología, actuando como agentes de biocontrol de fitopatógenos mediante la liberación de sideróforos, β -1, 3-gluconasas, quitinasas, antibióticos, entre otras. Además de producir o cambiar la concentración de fitohormonas, algunas especies de este grupo de microorganismos participan en la fijación asimbiótica de Nitrógeno (N_2), pueden desarrollar antagonismo contra microorganismos fitopatógenos, pueden producir sideróforos, solubilizar el fosfato mineral y otros nutrientes (Beltran, 2014).

Según (Kloepper, Lifshitz, & Zablutowitz, 1989) los microorganismos PCV pueden ser: bioprotectores (supresión de enfermedades de plantas), biofertilizantes (aumentar la capacidad de adquisición de nutrientes) y bioestimulantes (producción de fitohormonas). El incremento en la tasa de germinación de semilla, el aumento en el peso seco de la raíz y follaje y el desarrollo radicular por *trichoderma* spp es debido a que acelera el desarrollo de los tejidos meristemáticos primarios, los cuales aumentan la germinación, el volumen, la altura, así como el peso de la planta (Cupull, Andreu, Perez, Delgado & Cupull, 2003).

4. Importancia industrial de *Trichoderma*

Se han desarrollado métodos para modificar genéticamente estos hongos de una manera muy precisa para que puedan secretar enzimas deseadas, eliminar patógenos de las plantas, estimular el crecimiento de plantas y ejercer resistencia a enfermedades.

En cuanto a la producción de enzimas a escala industrial, el género *Trichoderma* ha sido ampliamente investigado para la producción de aditivos alimentarios y productos relacionados (Blumenthal, 2004). Actualmente, diversas enzimas de *Trichoderma* se aplican para mejorar el proceso de elaboración de la cerveza (β -glucanasas), como maceración de enzimas en la producción de zumo de fruta (pectinasas, celulasas, hemicelulasas), como aditivo para la alimentación de la ganadería (xilanasas) y de alimentos para mascotas. Las celulasas se aplican principalmente en la cocción, el malteado, y la producción de alcohol de grano (Galante, 1998).

Sin embargo, no sólo enzimas, sino también metabolitos de *Trichoderma* sp. se utilizan como aditivos. Uno de los primeros productos aislados de *T. viride* fue un producto químico con aroma de coco, denominado 6-pentil- α -pirona con propiedades antibióticas, cuya producción fue constantemente mejorada hasta llegar a concentraciones de más de 7 g/L en cultivos de fermentación extractiva en *T. atroviride* (Oda, Isshiki & Ohashi, 2009).

Una interesante idea es la aplicación de enzimas que degradan la pared celular, por ejemplo de *T. harzianum*, como conservantes de alimentos debido a su efecto antifúngico, pero no se ha encontrado una amplia aplicación. *T. harzianum* mutanasa se puede utilizar en pasta dental para evitar la acumulación de la placa dentó bacteriana (Wiater, Szczodrak & Pleszczyńska, 2005).

V. MATERIALES Y METODOS

A. CARACTERIZACIÓN DEL LUGAR

El presente ensayo se realizó en las instalaciones del laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Recursos Naturales, para lo cual se trabajó con material vegetal procedente de 5 viveros forestales de la provincia de Chimborazo: Vivero CEAS, VILLAGOMEZ, VIDEFORT, TOTORILLAS Y PLANTAS.

B. MATERIALES

a. Materiales de campo

Material vegetal, Cooler, Libreta de campo, Lapicero, Fundas, Etiquetas, Tijera de poda, Barreno.

b. Equipos de campo

GPS, Cámara fotográfica.

c. Materiales de laboratorio

Envases plásticos, Cajas Petri, Sacabocado, Marcadores permanentes punta fina, Agujas de disección, Porta objetos y cubreobjetos, Papel absorbente, Bisturí, Piseta, Tamiz, Erlenmeyer, Puntas, Pipeta, Probeta, Papel aluminio, Tubos de ensayo, Gradilla, Mortero, Triángulos de vidrio, Parafilm, Tijera, Regla, Papel toalla, Papel kraft, Fundas (autoclavables), Mechero, Micropipeta.

d. Equipos de laboratorio

Autoclave, Cámara de flujo laminar, Balanza digital, Agitador magnético, Incubadora, Baño María, Secadora, Microscopio óptico, Estereoscopio, Cámara Fotográfica, Adaptador de cámara a microscopio.

e. **Materiales de oficina**

Computadora, Hojas, Impresora, Disco duro.

f. **Reactivos e insumos**

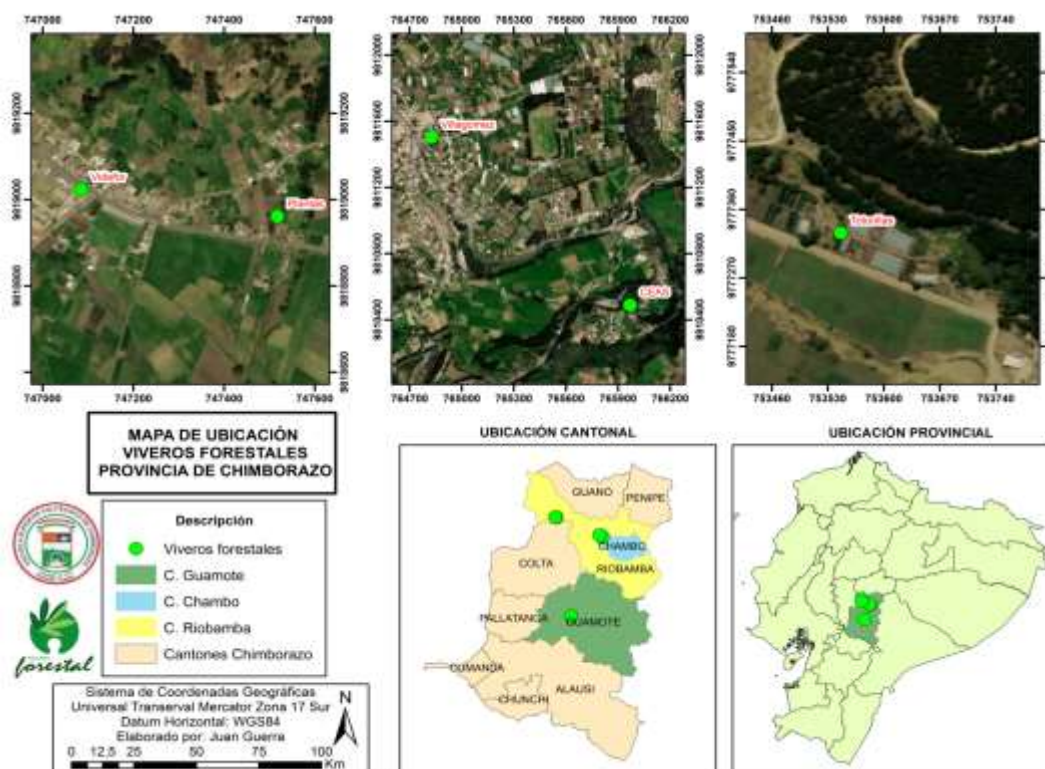
Medio de cultivo PDA, Medio de cultivo AGAR, Medio selectivo *Trichoderma*, Agua destilada, Solución salina, Azul de lactofeno, Antibiótico, Cebo coco, Cebo tarrina.

C. METODOLOGIA

1. **AISLAMIENTO DE HONGOS**

a. Ubicación del área de estudio

Para la presente investigación se seleccionó 5 Viveros Forestales que se encuentran en funcionamiento dentro de la provincia de Chimborazo. Los viveros seleccionados fueron el Vivero Forestal Videfor y el Vivero Forestal Plantas de la Parroquia San Juan. El Vivero Forestal Totorillas del cantón Guamote, el Vivero Forestal Ceas del cantón Chambo y el Vivero Forestal Villagomez del cantón Matriz de Riobamba.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Gráfico 1. Ubicación del área de estudio.

b. Muestreo y etiquetado

Para el muestreo se visitó cada uno de los viveros seleccionados y se tomó 10 unidades experimentales (plantas) que presentaron características de problemas fitosanitarios a nivel de raíz, se los colocaron en las bolsas de plástico, debidamente etiquetadas; para posteriormente trasladarlas en un cooler hasta el laboratorio de Fitopatología de la Espoch.

Tabla 1. Codificación de las muestras de campo.

VIVERO	CODIGOS									
CEAS	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10
PLANTAS	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10
TOTORILLAS	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
VIDEFOR	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10
VILLAGOMEZ	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10

Elaborado por (Guerra, 2019).

c. Procesamiento

Para el procesamiento de las muestras se ejecutó una metodología que brindó la seguridad necesaria de ingreso de material vegetal desinfectado al laboratorio. El mismo que se desarrolló de la siguiente manera; cuidadosamente sacamos la bolsa de plástico y con ayuda de un balde con agua eliminamos toda la tierra del cepellón sin dañar el sistema radicular, lavamos muy bien, cortamos a la altura del cuello y colocamos en una bolsa de papel manteniendo la codificación. Una vez realizado esto con todas las muestras continuamos con el proceso de desinfección denominado el método de “maracas”.

El método de maracas consiste en llevar la raíz a un flujo de agua continua (llave de grifo) por 2 minutos, luego en un recipiente con agua destilada y una solución de hipoclorito de sodio al 5% se procede a agitar por 5 minutos, repitiendo este paso 3 veces. Finalmente se enjuaga lo mejor posible utilizando agua desionizada.

d. Selección de fragmentos

Una vez correctamente desinfectada y libre de terrones la raíz de aliso, se seleccionó el fragmento que fue colocado en medio de cultivo Agar para el desarrollo micelial y el correcto aislamiento de los fitopatógenos.

Para la selección del fragmento se tomó en cuenta una interfaz de 1cm de largo donde exista la presencia de raíz sana-raíz enferma.

e. Siembra en medio Agar

Las siguientes etapas fueron realizadas dentro de la cámara de flujo laminar previamente esterilizada con desinfectante orgánico y rayos UV, las muestras de tejido obtenidas fueron colocadas en papel absorbente, una vez secas se colocó en placas de Petri con medio de cultivo Bacto-Agar (30%) estéril + antibiótico. Las muestras puestas en las placas de Petri fueron selladas con cinta parafilm e incubadas a 25 °C. (Dhingra & Sinclair, 1995).

f. Siembra en medio PDA

Se realizó el seguimiento de las muestras sembradas en agar-agua, al constatar desarrollo de micelio en las muestras, se lo repicó en placas de Petri con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) estéril + antibiótico y se incubó a 25°C. Hasta su desarrollo.

g. Cultivo monospórico

Este procedimiento se realizó con la finalidad de obtener cultivos desarrollados de una espora simple. Para lo anterior, se toma un tubo con 5m de agua destilad estéril y con la ayuda de una aguja de disección se pasa una pequeña proporción del crecimiento de una placa de Petri, se tapa el tubo de ensayo y se agita por 30 segundos, esta suspensión se vierte en una placa de Petri con medio Agar y enseguida se desecha el exceso en un recipiente. Luego, las cajas se incuban de forma vertical a 25°C y se observan diariamente con la ayuda del estereoscopio de precisión hasta ver la germinación de una espora la misma que inmediatamente es transferida a una placa Petri con medio de cultivo PDA, continuando con la incubación hasta el desarrollo total de la colonia (Koneman, 2001).

2. Conservación de Aislados.

a. Criopreservación.

Para la criopreservación se dispensó 2 mL de solución estéril (121 °C, 20 min) cuya composición v/v fue glicerol al 70% y agua destilada, en viales de polipropileno estériles. Las esporas de los hongos, obtenidas por crecimiento en medio Papa Dextrosa Agar (PDA), se suspendieron en la solución estéril, a continuación se sometió la solución a un proceso de congelación gradual y se almacenó a una temperatura de -80 °C.

b. Conservación en PDA

Para la conservación in situ se repicó el aislado puro en placas de Petri con medio PDA + antibiótico y se incubo a 25°C por 7 días, una vez corroborado el crecimiento se almacena en condiciones de temperatura ambiental verificando que estén correctamente selladas con parafilm.

3. Caracterización de los aislados fúngicos.

a. Caracterización Cultural.

Para la caracterización cultural de los aislados de hongos provenientes de Aliso, primero se repico de un aislado monospórico, en medio de cultivo PDA y se incubo por 7 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2$. Posteriormente para la descripción macroscópica se tuvo en cuenta: el color de la colonia en el anverso y el reverso de la placa, la textura, el crecimiento lineal (expresado en mm/día) y el crecimiento aéreo. En el caso del crecimiento micelial lineal de cada aislamiento, se midió el diámetro de las colonias (Una medición diaria hasta el séptimo día); mientras que la coloración de la colonia anverso y reverso se obtuvo utilizando una guía digital de colores PANTONE.

b. Caracterización Morfológica

Para la identificación de los aislados fúngicos se prepararon láminas portaobjeto, y se utilizó una gota de lactofenol con azul de algodón la cual fue colocada sobre una porción de micelio. Se examinaron al microscopio las estructuras reproductivas de los diferentes aislados (Rivas, 2015).

Para la clasificación de las especies de hongos según los criterios morfológicos, utilizamos las siguientes claves: Gerlach y Nirenberg (1982), Nelson *et al.*, (1983), Barnett y Hunter (1998), Balmas *et al.*, (2000) así como Leslie y Summerell (2006) citadas por (Rivas, 2015).

4. Evaluación del crecimiento radial de los aislados fúngicos.

Para la evaluación del crecimiento radial de los aislados fúngicos obtenidos se realizó un diseño experimental Completamente al Azar con tres repeticiones. Los datos se tomaron todos los días durante el transcurso de 7 días, a la misma hora, con la ayuda de un pie de rey digital.

5. Evaluación de mecanismos biocontroladores

a. Inhibición de Crecimiento

Para la evaluación de la capacidad biocontroladora se desarrolló pruebas de antagonismo de cultivo dual. Para lo cual se colocó en un plato de Petri de 90mm contenido de 20ml de Agar Papa Dextrosa (PDA) un disco de 5mm de diámetro de PDA con micelio del patógeno y en el extremo opuesto otro disco de 5mm de diámetro de PDA con micelio del antagonista a 5cm aproximadamente entre ellos (Howell, 2003). Se sembró en cajas separadas el patógeno y el antagonista, los cuales correspondieron a los controles; posteriormente se incubaron a 27°C haciéndose mediciones cada 24 horas del crecimiento radial del micelio de la colonia de los hongos.

Se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), empleando la fórmula de (Ezziyyani et al, 2004), $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$, donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

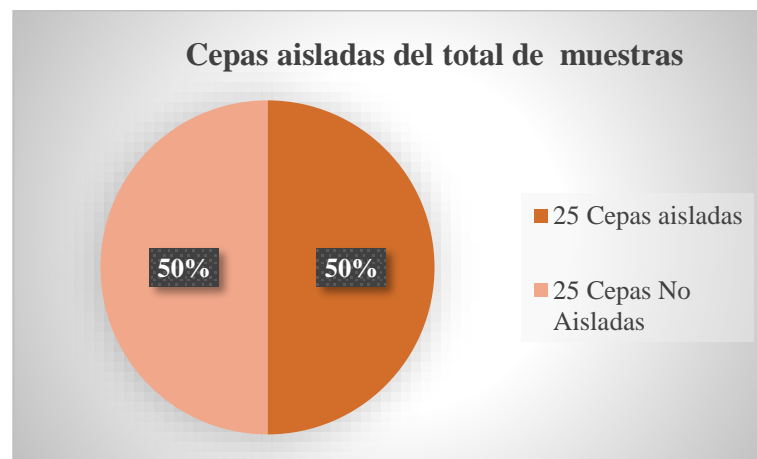
VI. RESULTADOS Y DISCUSION

A. PROCESO DE AISLAMIENTO DE HONGOS FILAMENTOSOS

1. Cepas aisladas

Luego de seguir todos los protocolos y metodologías establecidas en esta investigación se logró llegar a obtener 25 aislados monospóricos de hongos filamentosos de un total de 50 muestras recolectadas en los 5 Viveros Forestales de la Provincia de Chimborazo.

Para llegar hasta el cultivo monospórico de estos aislados tuvimos que pasar todas las etapas preliminares en donde algunas cepas no crecieron en el medio de cultivo utilizado y otras finalmente se perdieron por una contaminación de ácaros sufrida.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Gráfico 2. Cepas monospóricas aisladas del total de muestras recolectadas.

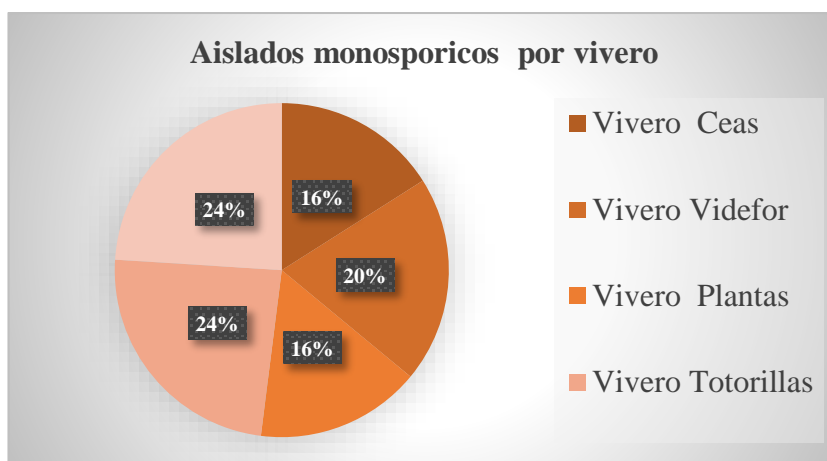
De acuerdo a lo establecido en la metodología cada una de las muestras debe estar correctamente etiquetada como lo mostramos a continuación en la tabla 2. El código de cada aislado se lo maneja desde su ingreso al laboratorio hasta su conservación para no perder material ni confundir cepas. Es importante contar con una base de datos manual y digital que lleve detalladamente cada una de las etapas de aislamiento y conservación de aislados.

Tabla 2. Códigos de aislados monospóricos.

Vivero	Código de Aislados Monospóricos					
Ceas	MC1	MC3	MC5	MC8		
Videfort	MD1	MD2	MD3	MD5	MD6	
Plantas	P3A	P3B	MP6	MP10		
Totorillas	MT2	MT5	MT6	MT8	MT9	MT10
Villagómez	MV2	MV3	MV4	MV5	MV8	MV10

Elaborado por (Guerra, 2019).

De acuerdo al número de aislados obtenidos por vivero podemos determinar que los Viveros Totorillas y Villagómez presentaron el número de aislamientos más alto de todos los viveros ya que de cada uno de estos se pudo obtener 6 aislados monospóricos correspondientes, mientras que los Viveros Ceas y Plantas aportaron el menor número de aislados con un total de 4 aislados cada uno.

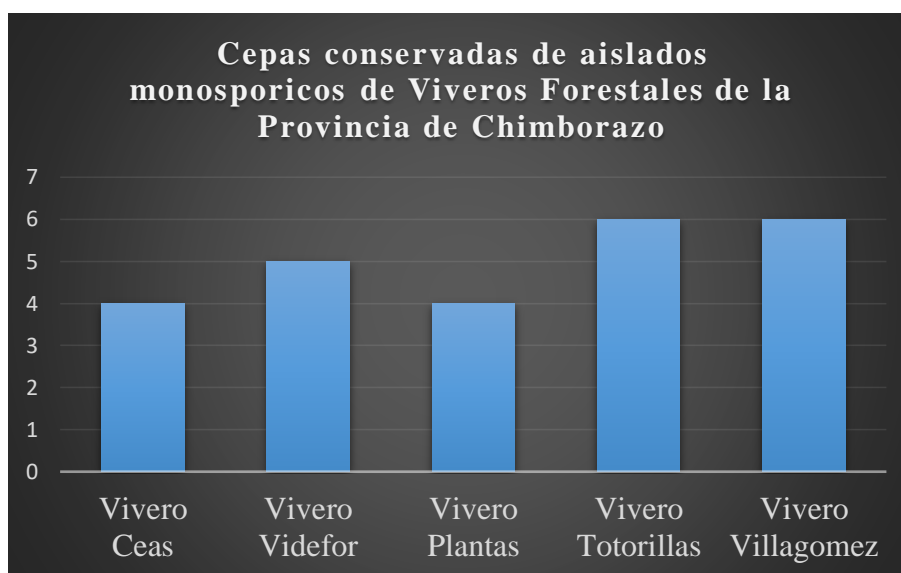


Elaborado por (Guerra, 2019).

Gráfico 3. Aislados monospóricos por Vivero.

2. Cepas Conservadas

Se conservaron un total de 25 aislados monospóricos provenientes de Viveros Forestales de la Provincia de Chimborazo para lo cual se utilizó los dos métodos de conservación, tanto la criopreservación utilizando Glicerol y el método de conservación en cajas Petri con medio de cultivo PDA a temperatura ambiente con repiques frecuentes para evitar el envejecimiento y pérdida de material.



Elaborado por (Guerra, 2019).

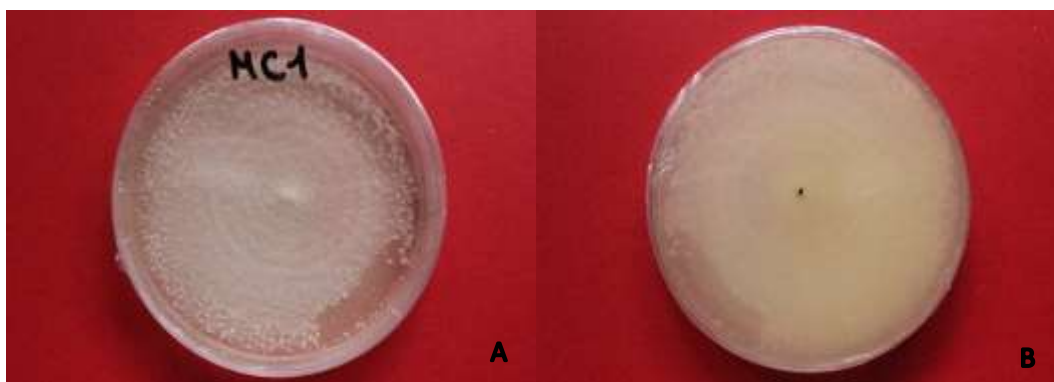
Gráfico 4. Cepas de aislados monospóricos conservados

B. PROCESO DE CARACTERIZACION DE AISLADOS FUNGICOS.

1. Caracterización Cultural y Morfológica de los aislados fúngicos.

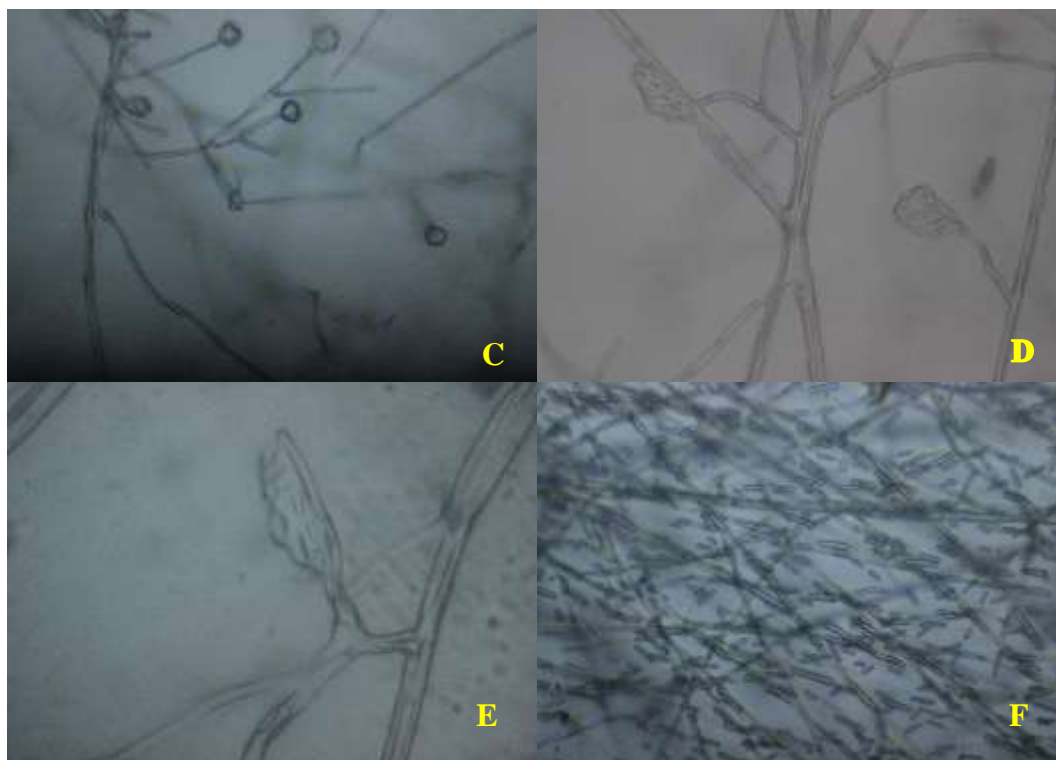
a. Vivero Ceas

AISLADO MC1



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 1. Aislado MC1 (A) anverso y (B) reverso.



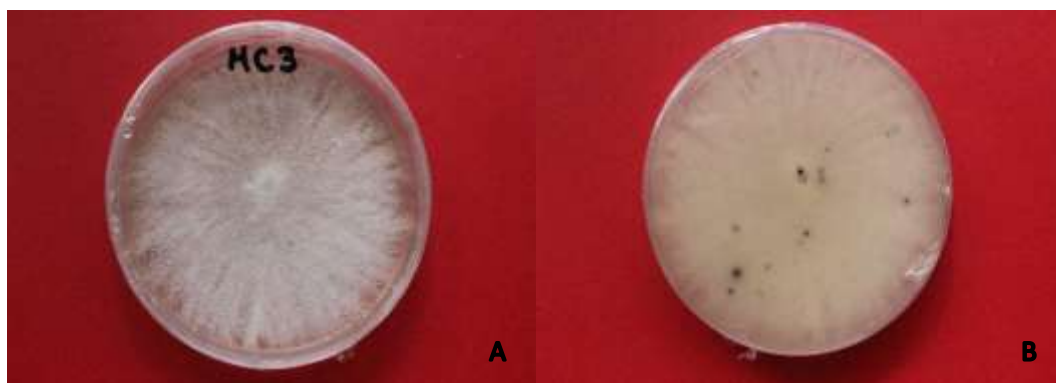
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 2. Aislado MC1 Microcultivo observado al microscopio. A, B y D lente de 40X y C lente de 100X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada, de margen entero y textura algodonosa. Presenta anillos de crecimientos definidos. No presenta pigmentaciones. El anverso (A) es de color blanco y violeta (Pantone 2562C). En el cual se observa la formación de esclerocios y exudaciones de color transparente. El reverso (B) de color crema suave (Pantone 155C).

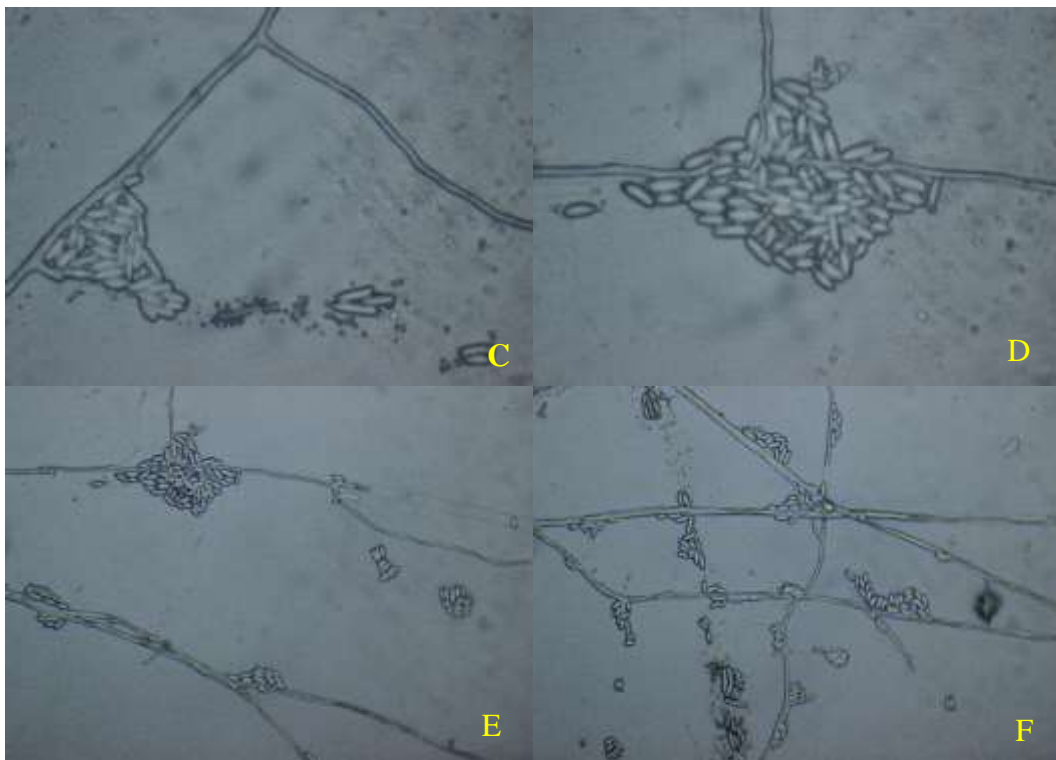
Las hifas presentan características cenocíticas, además presentan clamidosporas (C) que alojan las microconidias, en las fotografías (D y E) se observó como las microconidias salen de las ascosporas, en la fotografía (F) se observó la abundante presencia de microconidias en el medio. Las microconidias son de forma alargada ovoide. No se observó presencia de macroconidias.

AISLADO MC3



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 3. Aislado MC3 (A) anverso y (B) reverso.



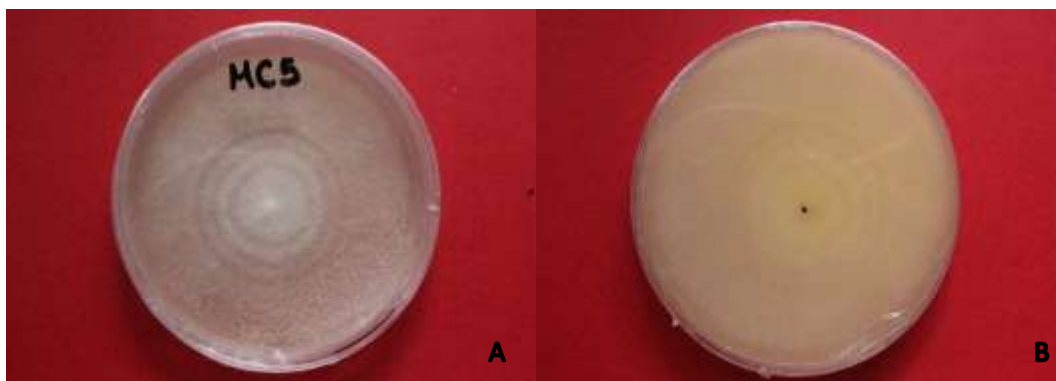
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 4. Aislado MC3 Microcultivo observado al microscopio. A y B lente de 40X, C y D lente de 100X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, plana, de margen filamentosos. Presenta una textura aterciopelada, con surcos radiados. No presenta pigmentación ni exudados. El anverso (A) es de color blanco. El reverso (B) es de color violeta opaco (Pantone 7439 C). Se identificó además la presencia de esclerocios.

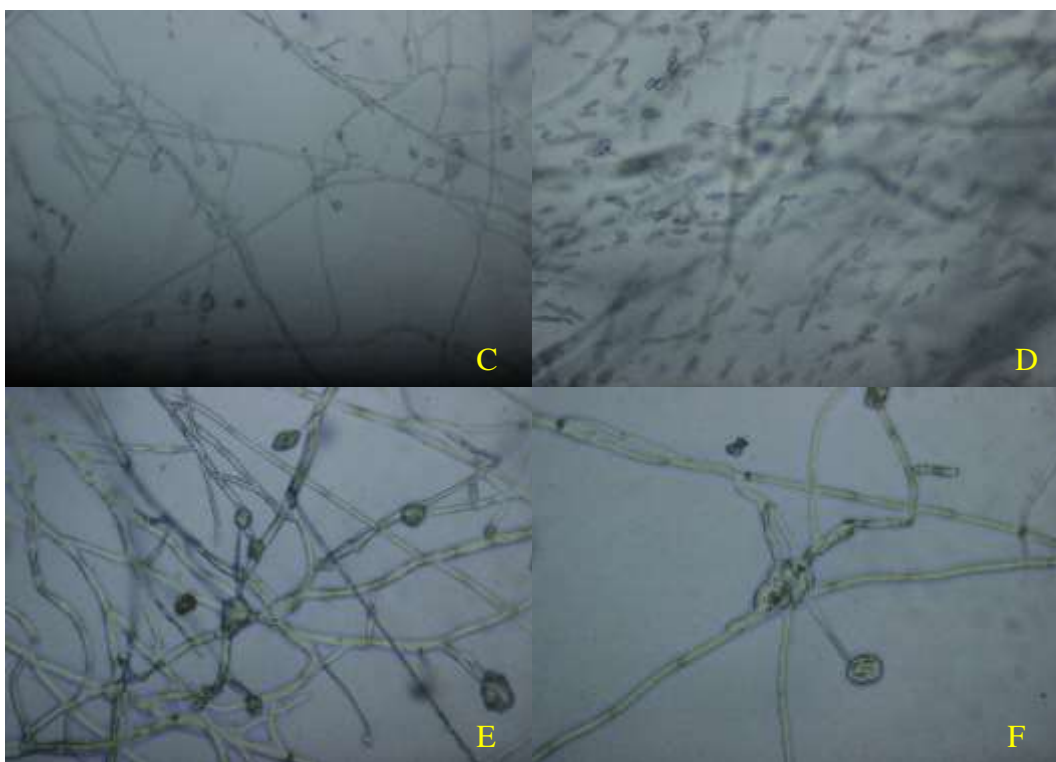
En el microscopio se identificó el crecimiento de hifas cenocíticas, y la presencia de una gran cantidad de microconidias que salen de las ascosporas.

AISLADO MC5



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 5. Aislado MC5 (A) anverso y (B) reverso.



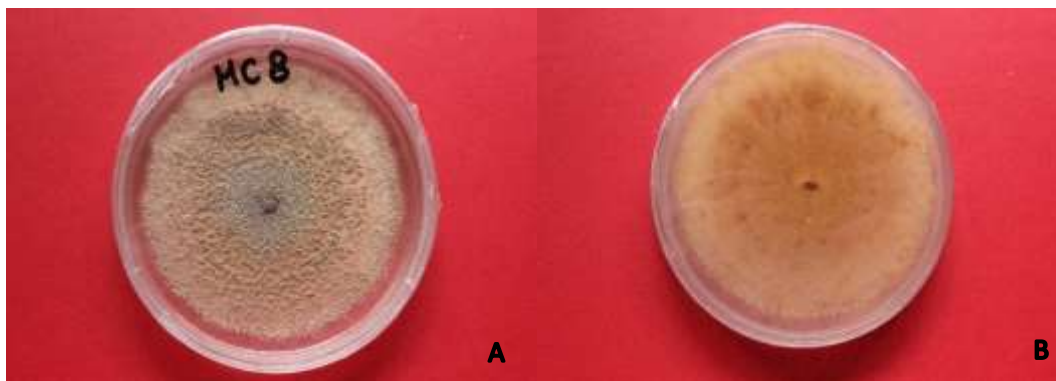
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 6. Aislado MC5 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X y B, C y D lente de 40X.

Colonia de rápido crecimiento de forma circular, elevada, de margen entero, de textura algodonosa. No presenta pigmentos ni exudaciones. El anverso (A) de color blanquecino y el reverso (B) de color crema suave (Pantone 155 C).

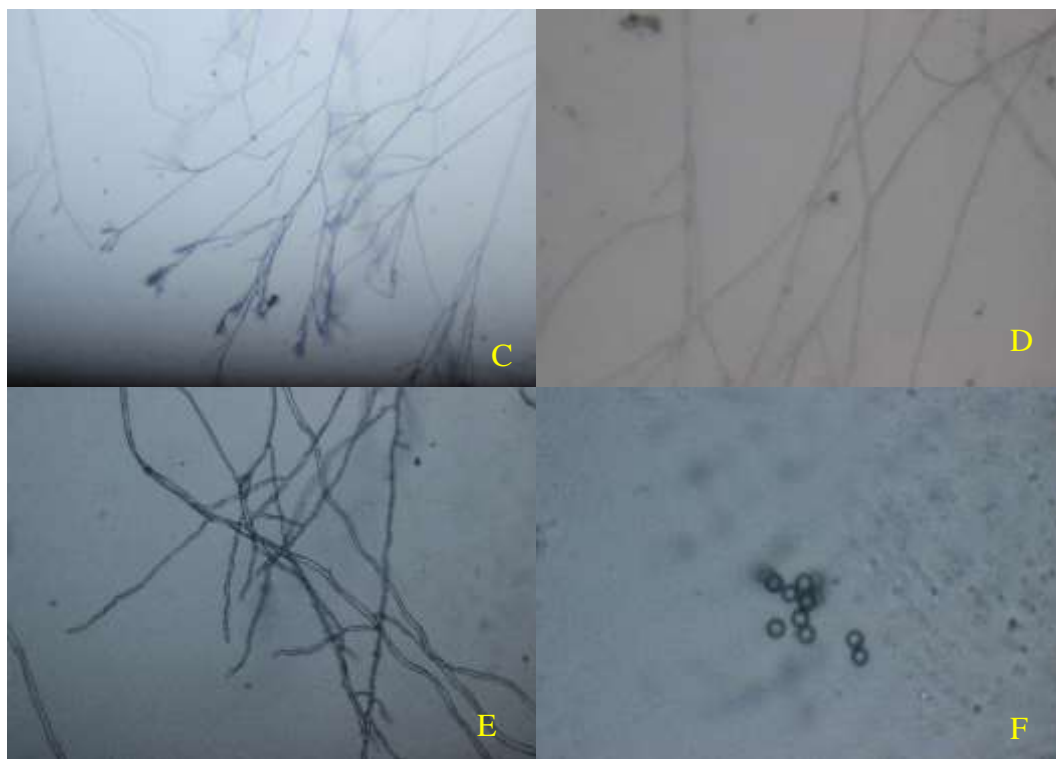
En el microcultivo se logró observar hifas cenocíticas, presencia de clamidosporas y gran cantidad de microconidios de forma ovalada alargada.

AISLADO MC8



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 7. Aislado MC8 (A) anverso, y (B) reverso.



Elaborado por (Guerra, 2019).

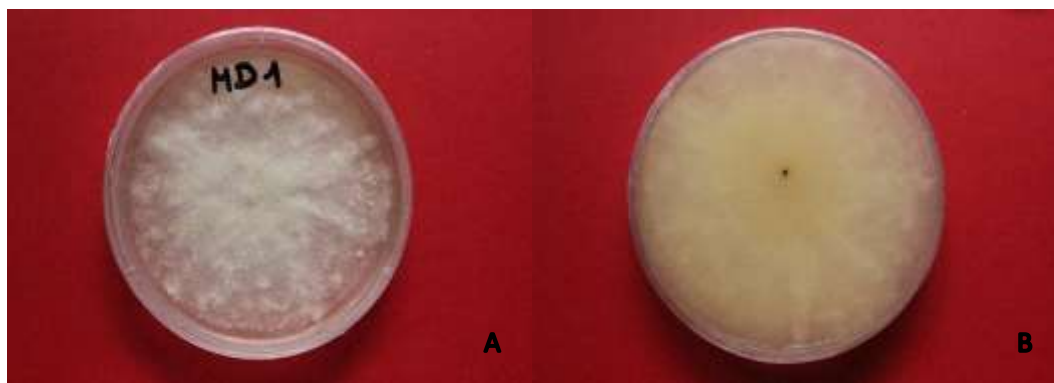
Fotografía 8. Aislado MC8 Microcultivo observado al microscopio. A lente de 10X, B, C y D lente de 40X.

El aislado presenta una colonia de crecimiento moderado de forma circular, plana, de margen entero, presenta una textura granulosa. No tiene pigmentación ni exudados. El anverso (A) presenta un color marrón (Pantone 4655C). Mientras que el reverso (B) un color café brillante (Pantone 731C).

En microcultivo solo se logró observar crecimiento hifal que se caracteriza por ser liso y no tabicado, además presenta polifialides y se observaron pequeñas microconidias circulares.

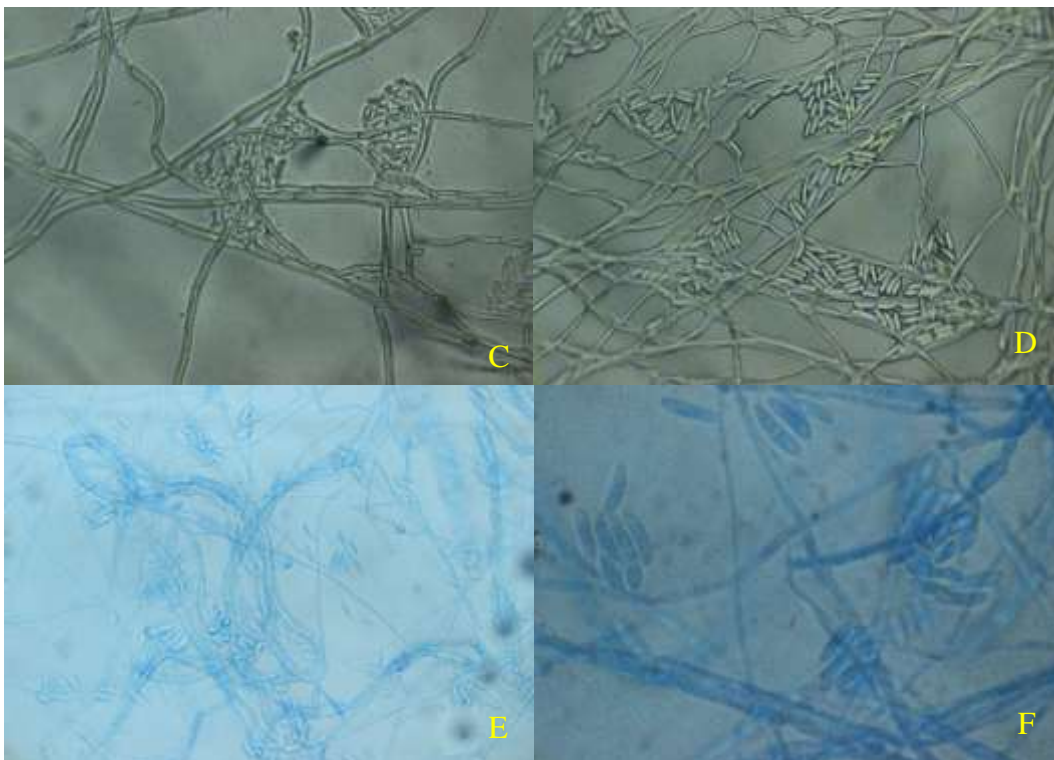
b. Vivero Videfor

AISLADO MD1



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 9. Aislado MD1 (A) anverso, y (B) reverso.



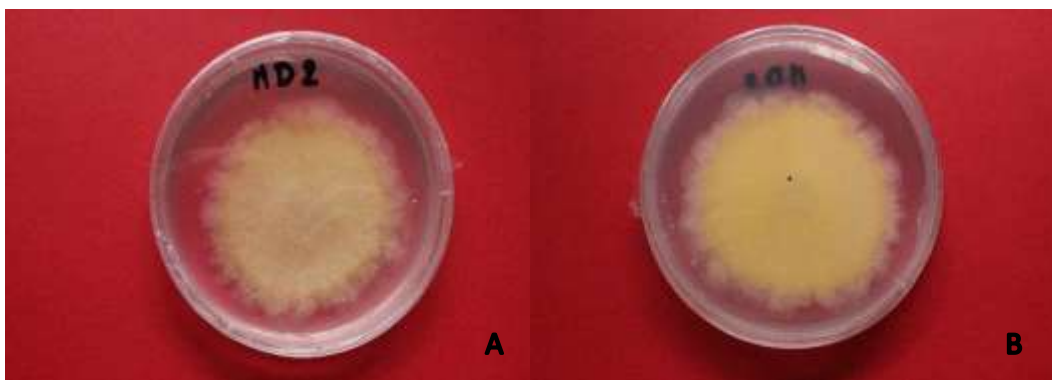
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 10. Aislado MD1 Microcultivo observado al microscopio. A y B lente de 40X, C y D lente de 100X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada, de margen entero, presenta una textura aterciopelada algodonosa. No presenta pigmentación en el medio ni exudados. El anverso (A) de color crema suave (Pantone 155C), y el reverso (B) de color crema de tonalidad más brillante (Pantone 134C).

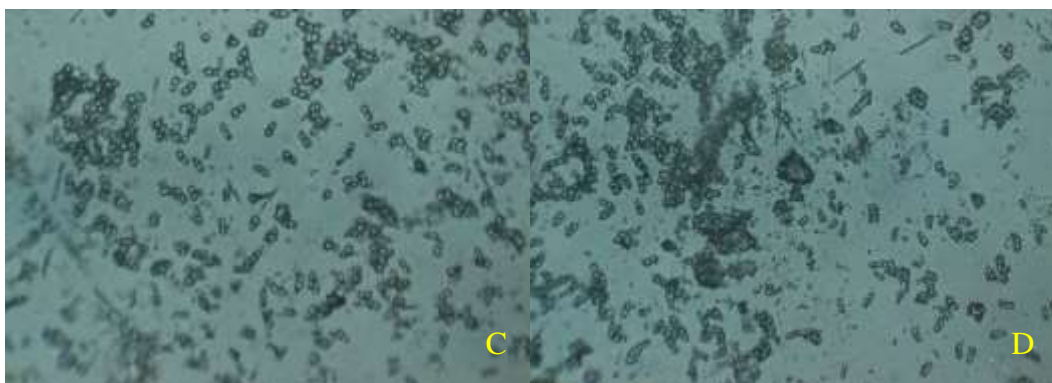
En microcultivo se logró observar el crecimiento hifal cenocítico (C), la presencia de clamidosporas (E), abundantes microconidias ovaladas y alargadas (D) y macroconidias en forma de media luna.

AISLADO MD2



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 11. Aislado MD2 (A) anverso y (B) reverso.



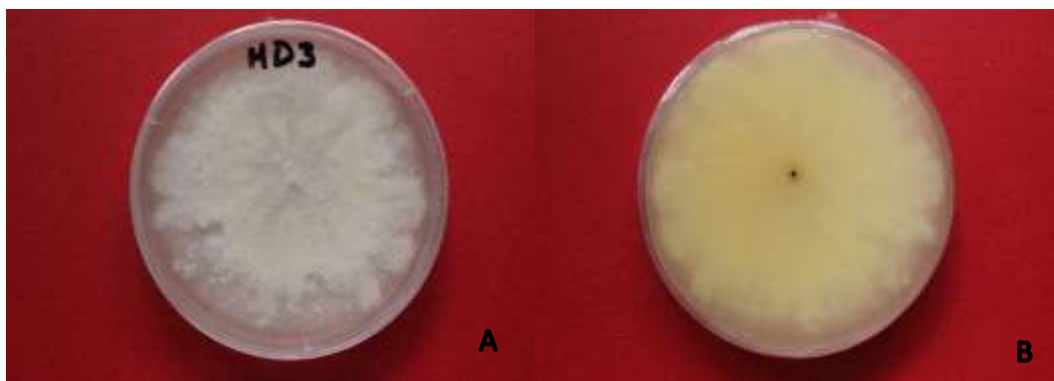
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 12. Aislado MD2. Microcultivo observado al microscopio. A y B lente de 40X.

Colonia de crecimiento rápido de forma irregular, elevada, de margen irregular, presenta una textura vellosa algodonosa, no presenta pigmentación ni exudados, de crecimiento invasivo. El anverso (A) de color crema suave (Pantone 155C) y el reverso (B) de color crema brillante (Pantone 134 C).

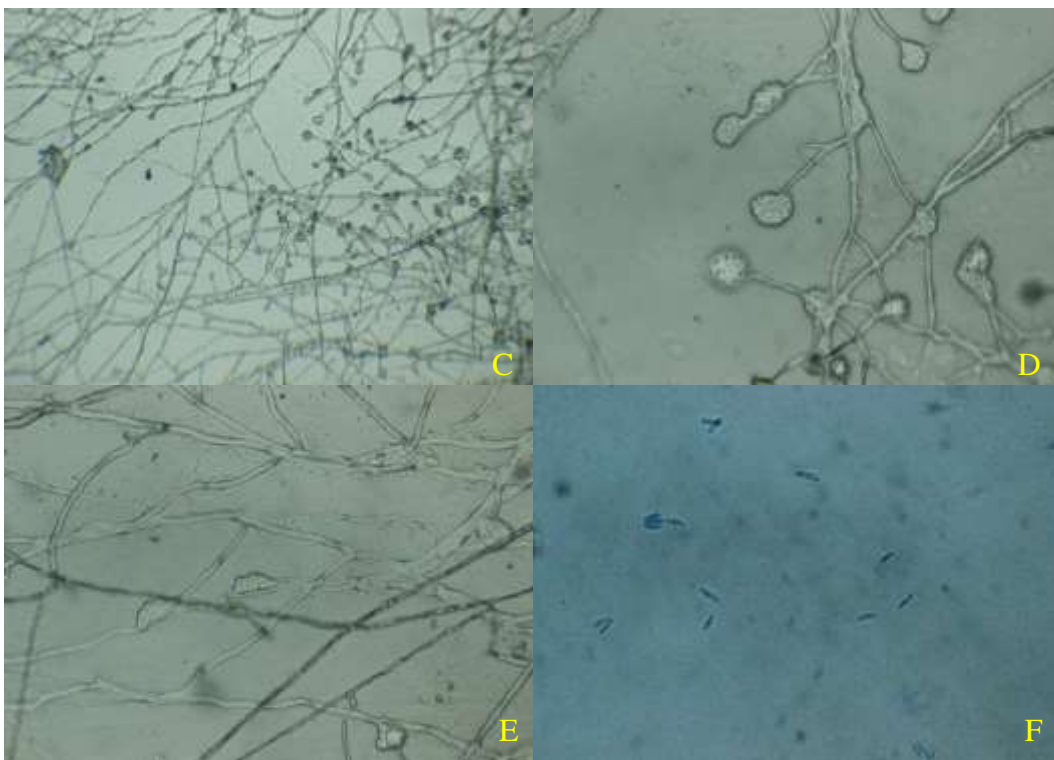
En microcultivo solo se logró observar pequeñas esporas que se agrupan en pares y trios. Lo que dificulta su identificación morfológica.

AISLADO MD3



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 13. Aislado MD3 (A) anverso y (B) reverso.



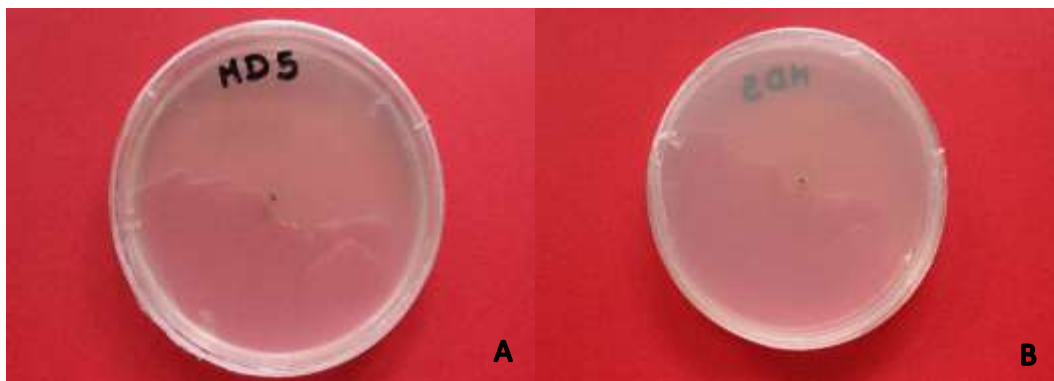
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 14. Aislado MD3 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X y B, C y D lente de 40X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada, de margen entero, presenta una textura aterciopelada algodonosa. No presenta pigmentación en el medio ni exudados. El anverso (A) de color crema suave (Pantone 155C), y el reverso (B) de color crema de tonalidad más brillante (Pantone 134C).

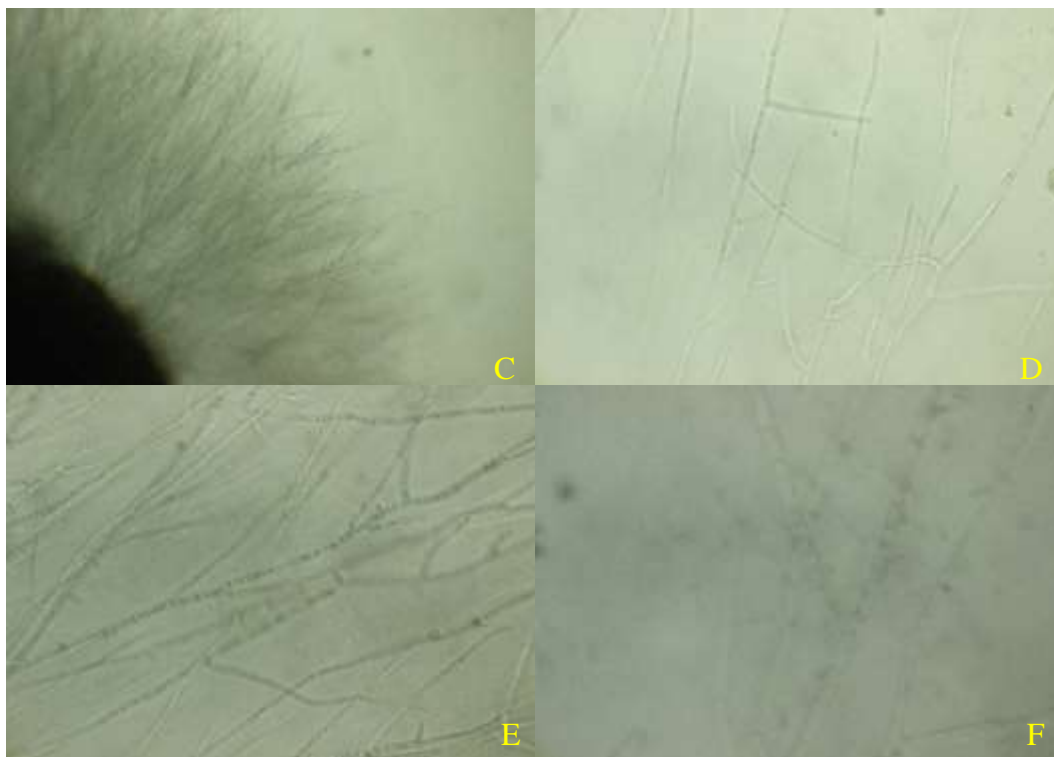
En microcultivo se observó el crecimiento hifal cenocítico (C), presencia de clamidisporas (D y E), además se logró observar macroconidios (F).

AISLADO MD5



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 15. Aislado MD5 (A) anverso y (B) reverso.



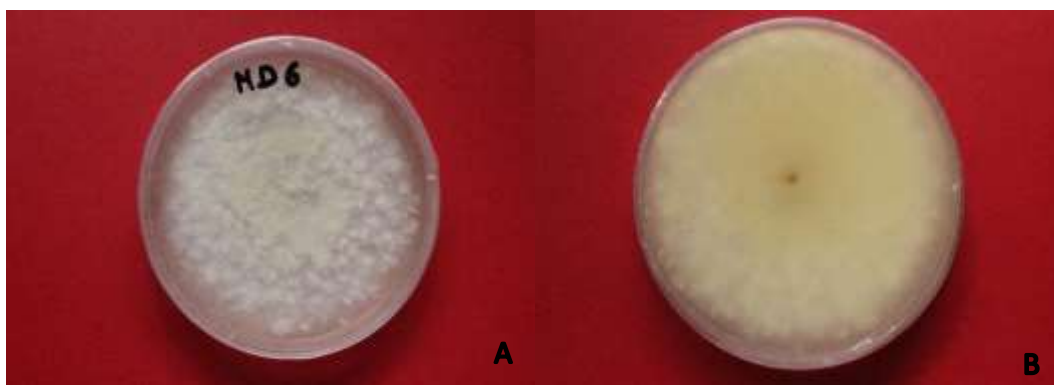
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 16. Aislado MD5 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X y B, C y D lente de 40X.

Colonia de crecimiento muy lento de forma irregular, elevada, de margen irregular presenta una textura algodonosa. No presenta exudaciones. Al entorno del margen va tornando el medio de color café brillante. El anverso (A) de color café (Pantone 161) hacia el centro y hacia el borde se va tornando más negro. El reverso (B) de color negro brillante (Pantone Black 6 C).

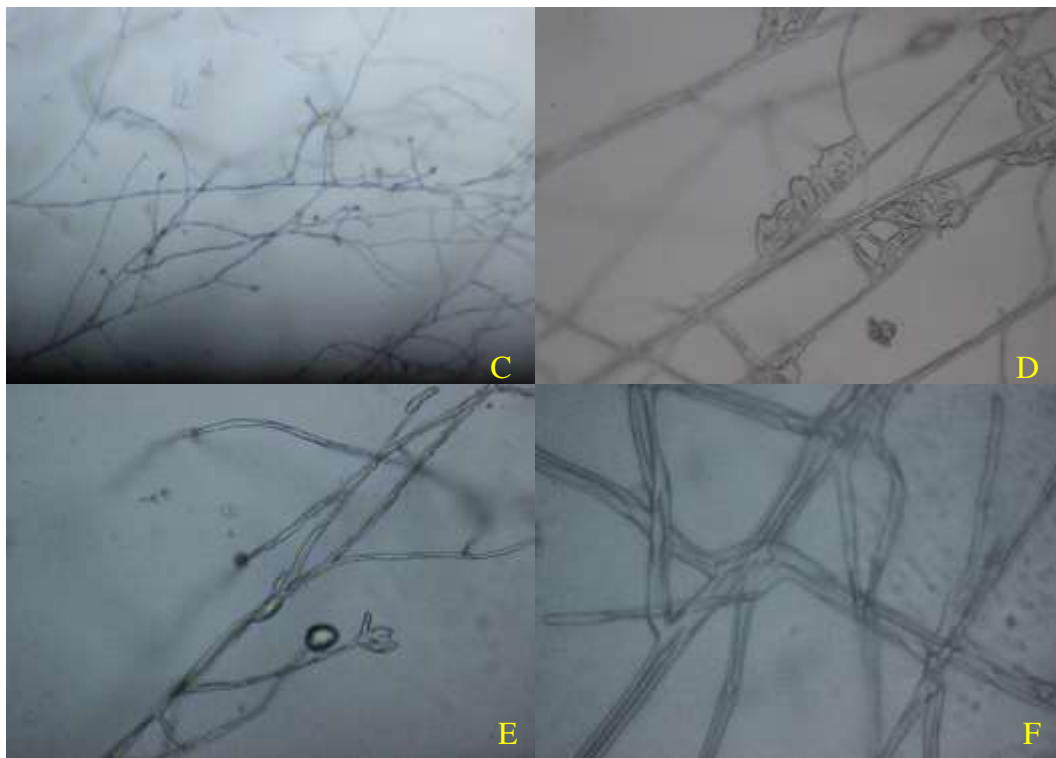
En microcultivo se logró observar crecimiento micelial (C), y las hifas que se caracterizan por ser septadas (D, E, F). No se logró observar estructuras reproductoras.

AISLADO MD6



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 17. Aislado MD6 (A) anverso y (B) reverso.



Elaborado por (Guerra, 2019).

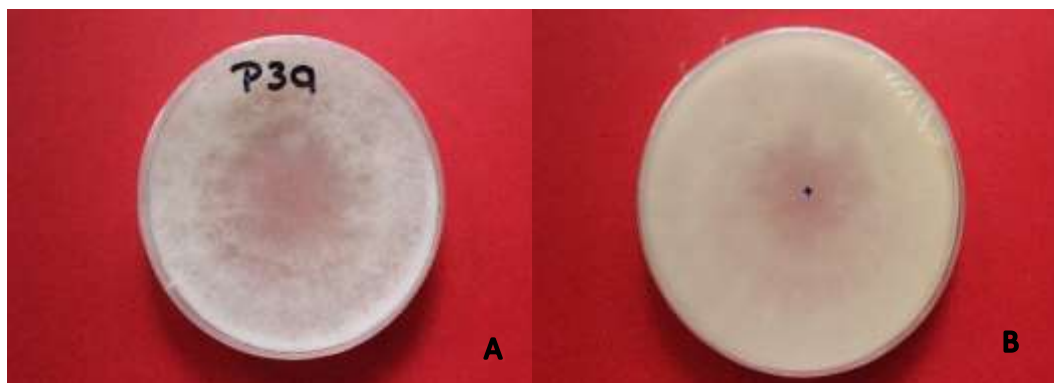
Fotografía 18. Aislado MD6 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X B y C lente de 40X y D lente de 100X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada, de margen entero, presenta una textura aterciopelada algodonosa. No presenta pigmentación en el medio ni exudados. El anverso (A) de color crema suave (Pantone 155C), y el reverso (B) de color crema de tonalidad más brillante (Pantone 134C).

En microcultivo se observó la presencia de estructuras como clamidosporas (C, E), microconidias (D) además de hifas cenocíticas (F).

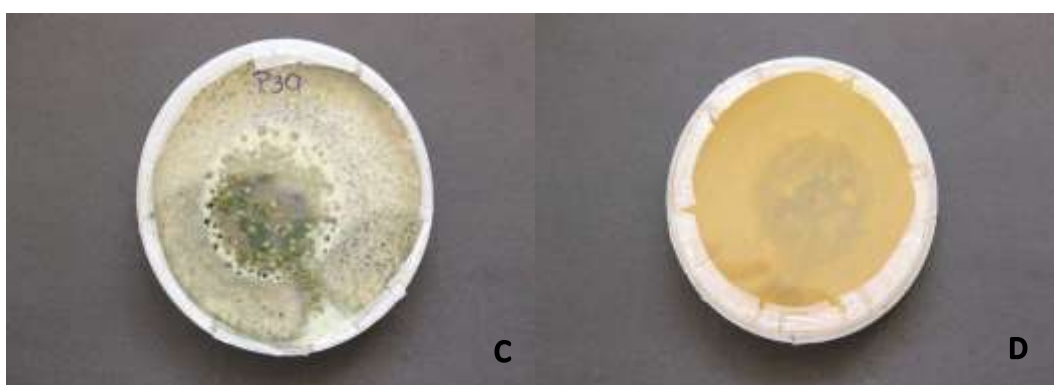
c. Vivero Plantas

AISLADO P3A



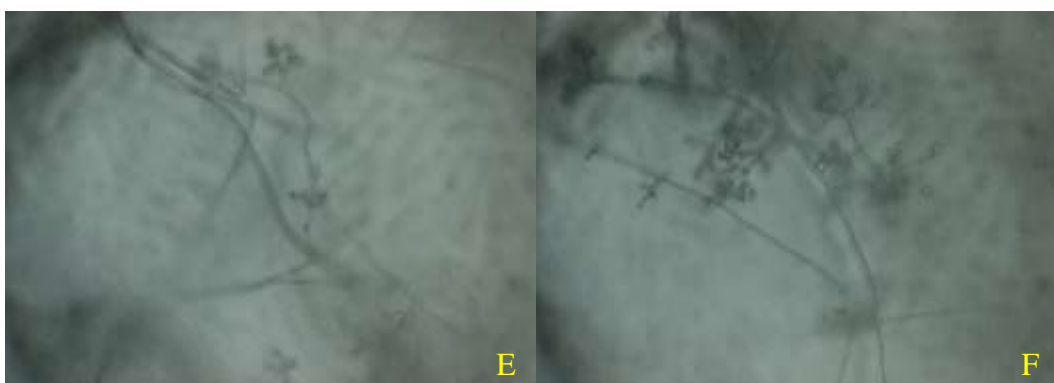
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 19. Aislado P3A, (A) anverso y (B) reverso al 3 día.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 20. Aislado P3A, (C) anverso, y (D) reverso al 7 día.



Elaborado por (Guerra, 2019).

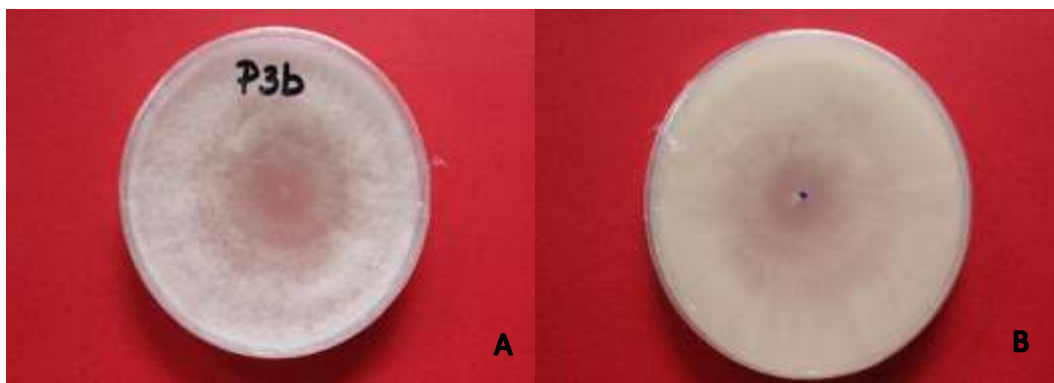
Fotografía 21. Aislado P3A microscopio.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada de superficie que presenta anillos de crecimiento definidos, textura pulverulenta algodonosa. El anverso (A) a los primeros días es blanco pero luego se va tornando entre verde opaco y blanquecino (C).

(PANTONE 5773C) presenta exudados de color negro en forma de gotas. Y el reverso (D) de color marrón claro (Pantone 146 C).

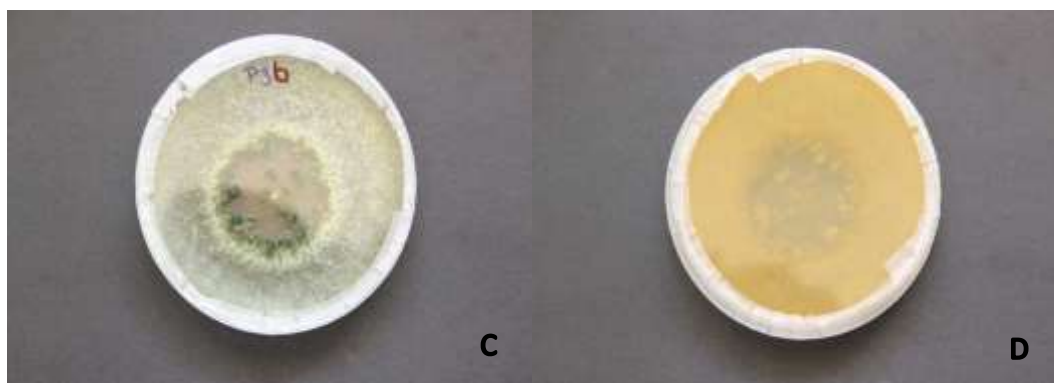
En microcultivo se puede observar crecimiento hifal cenocítico, se observan conidióforos erectos, hialinos, ramificados y no verticilados, se presentan en grupos o solitarios. Las fiálides presentan forma de pera, únicas o en grupos, hinchadas en la región central y delgada en el ápice.

AISLADO P3B



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 22. Aislado P3B, (A) anverso y (B) reverso al 3 día.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 23. Aislado P3B, (C) anverso, y (D) reverso al 7 día.



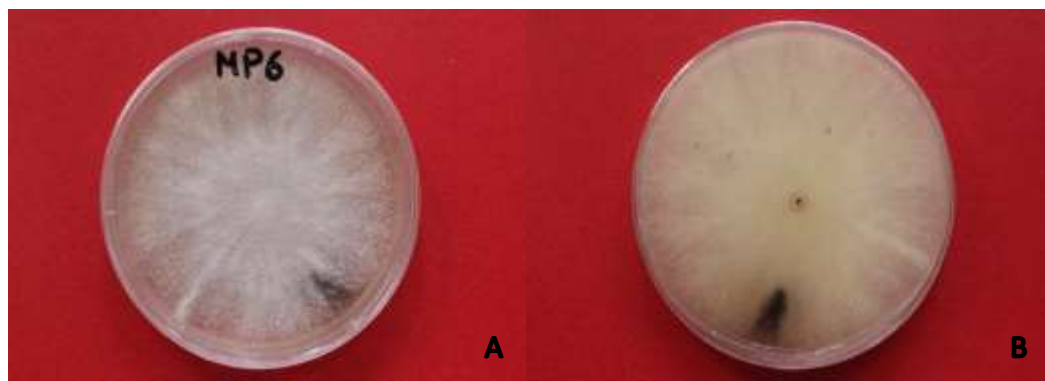
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 24. Aislado P3B microscopio.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada de superficie que presenta anillos de crecimiento definidos, textura pulverulenta algodonosa. El anverso (A) a los primeros días es blanco pero luego (C) se va tornando entre verde opaco y blanquecino. (PANTONE 5773C) y el reverso (D) de color marrón claro (Pantone 146 C).

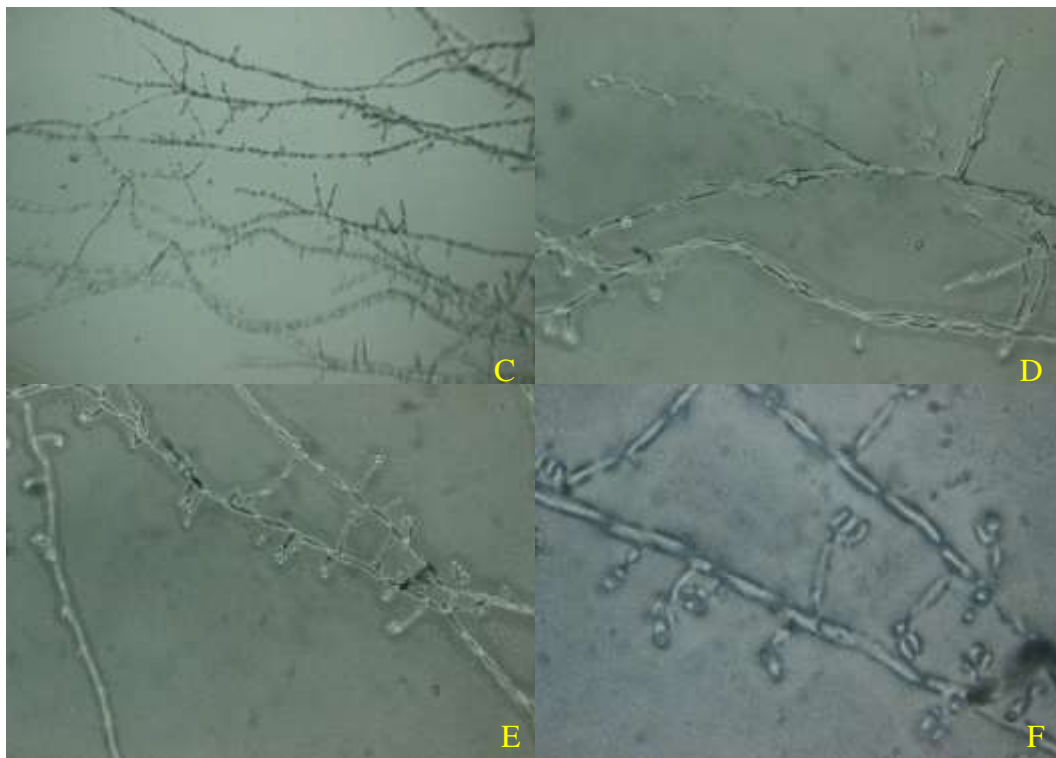
En microcultivo se pudo observar estructuras del tipo de conidias hialinas uniceluladas, ovoide en conidióforo hialino largo no verticilado, nace en centros pequeños, hifas no septadas de crecimiento acelerado.

AISLADO MP6



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 25. Aislado MP6, (A) anverso y (B) reverso.

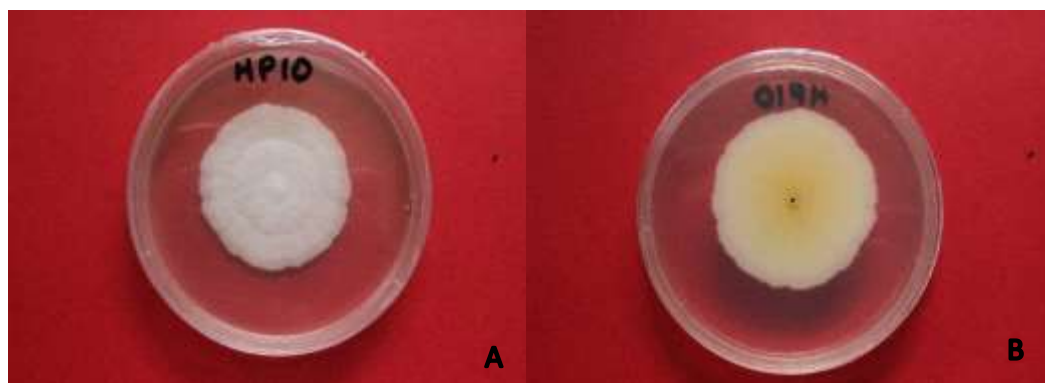


Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 26. Aislado MP6 Microcultivo observado al microscopio. A lente 10X B y C lente de 40X y D lente de 100X.

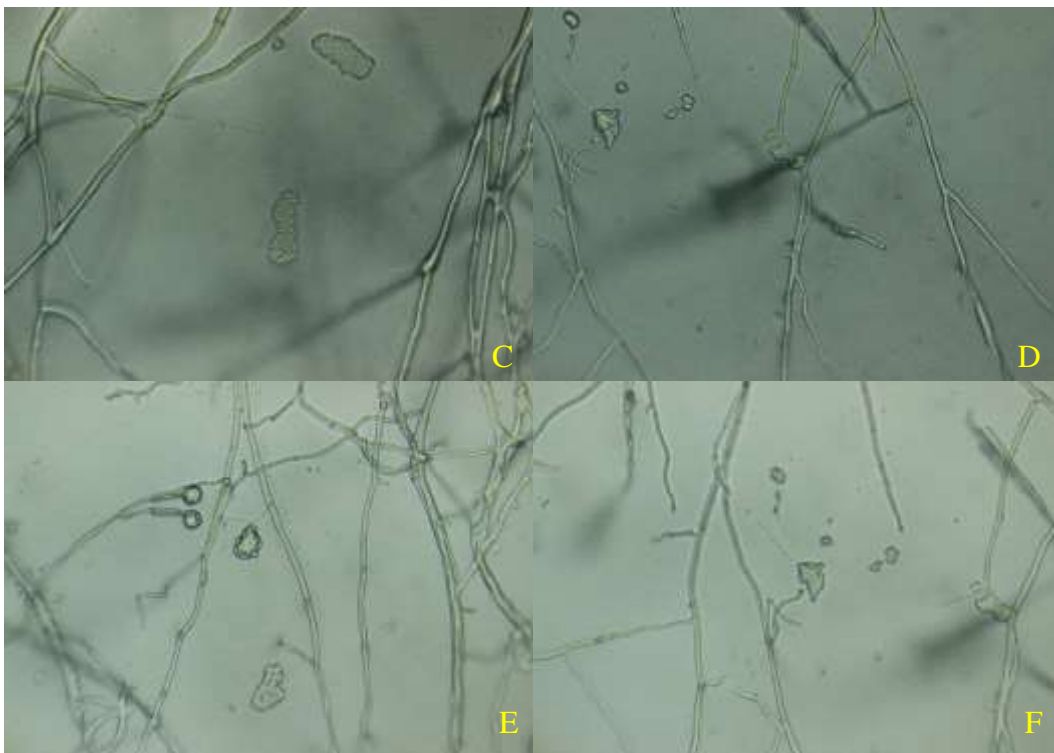
Colonia de rápido crecimiento de forma circular, apenas elevada, de margen irregular. Presenta una textura aterciopelada algodonosa. No presenta pigmentación ni exudaciones. El anverso (A) de color gris (Pantone 7527 C). El reverso (B) de color Crema suave (Pantone 155 C). En microcultivo se observó hifas septadas y polifialides.

AISLADO MP10



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 27. Aislado MP10, (A) anverso y (B) reverso.



Elaborado por (Guerra, 2019).

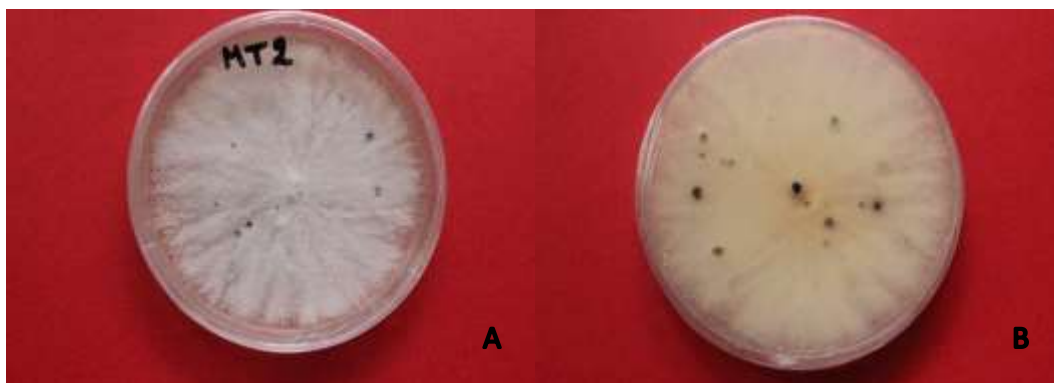
Fotografía 28. Aislado MP10 Microcultivo observado al microscopio en lento 40X.

Colonia de crecimiento lento, de forma circular, plana y extendida de margen entero y superficie con anillos de crecimiento superpuestos, de textura aterciopelada sin presencia de pigmentación y exudaciones, el anverso (A) de color blanco (Pantone 427). El reverso (B) presenta un color crema (Pantone 386).

En microcultivo se observó hifas cenocíticas, clamidosporas (E) y agrupaciones de microconidios elípticos.

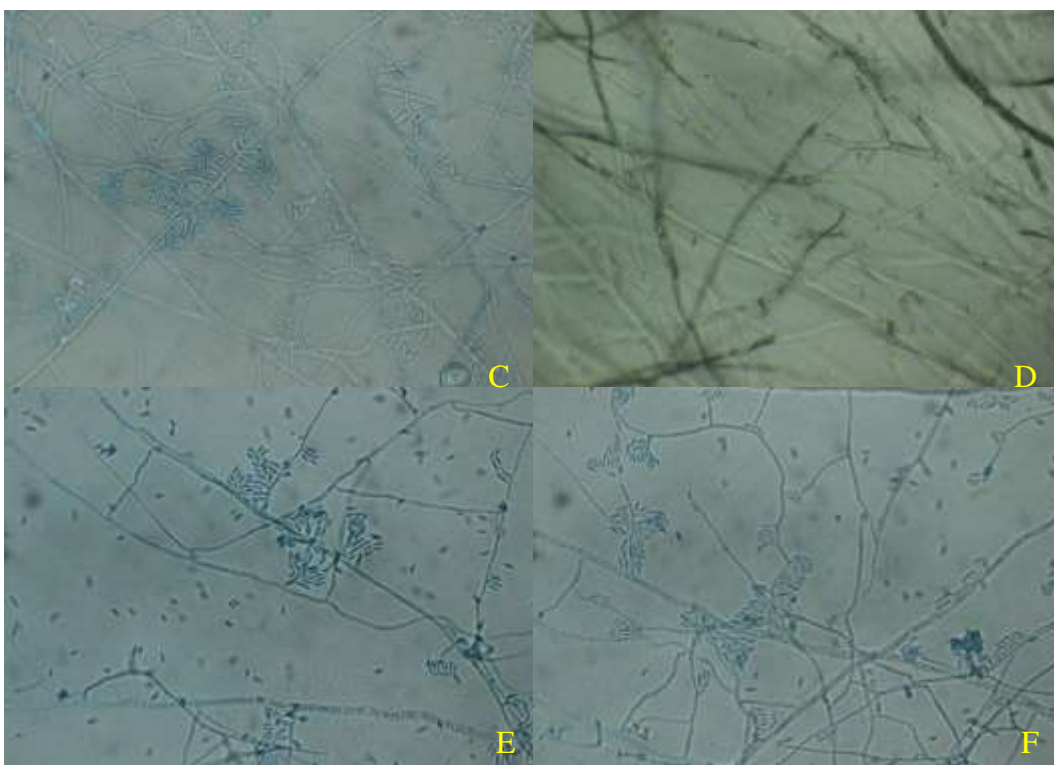
d. Vivero Totorillas

AI SLADO MT2



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 29. Aislado MT2, (A) anverso y (B) reverso.



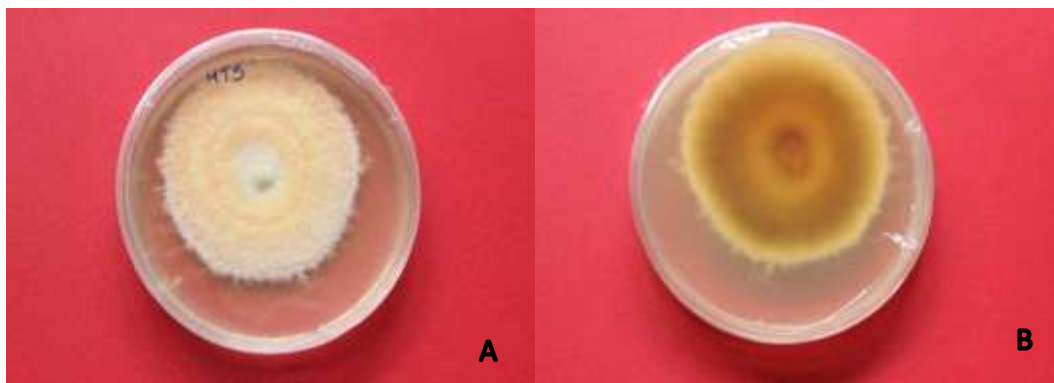
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 30. Aislado MT2 Microcultivo observado al microscopio en lento 40X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, apenas elevada, de margen irregular presenta una textura aterciopelada apenas algodónosa. No presenta pigmentos ni exudados. El anverso (A) de color Gris (pantone 7527 C). Presenta la formación de pequeños esclerocios. El reverso (B) es de color crema suave (Pantone 155 C).

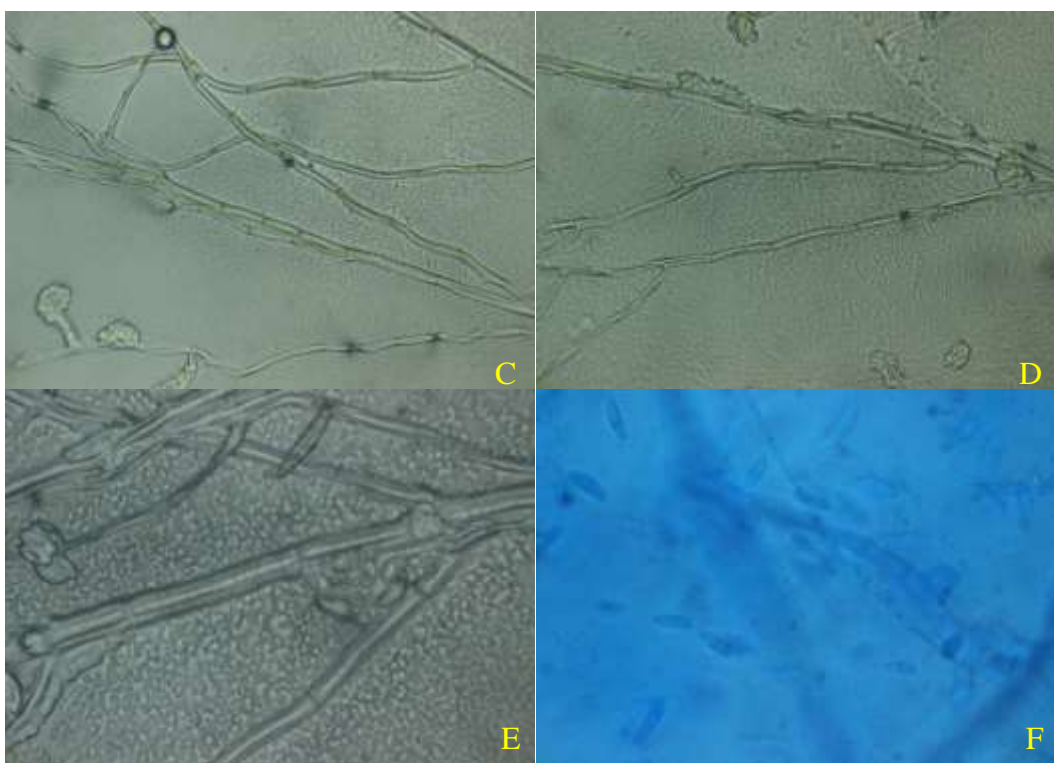
En microcultivo se observó hifas cenocíticas, microconidias elípticas alargadas, macroconidios y clamidiosporas.

AISLADO MT5



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 31. Aislado MT5, (A) anverso, y (B) reverso.



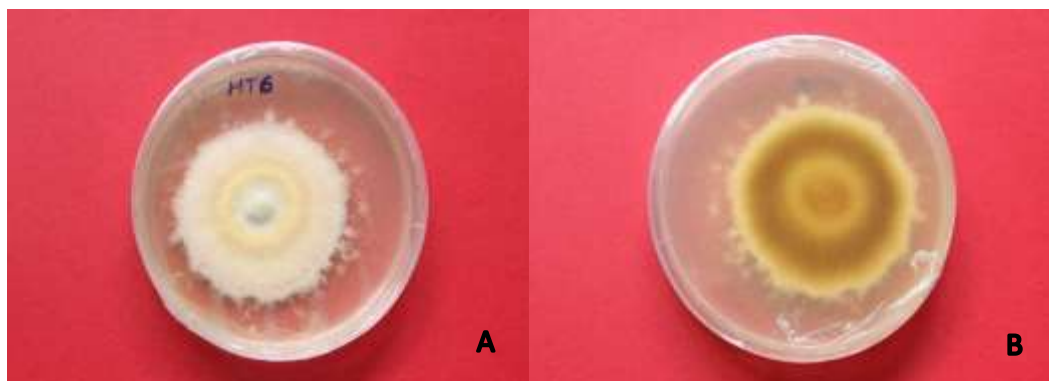
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 32. Aislado MT5. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D con el lente 100X.

Colonia de crecimiento rápido, de forma circular elevada margen entero, de textura algodonosa, no presenta exudaciones, pigmentación en el reverso de color café pardo (Pantone 155C). El anverso (A) de color gris violáceo (Panton 256C) y el reverso (B) de color marrón opaco (Pantone 731).

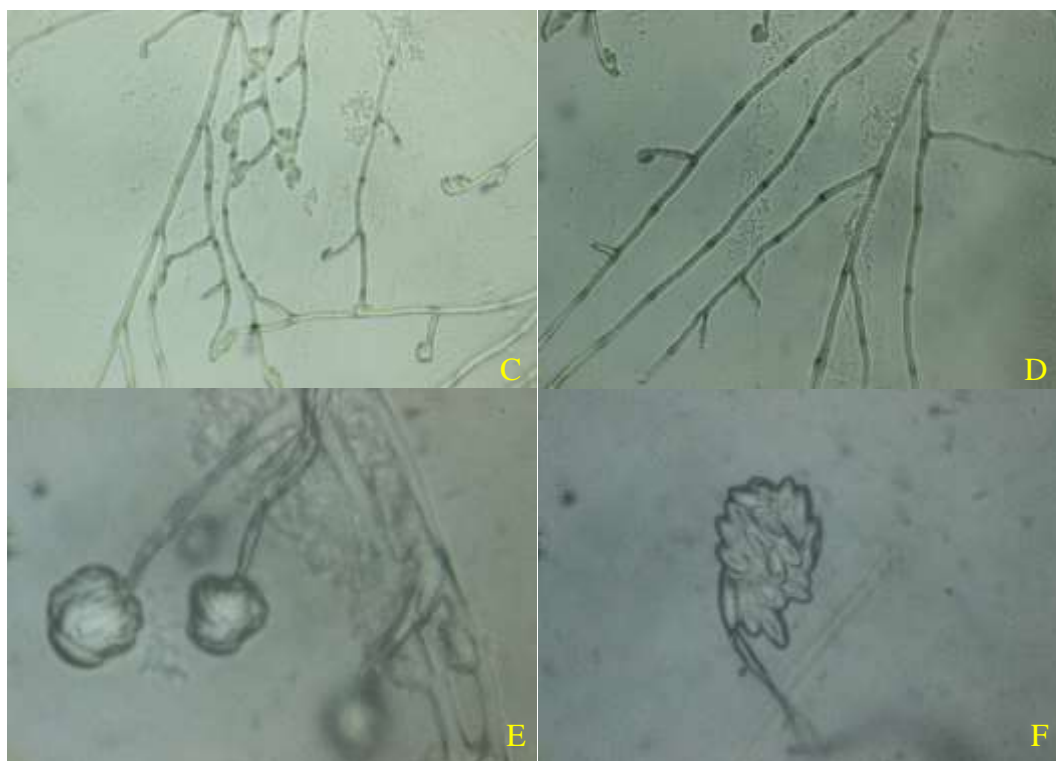
En microcultivo se observó hifas septadas (C), presencia de clamidosporas y conidios monofialidos (D), abundante esporulación y macroconidios (F).

AISLADO MT6



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 33. Aislado MT6, (A) anverso y (B) reverso.



Elaborado por (Guerra, 2019).

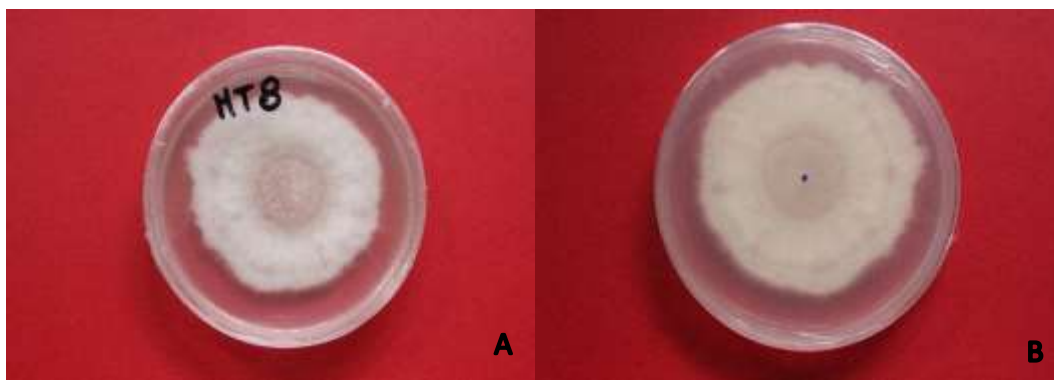
Fotografía 34. Aislado MT6. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D el lente 100X.

Colonia de crecimiento rápido, de forma circular elevada margen entero, superficie con anillos de crecimiento definidos, de textura algodonosa no presenta exudaciones,

pigmentación en el reverso de color café pardo (Pantone 155 C). El anverso (A) de color gris ceniza (Pantone 420 C) y el reverso (B) de color marrón opaco (Pantone 731).

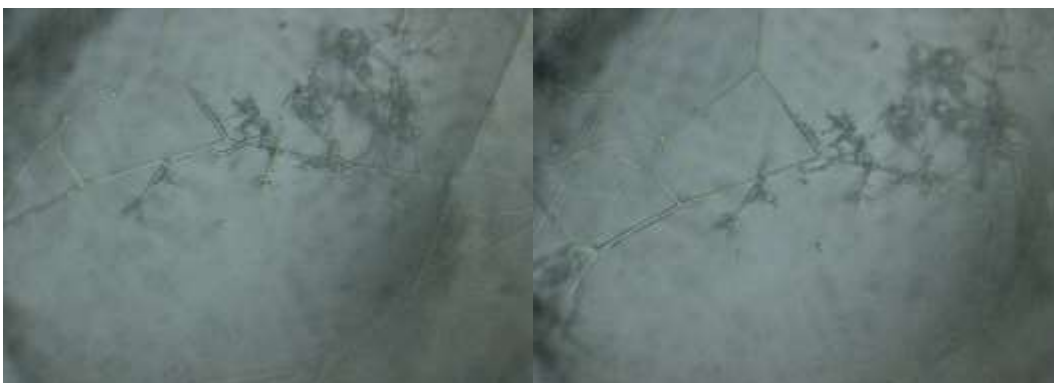
En microcultivo se observó hifas septadas (C, D), presencia de clamidiosporas y abundante esporulación, microconidias elipsoidales alargadas.

AISLADO MT8



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 35. Aislado MT8, (A) anverso y (B) reverso.

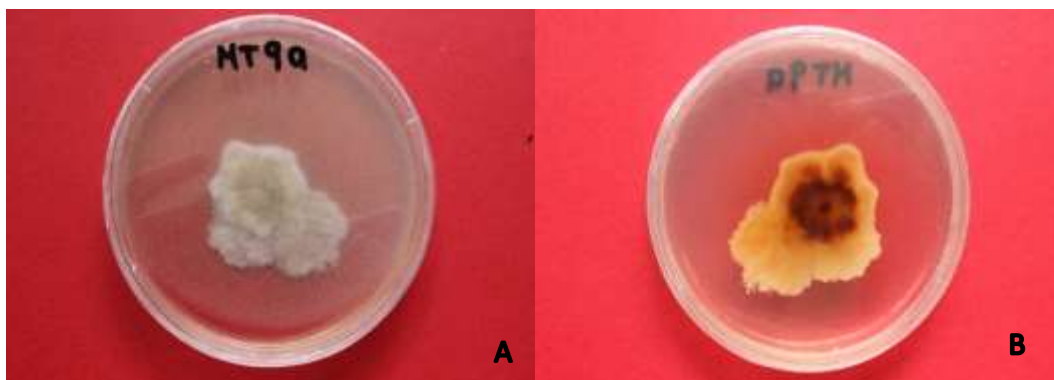


Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 36. Aislado MT8 Microscopio.

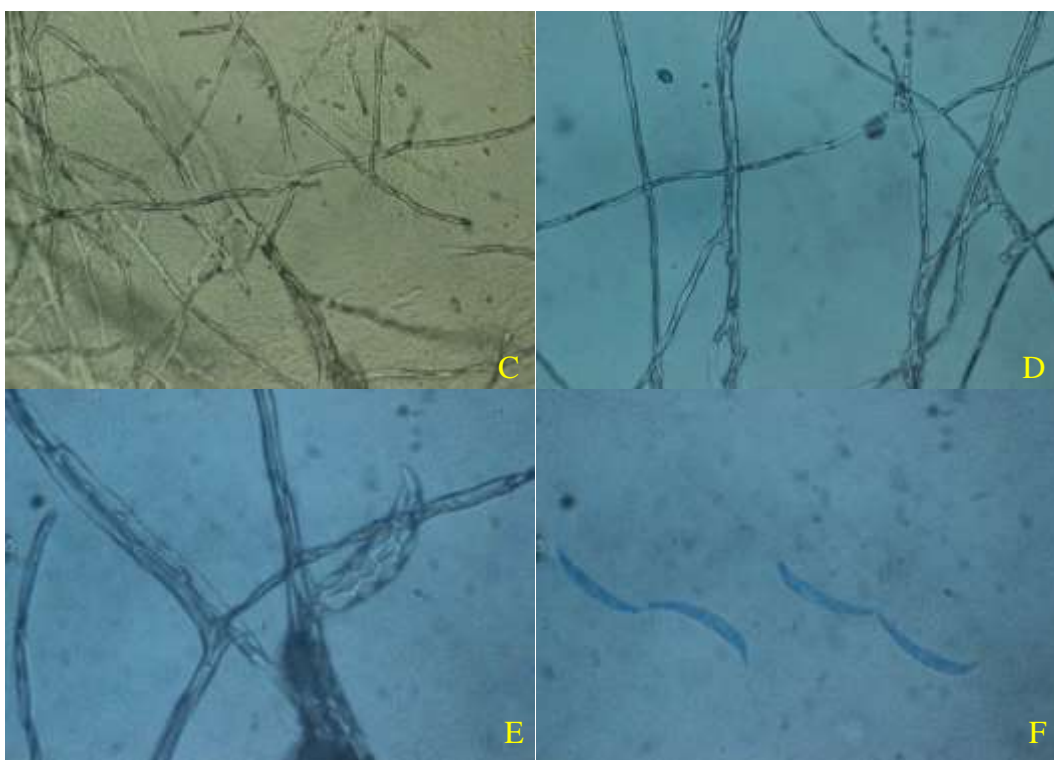
Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada de superficie que presenta anillos de crecimiento definidos, textura pulverulenta algodonosa. El anverso (A) a los primeros días es blanco pero luego se va tornando entre verde opaco y blanquecino. (PANTONE 5773C) y el reverso (B) de color marrón claro (Pantone 146 C).

Las observaciones en microscopio presentaron conidias ligeramente ovoides, dispuestas en roseta agrupadas, ausencia de clamidiosporas, fiálides apicales arregladas en verticilos cruzados en grupos de 3 a 4, ornamentación finamente espinosa y conidióforos ramificados.

AISLADO MT9

Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 37. Aislado MT8, (A) anverso y (B) reverso.

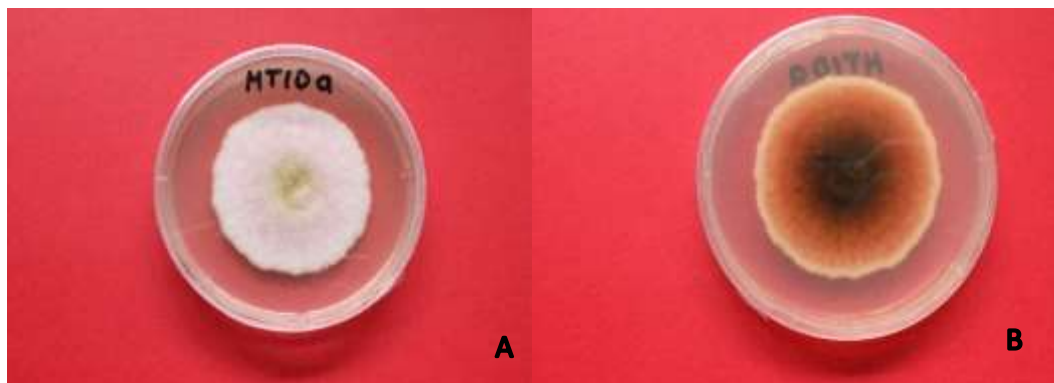


Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 38. Aislado MT9. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D el lente 100X.

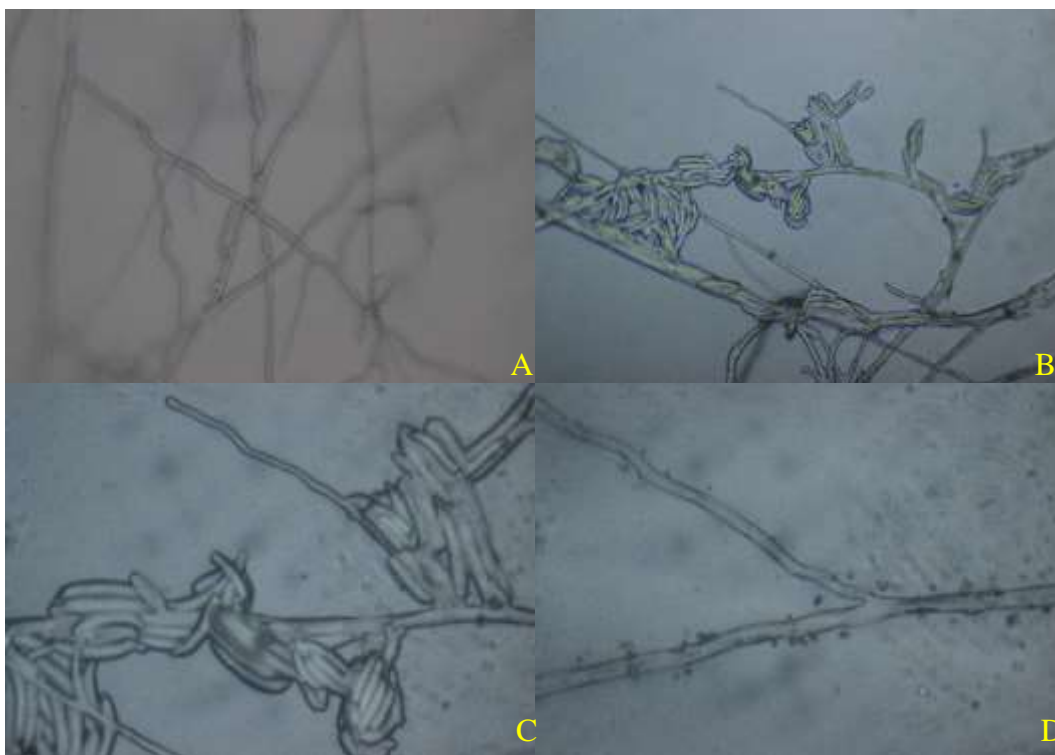
Colonia de crecimiento lento de forma irregular, plana, de textura que va de aterciopelada a algodonosa, de margen irregular no presenta pigmentación ni exudados. El anverso (A) de color crema (Pantone 148 C) y el reverso (B) de color marrón pálido (Pantone 162 C). En microcultivo se observó hifas cenocíticas, clamidosporas y macroconidios bien definidos.

AISLADO MT10



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 39. Aislado MT10, (A) anverso y (B) reverso.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 40. Aislado MT10. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 40X y C y D el lente 100X.

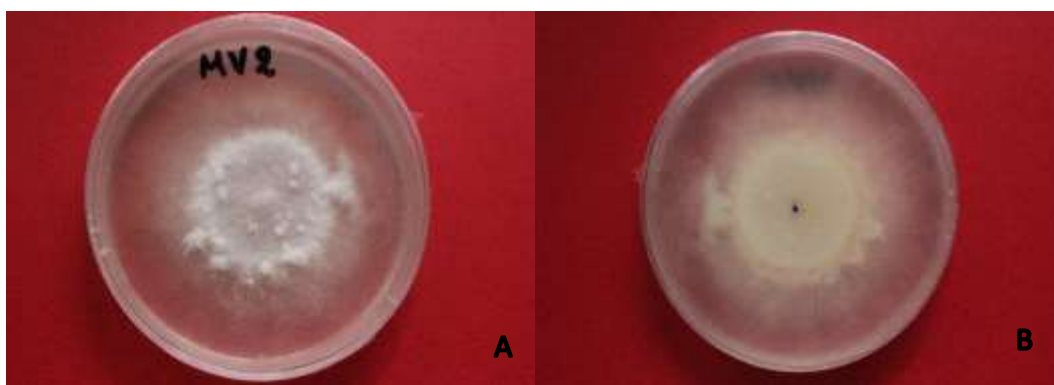
Colonia de crecimiento moderado de forma circular, elevada, de margen ondulado. De textura algodonosa. No presenta pigmentaciones ni exudados. El anverso (A) de la colonia presenta una coloración un poco inusual pues hacia el centro presenta un color café pardo pero a medida que este se aleja al borde va cambiando a una tonalidad rosácea

que luego se torna crema y finalmente blanca más hacia el borde. El reverso (B) es de color negro (Pantone Black C) hacia el centro y hacia los extremos se va tornando café brillante (Pantone 161 C).

En microcultivo se observó hifas lisas cenocíticas, abundante esporulación y presencia de microconidios de forma alargada.

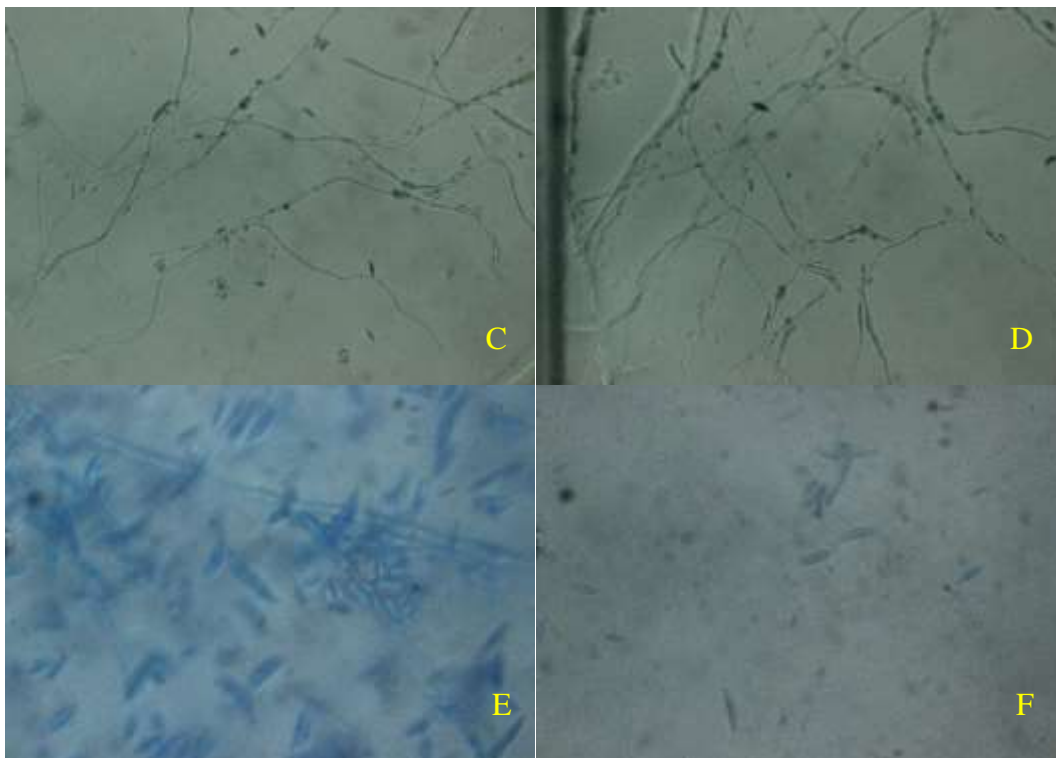
e. Vivero Villagómez

AISLADO MV2



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 41. Aislado MV2, (A) anverso y (B) reverso.

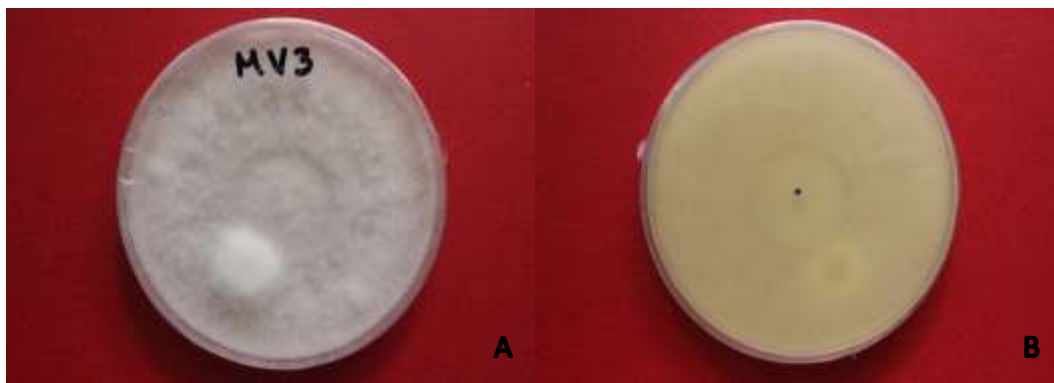


Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 42. Aislado MV2. Microcultivo observado al microscopio en lente A y B 10X y C y D el lente 40X.

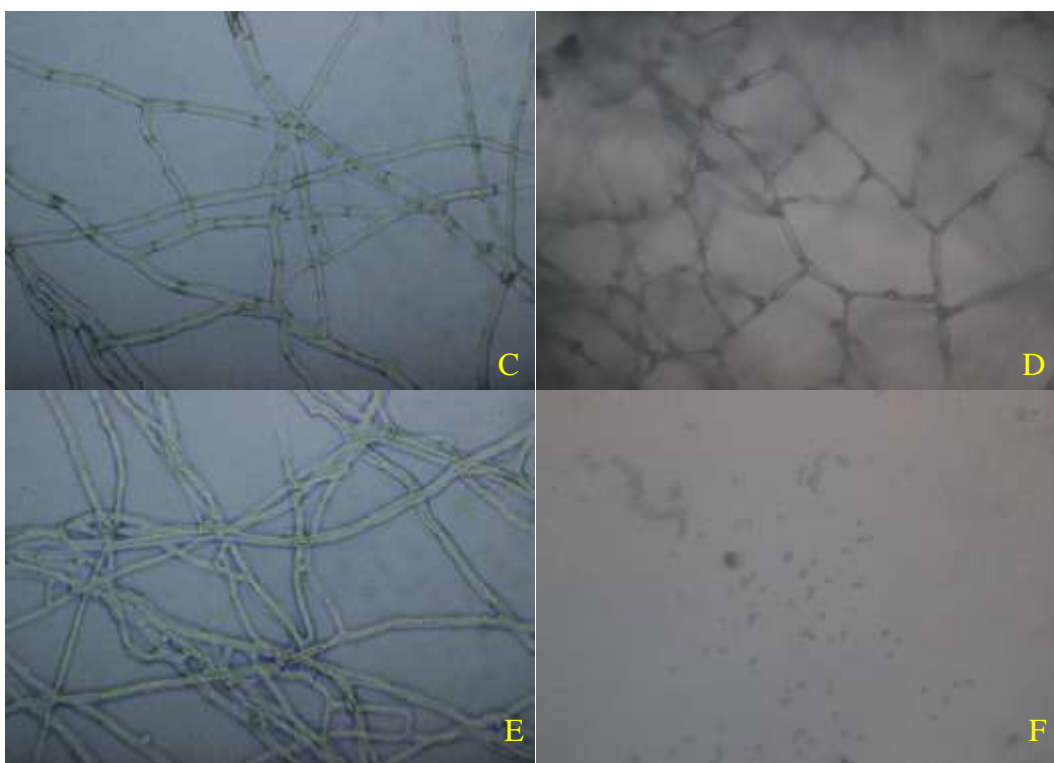
Colonia de crecimiento rápido de forma circular, apenas elevada, de margen irregular presenta una textura aterciopelada apenas algodonosa. No presenta pigmentos ni exudados. El anverso (A) de color Gris (Pantone 7527 C). El reverso (B) de color violeto opaco (Pantone 256C).

En microcultivo se observó el crecimiento micelial no abundante con presencia de hifas cenocíticas (C, D), abundante esporulación, presencia de microconidios y macroconidios (E, F).

AISLADO MV3

Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 43. Aislado MV3, (A) anverso y (B) reverso.



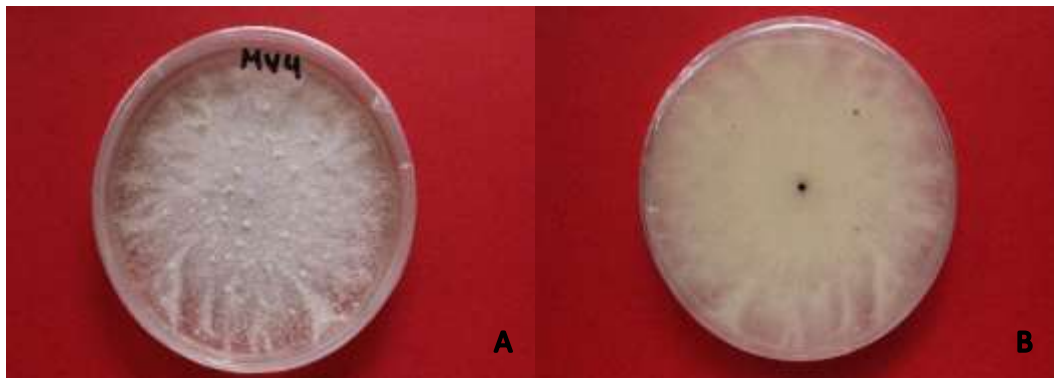
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 44. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio en lente A, B, C y D con lente 40X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada, de margen entero y de textura algodonosa, además de tener un crecimiento invasivo. No presenta pigmentos ni exudados. El anverso (A) es de color blanco mientras que el reverso (B) de color crema suave (Pantone 255C).

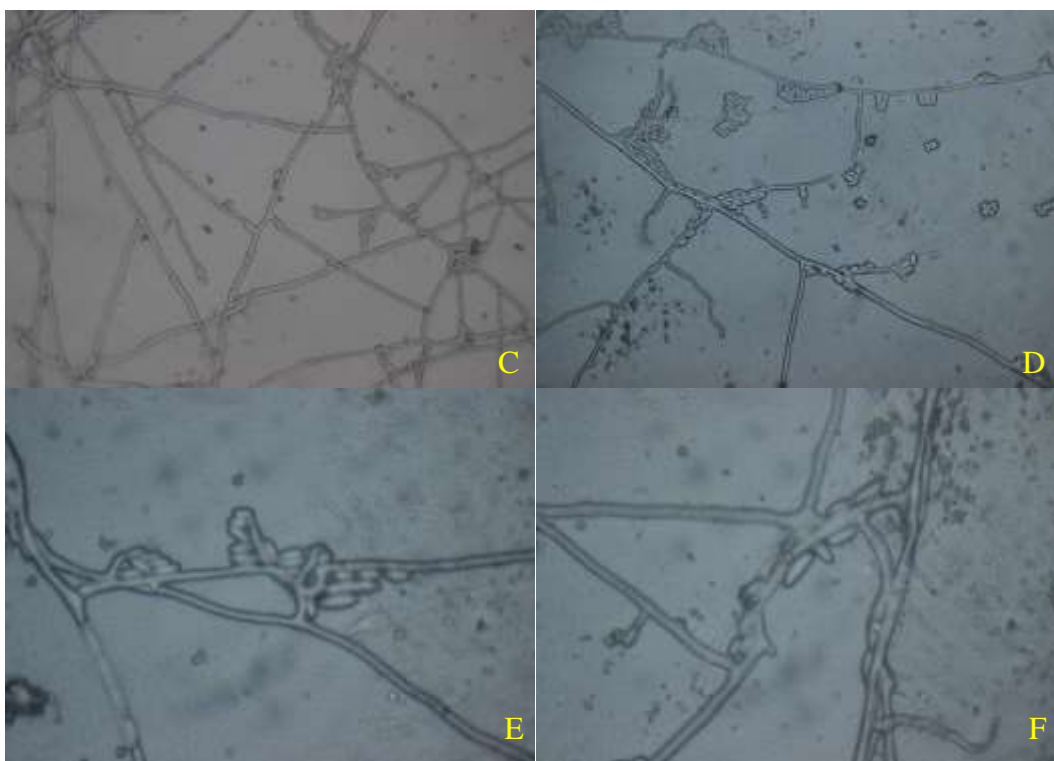
En microcultivo se puede observar un crecimiento de micelio abundante, presenta hifas septadas (C, E), clamidosperas (D), y abundante esporulación, pequeña y redondeada (F).

AISLADO MV4



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 45. Aislado MV4, (A) anverso y (B) reverso.



Elaborado por (Guerra, 2019).

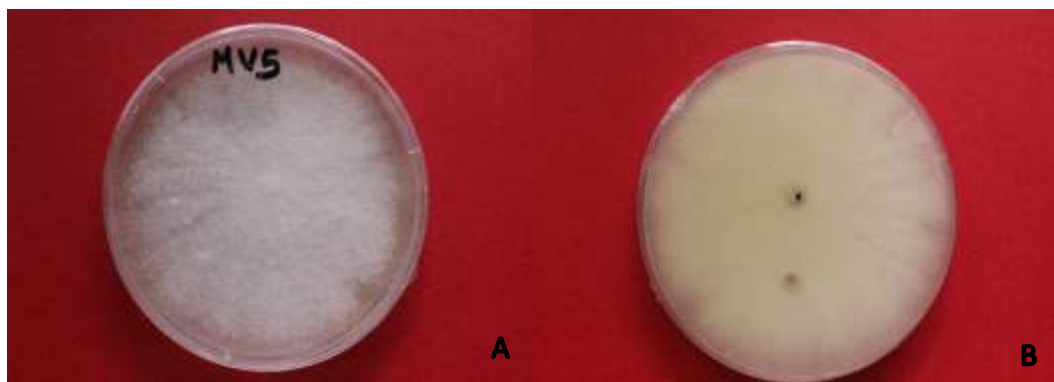
Fotografía 46. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio A y B, lente 40 X C y D con lente 100X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, elevada, de margen entero, textura algodonosa. No presenta pigmentaciones. El anverso (A) es de color blanco y violeta

(Pantone 2562C) En el cual se observa la formación de esclerocios y exudaciones de color transparente. El reverso (B) de color crema suave (Pantone 155C).

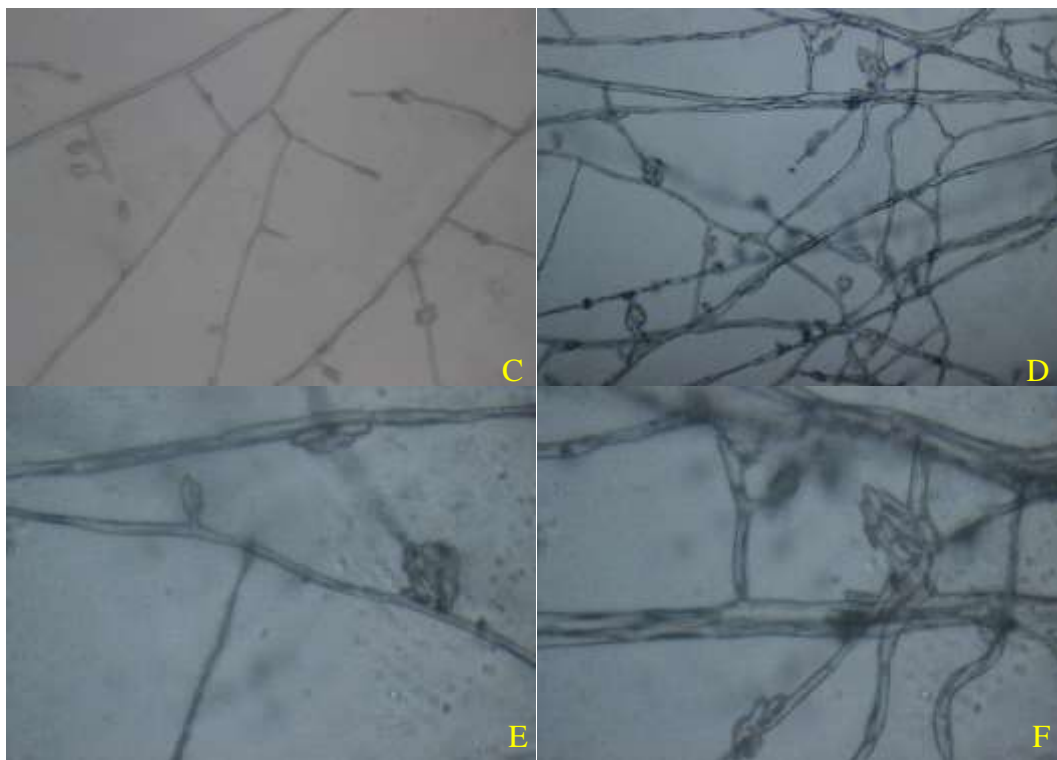
En microcultivo se observó la presencia de hifas cenocíticas (C), monofialides, abundante esporulación con presencia de microconidios adheridos a las paredes de las hifas.

AISLADO MV5



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 47. Aislado MV5, (A) anverso y (B) reverso.



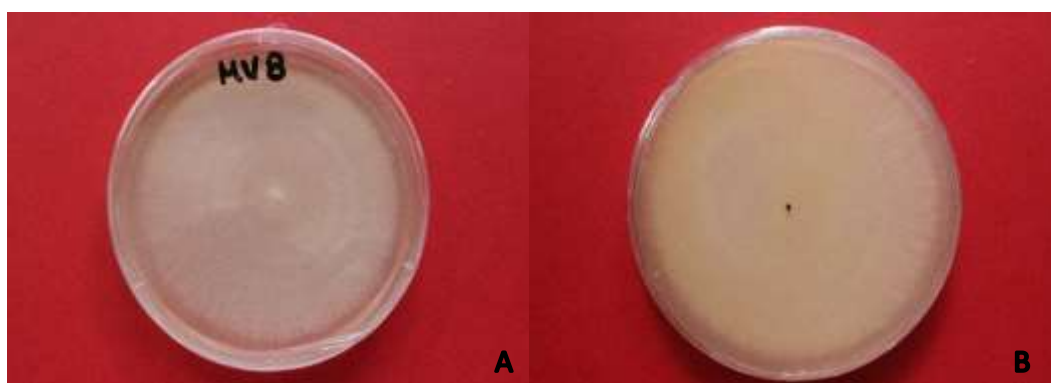
Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 48. Aislado MV5. Microcultivo observado al microscopio A y B, lente 40 X C y D con lente 100X.

Colonia de crecimiento rápido de forma circular, apenas elevada, de margen irregular presenta una textura aterciopelada apenas algodonosa. No presenta pigmentos ni exudados. El anverso (A) de color Gris (Pantone 7527 C). Presenta la formación de pequeños esclerocios. El reverso (B) es de color crema suave (Pantone 155 C).

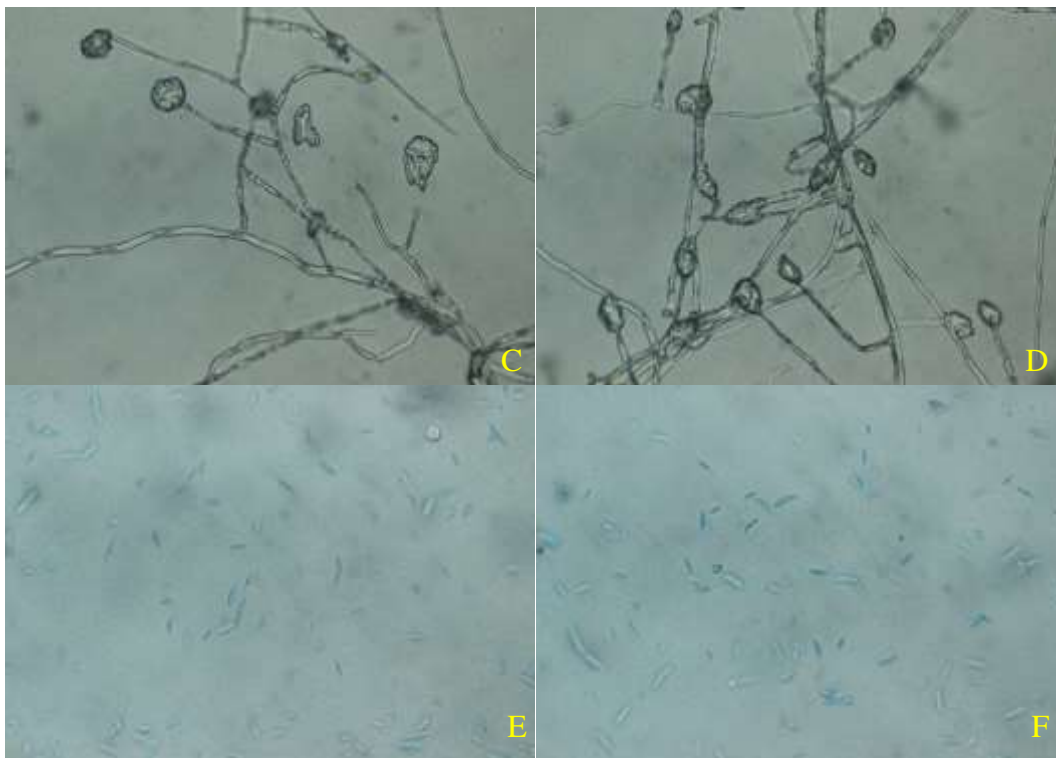
En microcultivo se observó hifas cenocíticas, presencia de clamidosporas, una esporulación normal y presencia de microconidias alargadas.

AISLADO MV8



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 49. Aislado MV8, (A) anverso y (B) reverso.

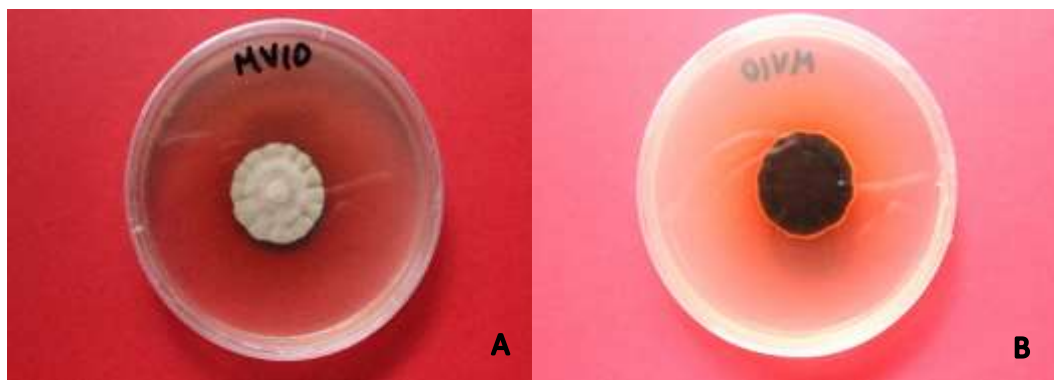


Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 50. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio en lente A, B, C y D con lente 40X.

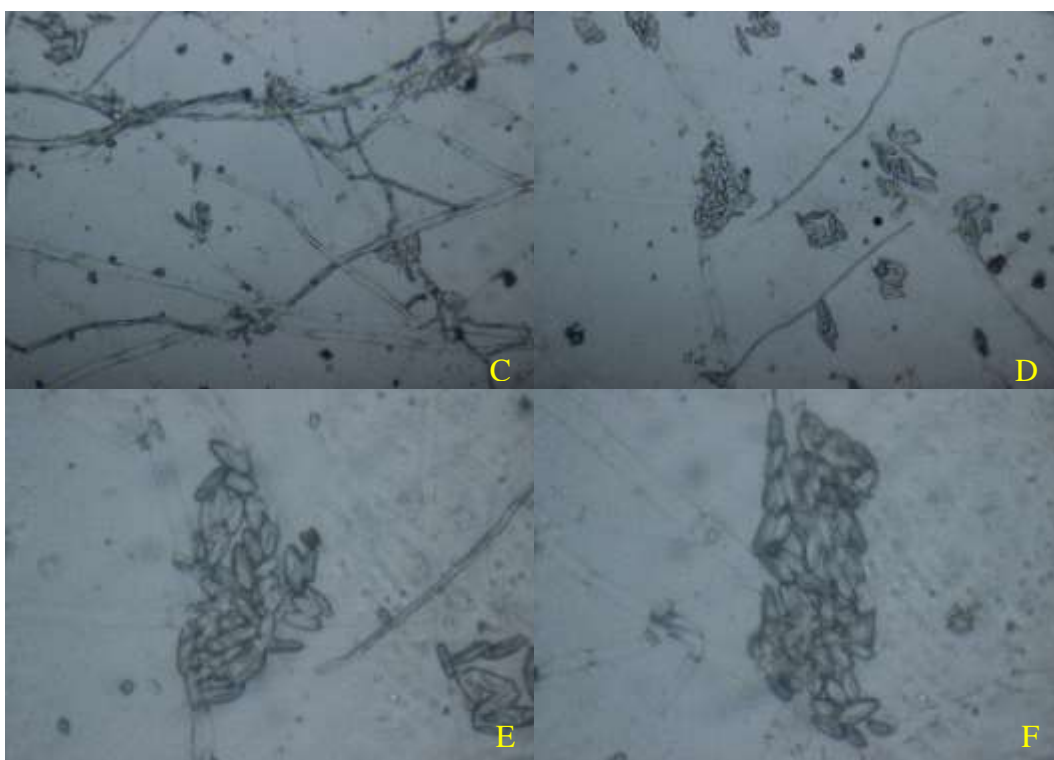
Colonia de crecimiento moderado, de forma circular, plana y extendida de margen entero, superficie con anillos de crecimiento superpuestos, de textura algodonosa, sin presencia de pigmentación y exudados. El anverso (A) de color grisáceo (Pantone 420). El reverso (B) de color crema suave (Pantone 155 C).

En microcultivo se observò la presencia de hifas septadas, clamidosporas (C, D), además de muchas microconidias y macroconidias (E, F).

AISLADO MV10

Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 51. Aislado MV10, (A) anverso y (B) reverso.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Fotografía 52. Aislado MV3. Microcultivo observado al microscopio A y B, lente 40X, C y D con lente 100X.

Colonia de crecimiento lento de forma irregular, elevada, de margen irregular, presenta una textura aterciopelada. Presenta un cambio de tonalidad en el medio tornándolo de color café brillante. El anverso (A) presenta un color crema oscuro (Pantone 481C) y sobre este se observan exudados pequeños de color café negruzco en forma de puntos. El

reverso (B) es de color negro (Pantone Black C) hacia el centro y hacia los extremos se va tornando café brillante (Pantone 161 C).

En microcultivo se observó hifas septadas (C), abundante esporulación, microconidias y macroconidias (E, F).

2. Caracterización molecular de los aislados

Tabla 3. Resultados de los análisis moleculares de los aislados fúngicos obtenidos.

Código original	Código asignado	Longitud secuencia	% calidad	Resultado	Producto amplificado	% identidad	Nº Accesoión
MC1	100	285	81,1	Fusarium solani	EF1 728F/986R	100	LR583659 .1
MC8	101	285	79,3	Trichoderma harzianum	EF1 728F/986R	97,54	KJ871187 .1
MT10	102	267	67,4	Fusarium flocciferum/ Fusarium petersiae	EF1 728F/986R	100	MH58238 3.1 MG38615 9.1
MT8	103	227	43,2	Hypocrea lixii	EF1 728F/986R	97,31	FJ463386. 1
MD3	104	285	81,1	Fusarium solani	EF1 728F/986R	100	LR583659 .1
MV2	105	564	88,1	Fusarium oxysporum	EF1/EF2	98,94	MN02242 4.1
MP10	106	338	46,4	Clonostachys sp.	EF1 728F/986R	98,77	KY58622 9.1
P3b	107	323	84,8	Trichoderma harzianum	EF1 728F/986R	99,38	MK05052 1.1
MT6	108	231	33,3	Fusarium solani	EF1 728F/986R	99,95	LR583626 .1
MV10	109	286	94,1	Dactylonectria novozelandica	EF1 728F/986R	98,94	MK40995 1.1
MV8	110	320	90,6	Fusarium solani	EF1 728F/986R	98,11	LR583654 .1
MT5	111	293	93,9	Fusarium keratoplasticum/ Fusarium solani	EF1 728F/986R	98,97	KU71173 9.1 DQ24747 2.1
MD1	112	317	90,5	Fusarium solani	EF1 728F/986R	98,1	LR583659 .1

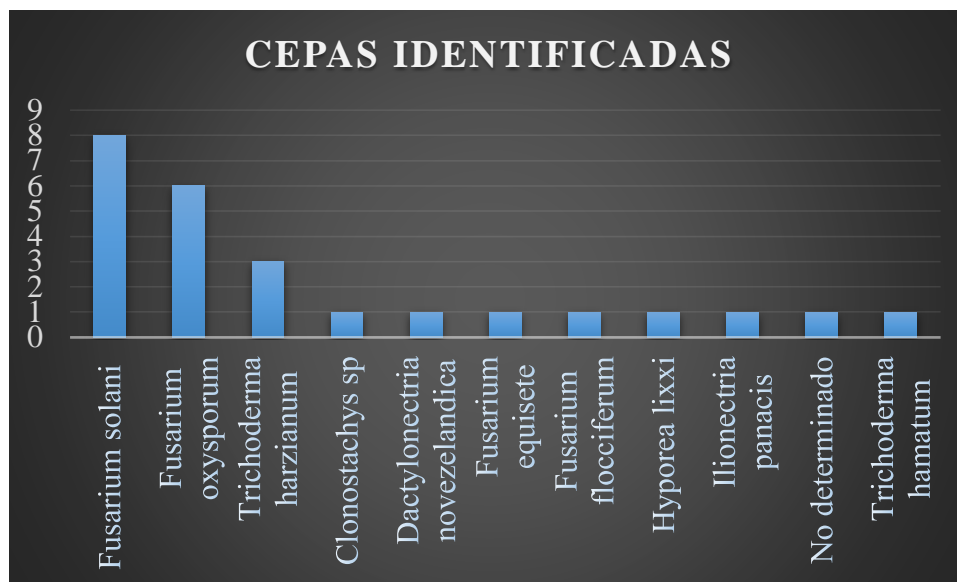
MD5	113	308	16,2	Ilyonectria panacis	EF1 728F/986R	95,71	JF735761. 1
MV3	114	307	3,2	Trichoderma hamatum	EF1 728F/986R	91,45	FJ436116. 1
MV5	115	286	94,1	Fusarium oxysporum	EF1 728F/986R	99,3	JQ265773 .1
P3a	116	213	56,3	Trichoderma harzianum	EF1 728F/986R	97,2	MK03688 1.1
MD6	117	290	98,6	Fusarium solani	EF1 728F/986R	100	LR583659 .1
MV4	118	290	94,5	Fusarium oxysporum/ Fusarium nirenbergiae	EF1 728F/986R	99,65	MK78309 9.1 MH48501 4.1
MC3	119	257	99,6	Fusarium oxysporum	EF1 728F/986R	100	MK78309 0.1
MT9	120	290	93,8	Fusarium equiseti	EF1 728F/986R	97,56	MF56393 2.1
MD2	121						
MC5	122	318	94	Fusarium solani	EF1 728F/986R	99,05	LR583658 .1
MP6	123	290	94,8	Fusarium oxysporum/ Fusarium nirenbergiae	EF1 728F/986R	99,31	MK78309 9.1 MH48501 4.1
MT2	124	275	96	Fusarium oxysporum	EF1 728F/986R	99,64	MK78309 0.1

Fuente: Informe IDgen. Los resultados con un porcentaje de identidad menor al 99% para bacterias y menor al 97% para hongos no permiten asegurar que el aislado corresponde a esa especie. Es posible que se trate de una nueva especie no descrita o para la cual no hay referencias en la base de datos.

Los resultados de esta investigación son similares a los estudios realizados por Monroy y Lizarazo en 2010, en su trabajo IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS ASOCIADOS AL ROBLE (QUERCUS HUMBOLDTII BONPL.), EN LOS MUNICIPIOS DE ENCINO (SANTANDER), ARCABUCO, Y TIPACOQUE (BOYACÁ) en donde entre los hongos aislados de muestras vegetales (hojas, tallos) se identificó a Fusarium como un agente patógeno de gran importancia, también resultan similares a los resultados presentados por Moreno y Zambrano 2014 en un estudio similar donde aislaron hongos fitopatogenos de semillas de Acacia, Laurel y Aliso donde de igual manera uno de los hongos de mayor presencia fue el hongo de genero Fusarium.

Las características descritas por Seifert 2001, son similares a las presentadas por la mayoría de aislados obtenidos en nuestro trabajo para el género Fusarium.

Para el género *Trichoderma* las características microscópicas y macroscópicas descritas por Acurio y España 2016, en su trabajo AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE *Trichoderma spp.* COMO PROMOTOR DE CRECIMIENTO VEGETAL EN PASTURAS DE RAYGRASS (*Lolium perenne*) Y TRÉBOL BLANCO (*Trifolium repens*) son similares a las obtenidas en nuestra investigación.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Gráfico 5. Cepas identificadas molecularmente.

Del total de las 25 muestras aisladas en laboratorio obtuvimos 8 cepas correspondientes a *Fusarium solani*, 6 cepas de *Fusarium oxysporum*, 1 cepa de *Fusarium equiseti*, 1 cepa de *Fusarium flocciferum*, 3 cepas de *Trichoderma harzianum* y 1 cepa de *Trichoderma hamatum*, *Clonostachys sp.*, *Dactylonectria novezealandica*, *Hypocrea lixii*, *Ilionectria panacis* respectivamente. Además no se logró identificar ni morfológica ni molecularmente 1 cepa.

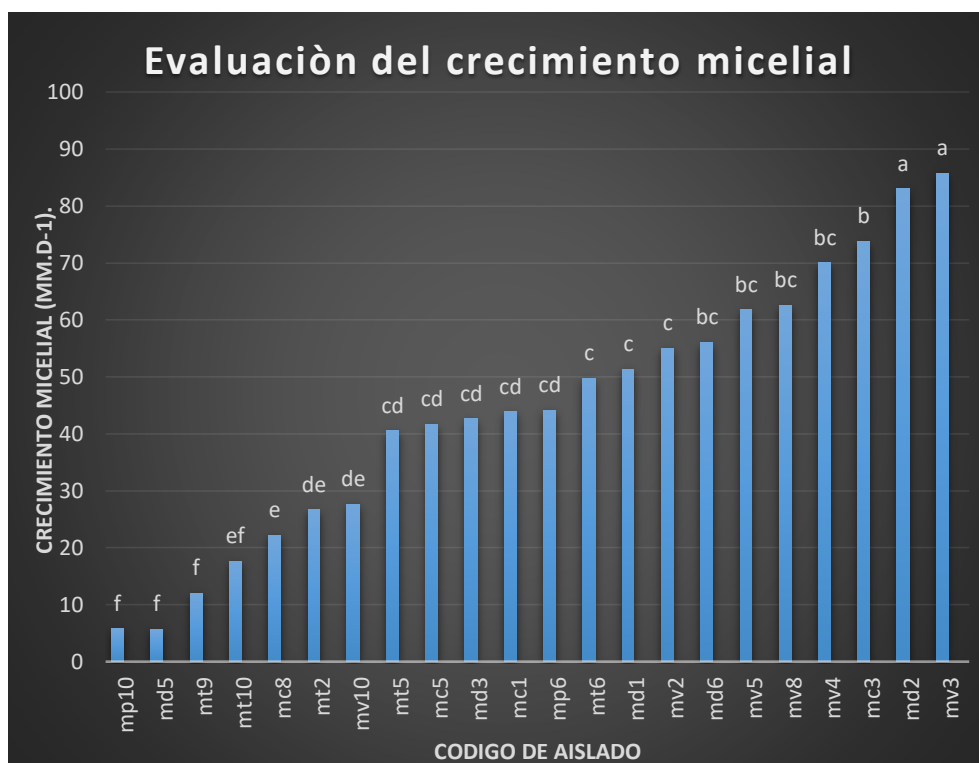
C. EVALUACION DEL CRECIMIENTO RADIAL DE LOS AISLADOS FUNGICOS.

Tabla 4. Crecimiento micelial (mm.d-1) de cepas de hongos fitopatógenos Aliso-viveros.

Código	Cepas de hongos fitopatógenos asociados con marchitez de posturas de Aliso en viveros.	Crecimiento micelial (mm.d ⁻¹)	
MP10	1	5.75	f
MD5	21	5.63	f
MT9	2	12	f
MT10	3	17.63	ef
MC8	22	22.13	e
MT2	4	26.63	de
MV10	11	27.63	De
MT5	7	40.5	Cd
MC5	5	41.63	Cd
MD3	6	42.63	Cd
MC1	9	43.88	Cd
MP6	8	44.13	Cd
MT6	10	49.75	C
MD1	12	51.38	C
MV2	13	55	C
MD6	14	56	bc
MV5	15	61.75	bc
MV8	16	62.5	bc
MV4	17	70	bc
MC3	18	73.75	B
MD2	19	83	A
MV3	20	85.75	A

Elaborado por (Guerra, 2019).

Rangos promedios en una misma columna si no comparten letras comunes, son diferentes estadísticamente para $p < 0.05$ acorde con la prueba de Kruskal Wallis completada con la prueba U de Mann Whitney.



Elaborado por (Guerra, 2019).

Gráfico 6. Evaluación de la velocidad de crecimiento.

En la evaluación de crecimiento micelial de los aislados fúngicos obtenidos tenemos que el aislado MD2 no determinado y el aislado MC3 perteneciente a *Fusarium oxysporum* fueron los que presentaron la mayor velocidad de crecimiento mientras que el aislado MP10 perteneciente a *Clonostachys sp* y MD5 perteneciente a *Ilyonectria panacis* fueron los que menor velocidad de crecimiento presentaron.

El crecimiento de *Ilyonectria panacis* fue similar al descrito por Cabral et al, 2011. Donde se determinó que a los 7 días luego del repique el aislado alcanzó un crecimiento de 5 mm de diámetro, mientras que en nuestro estudio alcanzó 5,2 mm de diámetro de crecimiento.

Tabla 5. Crecimiento micelial (mm.d-1) de cepas de *Trichoderma sp*.

Cepas	Rangos promedios	Medias
Cepa 1	9.88 a	31.33
Cepa 2	7.13 a	29.75

Elaborado por (Guerra, 2019).

Rangos promedios en una misma columna si no comparten letras comunes, son diferentes estadísticamente para $p < 0.05$ acorde con la prueba de Kruskal Wallis completada con la prueba U de Mann Whitney.

D. EVALUACION DEL EFECTO PROTECTOR DEL MECANISMO DE INHIBICION DE CRECIMIENTO.

Tabla 6. Conformación de los tratamientos.

Tipo de cultivo	Combinaciones	Tratamiento
Monocultivo	<i>Trichoderma harzianum</i> (testigo)	T1
	<i>Fusarium solani</i> (testigo)	T2
	<i>Fusarium oxysporum</i> (testigo)	T3
Cultivo dual	<i>Trichoderma harzianum</i> vs <i>Fusarium solani</i>	(T1 X T2)= T4
	<i>Trichoderma harzianum</i> vs <i>Fusarium oxysporum</i>	(T1 X T3)= T5

Elaborado por (Guerra, 2019).

Tabla 7. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento T4

PIC al 7 día - T4			
ANTAGONISMO		CONTROL	
T1	T2	T1	T2
37	27,5	38,9	29,13

Elaborado por (Guerra, 2019).

Trichoderma harzianum y *Fusarium solani* registraron un crecimiento de 38,9 cm y 29,13 cm respectivamente de manera aislada (control) mientras que en confrontación registraron para *Trichoderma harzianum*. 37 cm y para *Fusarium solani* 27,5 cm. (Tabla 7).

Tabla 8. Porcentaje de Inhibición de Crecimiento T5.

PIC al 7 día - T5			
ANTAGONISMO		CONTROL	
T1	T3	T1	T3
38,5	32	43	43

Elaborado por (Guerra, 2019).

En el tratamiento 5 se registró un crecimiento mucho mayor para *Trichoderma harzianum* 43 cm y *Fusarium oxysporum* 43 cm en las cajas de Petri de control, por el contrario en la confrontación se registró 38,5 cm para *Trichoderma harzianum* y 32 cm para *Fusarium oxysporum* (Tabla 8).

El porcentaje de inhibición frente a estos patógenos, a los 7 días de siembra, se presentó de la siguiente manera. Para el tratamiento 4 donde se confrontó *Trichoderma harzianum* con *Fusarium solani* se tiene un PIC de 6,8%. Mientras que para el tratamiento 5 donde se confrontó *Trichoderma harzianum* con *Fusarium oxysporum* se obtuvo un PIC de 25.6%.

Los valores reportados en el tratamiento 5 se hallan dentro de los reportado por Reyes et al (2012). En su trabajo “Inhibición de crecimiento in vitro de *Fusarium* sp aislado de chile habanero (*Capsicum chinensis*) con hongos antagonistas” donde indica que el porcentaje de inhibición de crecimiento en *Fusarium* por acción de *Trichoderma* muestra valores del 22,5 al 86,44%.

VII. CONCLUSIONES

- Se aislaron 25 cepas de hongos filamentosos procedentes de viveros forestales de la provincia de Chimborazo por el método de inclusión de fragmentos en medio de cultivo PDA.
- Se conservaron 25 aislados monospóricos correctamente etiquetados, utilizando el método de crioconservación con una suspensión de glicerol al 70% y posteriormente ubicados en refrigeración a menos 10°C.
- Se identificó molecularmente 24 aislados, obteniendo 8 cepas de *Fusarium solani*, 6 cepas de *Fusarium oxysporum*, 1 cepa de *Fusarium equiseti*, 1 cepa de *Fusarium flocciferum*, 3 cepas de *Trichoderma harzianum* y 1 cepa de *Trichoderma hamatum*, *Clonostachys sp.*, *Dactylonectria novezealandica*, *Hypocrea lixii*, *Ilyonectria panacis* respectivamente.
- No se logró aislar cepas del género *Trichoderma* mediante el método de dilución seriada, de muestras de suelo de viveros forestales.
- De las cepas aisladas de viveros forestales de la provincia de Chimborazo el género *Fusarium* con 16 cepas fue el de mayor presencia con el 64% del total de los aislados, mientras que los generos de menor presencia fueron *Clonostachys*, *Dactylonectria*, *Hypocrea* e *Ilyonectria* respectivamente representando unicamente el 4% del total de aislados.
- El aislado P3A identificado como *Trichoderma harzianum* presentó la mayor velocidad de crecimiento radial con 0,65 mm/h mientras que el aislado MD5 identificado como *Ilyonectria panacis* presentó la menor velocidad de crecimiento radial con 0.04 mm/h.
- El Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium oxysporum* del 25,6 % fue mucho mejor que el de *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium solani* que presentó el 6,8%.

VIII. RECOMENDACIONES

- Investigar y realizar ensayos con otras metodologías para el aislamiento de cepas de *Trichoderma* a partir de muestras de suelos de la provincia de Chimborazo.
- Aislar hongos fitopatógenos a nivel de raíz en viveros forestales utilizando otras especies y comparar los resultados para determinar los principales agentes causantes de marchites en viveros forestales.
- Realizar ensayos de comparación de eficiencia entre productos químicos convencionales frente a agentes biocontroladores nativos y comerciales para determinar su aporte en el control de hongos patógenos.
- Seguir los protocolos de seguridad e higiene en laboratorio para evitar pérdida de material por contaminación.
- Seguir la codificación establecida por la unidad de Fitopatología para evitar confusión y mezcla de cepas aisladas en laboratorio.
- Crear un cepario de hongos fitopatógenos y biocontroladores identificados molecularmente en la Facultad de Recursos Naturales para fines investigativos.

IX. RESUMEN

La investigación propuso aislar patógenos de muestras radiculares de aliso (*Alnus acuminata* Kunth) que presentaron sintomatología de ataque fungoso, a su vez aislar cepas de *Trichoderma* para determinar su efecto biocontrolador. La recolección se realizó en 5 viveros forestales de la provincia de Chimborazo, la inclusión de fragmentos de tejido en medio PDA fue la metodología usada para el aislamiento de hongos fitopatógenos y de las cepas de *Trichoderma* spp. La identificación cultural, morfológica y molecular fueron necesarias para determinar a que género y especie corresponde cada uno de los aislados obtenidos. Las cepas fueron conservadas por el método de crioconservación en tubos eppendorf de 2 ml con una suspensión de glicerol al 70% a -20°C en refrigeración. De un total de 25 aislados se obtuvo 8 cepas correspondientes a *Fusarium solani*, 6 cepas de *Fusarium oxysporum*, 1 cepa de *Fusarium equiseti*, 1 cepa de *Fusarium flocciferum*, 3 cepas de *Trichoderma harzianum* y 1 cepa de *Trichoderma hamatum*, 1 cepa de *Clonostachys* sp., 1 cepa de *Dactylonectria novaezelandica*, 1 cepa de *Hypocrea lixii*, 1 cepa de *Ilionectria panacis* y una cepa no determinada. *Trichoderma harzianum* obtuvo la mayor velocidad de crecimiento radial en los ensayos con 0,65 mm/h mientras que *Ilionectria panacis* con 0,04 mm/h. fue la que menor velocidad de crecimiento presentó. El porcentaje de inhibición de crecimiento de *Trichoderma harzianum* frente a *Fusarium solani* fue de 5,6 % mientras que frente a *Fusarium oxysporum* fue de 25.5%.

Palabras clave: PATOGENOS - MUESTRAS RADICULARES - ATAQUE FUNGOSO – FITOPATOLOGIA – CONTROL BIOLÓGICO.

Por: Juan Luis Guerra



X. SUMMARY

The research proposed to isolate pathogens from radicular samples of aliso plant (*Alnus acuminata* Kunth) which indicated fungal attack symptoms, also to isolate *Trichoderma* strains to determine its biocontroller effect. The collection was carried out in 5 forest nurseries in the province of Chimborazo, the inclusion of tissue fragments in PDA medium was the methodology used for the isolation of phytopathogenic fungi and *Trichoderma spp* strains. Cultural, morphological and molecular identification were necessary to determine to which gender and specie each of the specified ones corresponds. The strains were preserved by the cryopreservation method in 2 ml ependorf tubes with a 70% glycerol suspension at -20 ° C under refrigeration. From a total of 25 isolates, 8 strains corresponding to *Fusarium solani*, 6 strains of *Fusarium oxysporum*, 1 strain of *Fusarium equiseti*, 1 strain of *Fusarium flocciferum*, 3 strains of *Trichoderma harzianum* and 1 strain of *Trichoderma hamatum*, 1 strain of *Clonostachys sp*, 1 strain of *Dactylonectria novezealandica*, 1 strain of *Hypocrea lixii*, 1 strain of *Ilionectria panacis* and an undetermined strain, were obtained. The *Trichoderma harzianum* got the highest radial growth rate in the tests with 0.65 mm/h while *Ilionectria panacis* with 0.04 mm/h, with the lowest growth rate recorded. The percentage of growth inhibition of *Trichodenna harzianum* against *Fusarium solani* was 5.6% while compared to *Fusarium oxysporum* it was 25.5%.

Keywords: PATHOGENS - RADICULAR SAMPLES - FUNGAL ATTACK - PHYTOPATHOLOGY - BIOLOGICAL CONTROL.

By: Juan Luis Guerra



XI. BIBLIOGRAFÍA

- Achicanoy, H. (2001). Estrategías integradas para el control de enfermedades de las plantas. Colombia. 54(1) 1251-1272.
- Agrios, G. (1998). Fitopatología. México: Limusa.
- Ahman, J., & Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of trichoderma harzianum. Colorado State University. Phytopathology 77: 182-189.
- Almodovar, W. (2005). Manejo integrado de enfermedades en viveros de árboles. Puerto Rico: Servicio de Extensión Agrícola.
- Añazco, M. (1996). El Aliso. Quito - Ecuador: Fernando Heredia.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). Aislamiento e Identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde.(Tesis de grado. Microbiólogo Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Bare, M., & Ashton, M. (2015). Growth of native tree species planted in montane reforestation projects in the Colombian and Ecuadorian Andes differs among site and especies. New Forests 4(1).
- Bartholomaeus. (1990). El manto de la tierra. Flora de los Andes. Bogotá: GTZ.
- Bartholomaeus. (1998). El manto de la tierra: flora de los Andes. Bogotá: Lumen .
- Beltran, M. (2014). La solubilización de fosfatos como estrategia microbiana para promover el crecimiento vegetal. Colombia. CORPOICA. 15(1): 101-113.
- Blumenthal, C. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the tree fungi. Regulatory Toxicology and Pharmacology 39(2): 214-228.
- Briceño Vergara, A. (2002). El aliso (*Alnus acuminata* H.B.K.), hospedero de dos especies de Chrysomelidae (Coleoptera) en los Andes Venezolanos. Revista Forestal Venezolana. 1: 53-57.

- Cabral, A., Jhoannas, Z., Rego, C., Olivera, H., & Crous, P. (2011). *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. *Mycol Progress*. 11: 655–688
- Cañedo, V., & Ames, T. (2014). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa. (CIP).
- Caranqui, J. (2017). Árboles y arbustos nativos potenciales para reforestación en la sierra central de Ecuador. *Enfoque UTE*. 8(5): 103-109.
- Carlson, P., & Añazco, M. (1990). *Establecimiento y manejo de prácticas agroforestales en la sierra ecuatoriana*. Quito: Red Agro-Forestal Ecuatoriana.
- Carsolio, C. B. (1999). Role of the trichoderma harzianum endochitinase gene, ech42, in mycoparasitism. *Applied Environ Microbiol*. 65(3): 929-935.
- Claros, G. (2005). *Marcadores Moleculares*. Universidad de Málaga. Departamento de Biología Molecular y Bioquímica. Recuperado el 20 de junio del 2019, de: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html>
- Central Ecuatoriana de Servicios Agrícolas. (1993). *Usos tradicionales de las especies forestales nativas en el Ecuador usos medicinales*. Quito. Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <http://www.asocam.org/sites/default/files/publicaciones/files/3c2f793129ccb2b99b13bc9f6b6a9fcb.pdf>
- Chavez, M. (2006). *Producción de trichoderma sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (Dendranthema grandiflora)*. (Tesis de grado. Microbióloga Industrial). Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- Chet. (1990). Biological control of soil-borne plant pathogens with fungal antagonists in combination with soil treatments. *Biological control of soil-borne plant pathogens*. Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19901145547>
- Chet, I., & Inbar, J. (1994). Biological control of fungal pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 48(1): 37-43.
- Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal. (2002). *Aplicación de métodos de estacas e injertos para la propagación vegetativa de cordia alliodora*

- (ruíz y pavón) oken y tabebuia rosea (bertol) DC. Bogotá: Colombia Forestal, 7(15): 109-117.
- Corredoira, E., Janeiro, L., & San Jose, M. (2011). Aplicación de técnicas de cultivo in vitro en la propagación del aliso con vistas a su conservación. Recursos Rurais 7: 49-57.
- Cupull, S., Andreu, M., Perez, N., Delgado, P., & Cupull, M. (2003). Efecto de *Trichoderma viride* como estimulante de la germinación en el desarrollo de posturas de cafetos y el control de *Rhizoctonia solani* Kunth. Centro Agrícola. 1: 21-25.
- Dennis, L., & Webster, J. (1971). Antagonistic proerties of species groups of trichoderma. III Hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society, 57(1): 25-27
- Dhingra, O., & Sinclair, J. (1985). Basic plant pathology methods. Florida: CRC Press, Inc.
- Diaz, J. (1994). Algunos aspectos biológicos de *Trichoderma* y su posible uso como biocontrol. (Tesis de grado. Ingeniero Agrónomo) Universidad Agraria de La Habana. La Habana, Cuba.
- Estupiñan, H., & Ossa, J. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (*Physalis peruvina* L.) el hongo *Fusarium oxysporum* Schlecht, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo. (Tesis de posgrado. Microbiólogo Agrícola y Veterinario) Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Ezziyyani, M., Requena, M. E., Pérez, S. C., Rubio, L., & Candela, M. E. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei* -Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annum* L.) causado por *Phytophthora capsici*. Anales de Biología 33: 67-77.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (2004). Manejo integrado de enfermedades en cultivos hidropónicos. Quito. Ecuador: FAO.

- Fernandez, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo integrado de plagas. Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <http://repositorio.bibliotecaorton.catie.ac.cr/handle/11554/6578>
- Furlow, J. (1979). The systematics of the American species of *Alnus* (Betulaceae). *Rhodora* 81 (1): 151–248.
- Galante, Y. M. (1998). Application of trichoderma enzymes in the textile industry. *Trichoderma & Gliocladium*, 2: 311-325
- Galeano, P., Rada, A., & Morales, D. (2012). Siembra forestal, recuperación paisajística y revegetalización en agregados el vínculo ltda. Cundinamarca. Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <https://repository.unilibre.edu.co/bitstream/handle/10901/11300/Art.%20final%20semillero.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- García, C. (2004). Introducción a la Microbiología. Costa Rica: EUNED.
- Guzmán, G., Mata, G., Salmones, D., Soto, C., & Guzmán, L. (1993). El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Haram, S. S. (1996). Molecular mechanisms of lictin enzymes involved in the biocontrol activity of *trichoderma harziaunum*. *Microbiology*, 142: 2321-2331.
- Harman, G. (2001). *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koninggi*, *T. hamatum* and other sp. Deuteromicetes, Moniliales (asexual classification system). Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <http://www.birdhybrids.com/t-22.htm>
- Hernández. (2004). Rizobacterias y hongos micorrizicos como agentes de control biológico del Damping-off en plántulas de *Carica papaya* L. (Tesis de posgrado. Máster en Ciencias Biológicas). Universidad de Colima. Colima, México.
- Hernández, G. & Morales, R. (2017). Aislamiento e identificación de hongos causantes de antracnosis en *Musa paradisiaca* L. (plátano) y hongos antagonistas. (Tesis de pregrado. Licenciada en Química y Farmacia) Universidad de El Salvador. San Salvador, El Salvador.

- Holdridge, L. (1951). The alder, *Alnus acuminata*, as a farm timber tree in Costa Rica. *Caribbean Forester* 12(2): 47-57.
- Howell, C. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. USDA/ARS Southern Plains Agricultural Research Center, 87(1): 4-10
- Infante, D., Martinez, B., Gonzales, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Protección Vegetal*. 24(1): 14-21
- Kloepper, J., Lifshitz, R., & Zablutowitz, R. (1989). Free living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2): 39-44.
- Koneman, E. (2001). *Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas de color*. Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana .
- Lubbe, C., Lamprecht, S., Van Niekerk, J., & Mostert, L. (2008). Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* causing wilt of proteaceae. *Acta Hort. South Africa* Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <https://scihub.tw/10.17660/ActaHortic.2008.805.15>
- Manchester. (1999). Biogeographical relationships of North American Tertiary floras. *Ann Mo Bot Gard* 86: 472–522.
- Martinez. (1998). Uso del *Trichoderma* para el control biológico de organismos patógenos de plantas. En memoria del Simposium sobre Agricultura Organica y de baja residualidad. México. 1: 25-27
- Martinez, J., Fernandez, L., & Solano, T. (1994). Antagonismo de cepas de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos de la caña de azucar, tomate y tabaco. 15(3): 54.
- Micologia. (2017). *Microbiología Ambiental*. Recuperdo el 20 de junio del 2019 de: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/microambiental/wpcontent/uploads/2016/08/TP-8-Micolog%C3%ADa.pdf>
- Moreno, K., & Zambrano, G. (2014). Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos de la semilla de acacia japonesa (*Acacia melanoxylon*) Laurel de cera (*Morella pubescens*) y Aliso (*Alnus acuminata*). (Tesis de grado. Ingeniera Agroforestal) Universidad de Nariño. San Juan de Pasto. Colombia.

- Muzhinji, N., Woodhall, J., Truter, M., & Van der Waals, J. (2018). Variation in fungicide Sensitivity Among *Rhizovtonia* Isolates Recovered from Potatoes in South Africa . *Plant Disease*, 102(8): 1520-1526.
- Nieto, J. (2007). El Aliso, Instituto de Desarrollo y Medio Ambiente. Perú. Recuperdo el 20 de junio del 2019 de: <http://idmaperu.org/idma/portfolio/el-aliso/>
- Normand, P., & Lalonde, M. (1982). Evaluation of Frankla strains Iso late from provenances of to *Alnus* specles. *Canadlan Journal of Microbiology*. 28: 1133-1142.
- Oda, S., Isshiki, K., & Ohashi, S. (2009). Production of 6-pentyl-[alpha]- pyrone with *Trichoderma atroviridi* and its mutant in a novel extractive liquid-surface immobilizacion Ext-LSI). *Process Biochemistry*, 44(6): 625-630
- Pacheco, E., & Quisbert, A. (2016). Modelos de aprovechamiento sostenible del Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en zonas de ladera de bosque de niebla. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 4(1): 24-38.
- Palacio, W. (2011). El aliso, (*Alnus acuminata*) Árboles del ecuador, familias, géneros y especies de árboles. Quito, Ecuador. p. 477.
- Perez, N. (2004). Manejo ecológico de plagas. La Habana. Cuba: CEDAR. p. 296.
- Pretell et al. (1985). Apuntes sobre algunas especies forestales nativas de la sierra peruana. Lima. Recupero el 20 de junio del 2019 de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/34129754/Apuntes_sobre_algunas_especies_forestales_89_tamano_modifi.pdf?response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DApuntes_sobre_algunas_especies_forestale.pdf&X-Amz-Algorithm=AWS4-HMAC-SHA256&X-Amz-Credential=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A%2F20191111%2Fus-east-1%2Fs3%2Faws4_request&X-Amz-Date=20191111T040853Z&X-Amz-Expires=3600&X-Amz-SignedHeaders=host&X-Amz-Signature=86d7ef2dc799aeafb4b0f97cd55374fe2b570b3c5f7f2343d25e0736245d0f71
- Prieto, J., & Saenz, J. (2011). Indicadores de la calidad de planta en viveros de la sierra madre occidental. Libro Técnico Núm. 3. Campo Experimental Valle del Guadiana. Centro de Investigación Regional Norte Centro. México.

- Reynel, C., & Marcelo, J. (2009). Árboles de los ecosistemas forestales andinos. Manual de identificación de especies. Serie de Investigación y Sistematización N° 9. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION. Lima.
- Rios, R. (2007). El aliso, especie a ser protegida. Ecuador. Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <https://lahora.com.ec/noticia/561117/el-aliso-especie-a-ser-protegida>
- Rivas, F. (2015). Etiología y caracterización de la pudrición del cogollo de la palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) en San Lorenzo, Esmeraldas, Ecuador.
- Robles, J., Koreen, L. P., & Perlin, D. (2014). Multilocus sequence typing is a reliable alternative method to DNA fingerprinting for discriminating among strains of *Candida albicans*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(6): 2480-2488.
- Rojas, M. (1992). The Species Problem and Conservation: What are We Protecting? *Conservation biology*, 6(2): 170-178
- Sinclair, W. A., & Lyon, H. H. (2005). Diseases of trees and shrubs (No. Ed. 2). Comstock Publishing Associates. Estados Unidos.
- Sneh, B., Burpel, L., & Ogoshi, A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press. The American Phytopathological Society, 133. Recuperado el 20 de junio del 2019 de: <http://www.mycobank.org/BioLomics.aspx?TableKey=14682616000000061&Rec=7963&Fields=All>
- Stefanova, M., Leiva, A., Larriganaga, L., & Coronado, M. (1999). Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma* spp. para el control de hongos fitopatógenos del suelo. *Revista de la Facultad de Agronomía-Universidad del Zulia*, 16(5): 509-516.
- Sun, H. (2002). Tethys retreat and Himalayas-Hengduanshan mountains uplift and their significance on the origin and development of the Sino-Himalayan elements and alpine flora. *Acta Bot Yun* 24: 273-288.
- Tuset, J. (1983). La "gomosis" y "podredumbre del cuello de la raíz" de nuestros agríos. I. aspectos biológicos y patológicos. *Levante Agrícola* 246: 90-96.
- Villegas, M. (2005). *Trichoderma*. Características generales y su potencial biológico en agricultura sostenible. Recuperado el 20 de junio del 2019 de: [https://www.oriusbio-tech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%](https://www.oriusbio-tech.com/escrito?nom=Trichoderma_pers._Caracter%C3%99)

ADsticas_generales_y_su_potencial_biol%C3%B3gico_en_la_agricultura_sostenible.

- Wiater, A., Szczodrak, J., & Pleszczynska, M. (2005). Optimization of conditions for the efficient production of mutan in streptococcal cultures and post-culture liquids. *Acta Biologica Hungarica*, 56(1-2): 137-150.
- Zamora, V., & Casin, J. (1986). El género *Phytophthora* como causante de enfermedades en los cítricos. *Boletín de Reseñas. Cítricos y otros Frutales. Bolivia*. 24(1)
- Zentmyer, G., & Erwin, D. (1970). Development and reproduction of *Phytophthora*. *Phytopathology*, 60(7): 1120-1127.
- Zentmyer, G., & Mitchell, D. (1986). *Phytophthora* diseases of fruit trees in the tropics. *Phytopathol.* 24: 311-338.
- Zharare, G., Kabanda, S., & Poku, J. (2010). Effects of temperature and hydrogen peroxide on mycelial growth of eight *Pleurotus* strains. *Scientia Horticulturae*. 125 (2): 95-102.

XII. ANEXOS

Anexo 1. Permiso de Investigación del Ministerio del Ambiente de Chimborazo.

MINISTERIO DEL AMBIENTE

Oficio Nro. MAE-DPACH-2018-2326-O
Riobamba, 30 de noviembre de 2018

Asunto: RESPUESTA: Solicitud de autorización de la investigación científica de mi trabajo de titulación.

Juan Luis Guerra Boenaño
En su Despacho

De mi consideración:

En respuesta al Documento No. MAE-DPACH-2018-2525-E, donde, solicita la emisión de la autorización de investigación científica con el tema: "Caracterización de mecanismos biocontroladores de *Trichoderma spp* y evaluación del efecto protector en Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en vivero", para optar por el título de Ingeniero forestal.

Me permito informar que una vez que se verificó que el proyecto cumple con lo establecido en el artículo 8 del libro IV del TULSMA y ha cumplido con el pago establecido en el Libro IX, se elaboró la Autorización de Investigación científica, Nro. 25-IC-DPACH-MAE-2018, con el tema: "Caracterización de mecanismos biocontroladores de *Trichoderma spp* y evaluación del efecto protector en Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en vivero". La misma que adjunto para su lectura y conocimiento de las obligaciones que adquiere en calidad de investigador.

Favor tomar en cuenta las fechas de vigencia y de entrega de informe final.

Cabe recalcar que esta solicitud que es atendida en base al Memorando Nro. MAE-VMA-2018-0095-M, de fecha 18/05/2018, el mismo que menciona "(...) El MAE continuará otorgando los permisos de colecta, guías de movilidad de recursos biológicos y demás permisos o autorizaciones relacionadas con manejo ex situ de recursos biológicos (...)".

Con sentimientos de distinguida consideración.

Atentamente,



Ing. Marcelo Patricio Pino Cáceres
DIRECTOR PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO, ENCARGADO

Referencias:
- MAE-DPACH-2018-2525-E

Anexos:
- img1170075818001542120909.pdf
- no_25_ic_dpach_mae_2018-1.pdf

mia/cac

 **Ministerio del Ambiente**
DIRECCIÓN PROVINCIAL DEL AMBIENTE DE CHIMBORAZO

Dirección Provincial de Chimborazo • Código Postal: 060103 / Riobamba - Ecuador • Teléfono: (593 3) 2610029
Dirección: Av. 9 de Octubre y Duchicela, Quinta Macaji

Documento generado por Océlna

1/1



AUTORIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Nro. 025-IC-DPACH-MAE-2018

FLORA:

FAUNA:

VARIOS: X

El Ministerio del Ambiente, en uso de las atribuciones que le confiere la Codificación a la Ley Forestal y de Conservación de Áreas Naturales y Vida Silvestre, autoriza a:

Nombres y Apellidos	C.C.	Nacionalidad
Juan Luis Guerra Buenaño	1724514243	Ecuatoriana

Para llevar a cabo la investigación: "Caracterización de mecanismos biocontroladores de *trichoderma* spp y evaluación del efecto protector en aliso (*Alnus acuminata* Kunth) en vivero".

De acuerdo a las siguientes especificaciones:

1. Solicitud de Juan Luis Guerra Buenaño.
2. Auspicio de institución científica nacional: ESPOCH, Escuela de Ingeniería Forestal.
3. Auspicio de institución científica internacional: Ninguna
4. Institución que financia la investigación: Autofinanciada
5. Contraparte de la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo: Ing. Alberto Paul Castelo Castelo Responsable de la Unidad de Patrimonio Natural.
6. Vigencia de esta Autorización: 26/11/2018 a 26/09/2019
7. Fecha de entrega de informe final: 26/10/2019
8. Valoración Técnica del Proyecto: Mvz. Maria Dolores Astudillo
9. Se autoriza la colección de muestras de Aliso (*Alnus acuminata* Kunth) con signos o síntomas de enfermedad.
10. También se autoriza la colección de 500 g d muestras de suelo de las camas de germinación, para el aislamiento de *Trichoderma* spp. Según la metodología que consta en el proyecto.
11. Esta Autorización NO HABILITA LA MOVILIZACIÓN DE FLORA / FAUNA O MICROORGANISMOS, sin el correspondiente permiso. Competencia de cada una de las direcciones provinciales del MAE, y que deberá gestionarse en cada dependencia.
12. Esta Autorización NO HABILITA EXPORTACIÓN DE FLORA/FAUNA O MICROORGANISMOS, sin la correspondiente autorización de la Dirección Nacional de Biodiversidad o cada uno de los Centros de Tenencia y Manejo de Flora/Fauna (Herbarios/ Museos de Historia Natural) que cuente con patente vigente emitida por la Autoridad Ambiental.
13. De los resultados que se desprenda de la investigación, no podrán ser utilizados para estudios posteriores de Acceso a Recurso Genéticos sin la previa autorización del Ministerio del Ambiente.
14. Estos especímenes NO podrán ser utilizados en actividades de BIOPROSPECCIÓN NI ACCESO AL RECURSO GENÉTICO, sin la correspondiente Autorización del Ministerio del Ambiente, caso contrario se procederá como lo establece el COIP.- Artículo 248.- Delitos contra los recursos del patrimonio genético nacional.

Obligaciones del investigador:

15. Entregar a la Dirección provincial del Ambiente de Chimborazo, (02) dos copias del informe final impreso en formato PDF, (incluyendo una versión digital), de los resultados de la autorización otorgada. (Solicitar Formato).
16. Lista taxonómica de las especies debidamente identificadas, objeto de la autorización de colecta con sus respectivas coordenadas. (Solicitar Formato).
17. Citar en las publicaciones científicas, Tesis o informes técnicos científicos el número de Autorización de Investigación Científica otorgada por el Ministerio del Ambiente, con el que se colectó el material biológico.
18. Entregar copias de las publicaciones a la Dirección Provincial del Ambiente de Chimborazo
19. Entregar copias del material fotográfico que puedan ser utilizados para difusión. (Se respetará los derechos de autoría).

Del incumplimiento de las obligaciones dispuestas en los numerales 15,16, 17, 18, 19, se responsabiliza al investigador Juan Luis Guerra Buenaño.

SE AUTORIZA LA COLECCIÓN EN LAS PROVINCIAS, CANTONES Y ÁREAS PROTEGIDAS:

Provincia de Chimborazo, Cantones Riohamba y Chambo. Viveros: Ceas, José Villagomez, Forestal Plantas, Vidéfor, Espoch y Hacienda experimental Tunshi.

SE AUTORIZA EL ESTUDIO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS CON EL PROPÓSITO DE:

1. Caracterizar los mecanismos biocontroladores de *Trichoderma* spp y evaluar el efecto protector en Aliso en (*Alnus acuminata* Kunth).

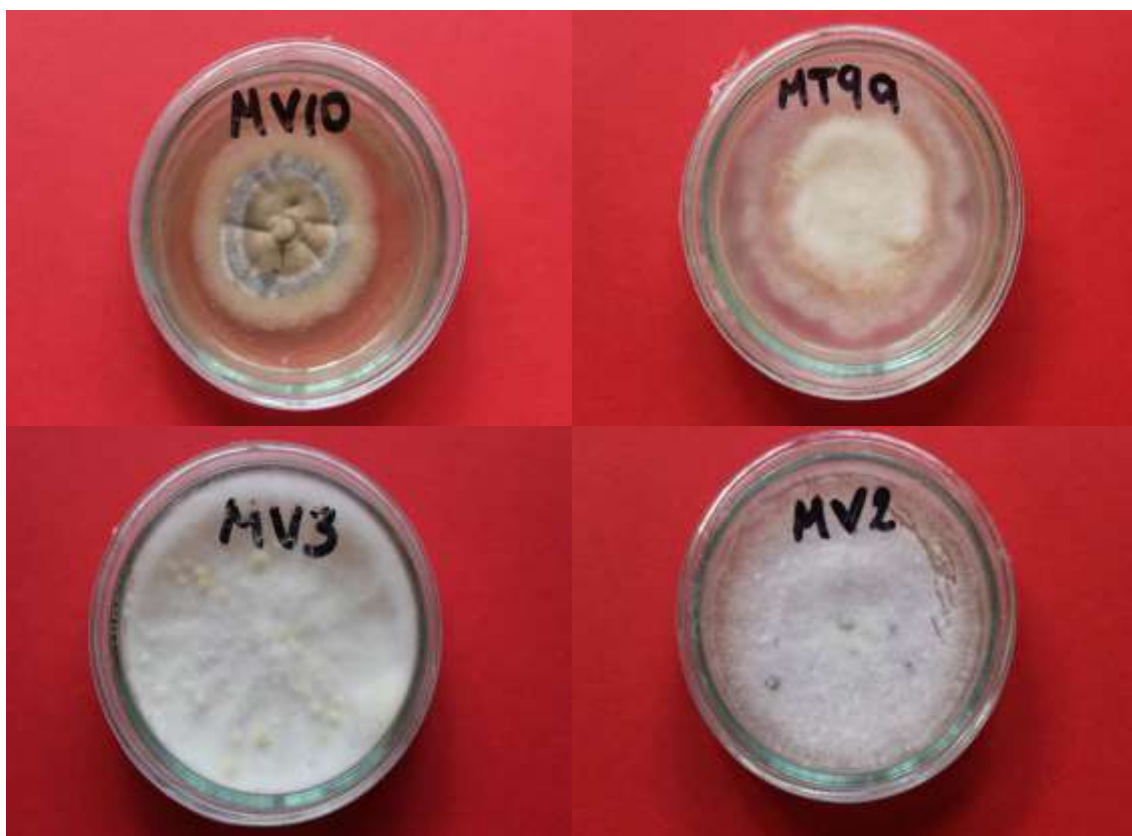
Anexo 2. Recolección de muestras en vivero.**Anexo 3.** Procesamiento de las muestras.

Anexo 4. Aislamiento por inclusión de fragmentos en medio de cultivo Agar.

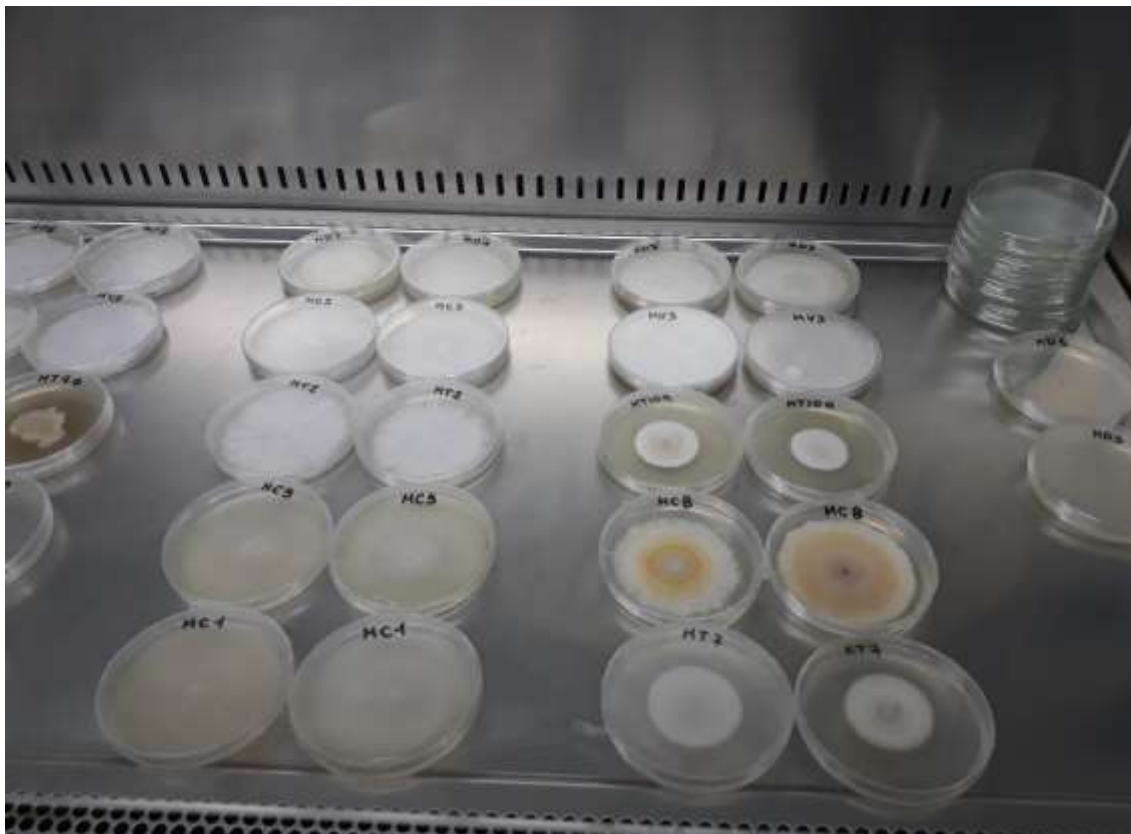


Anexo 5. Repique de aislados para purificación.



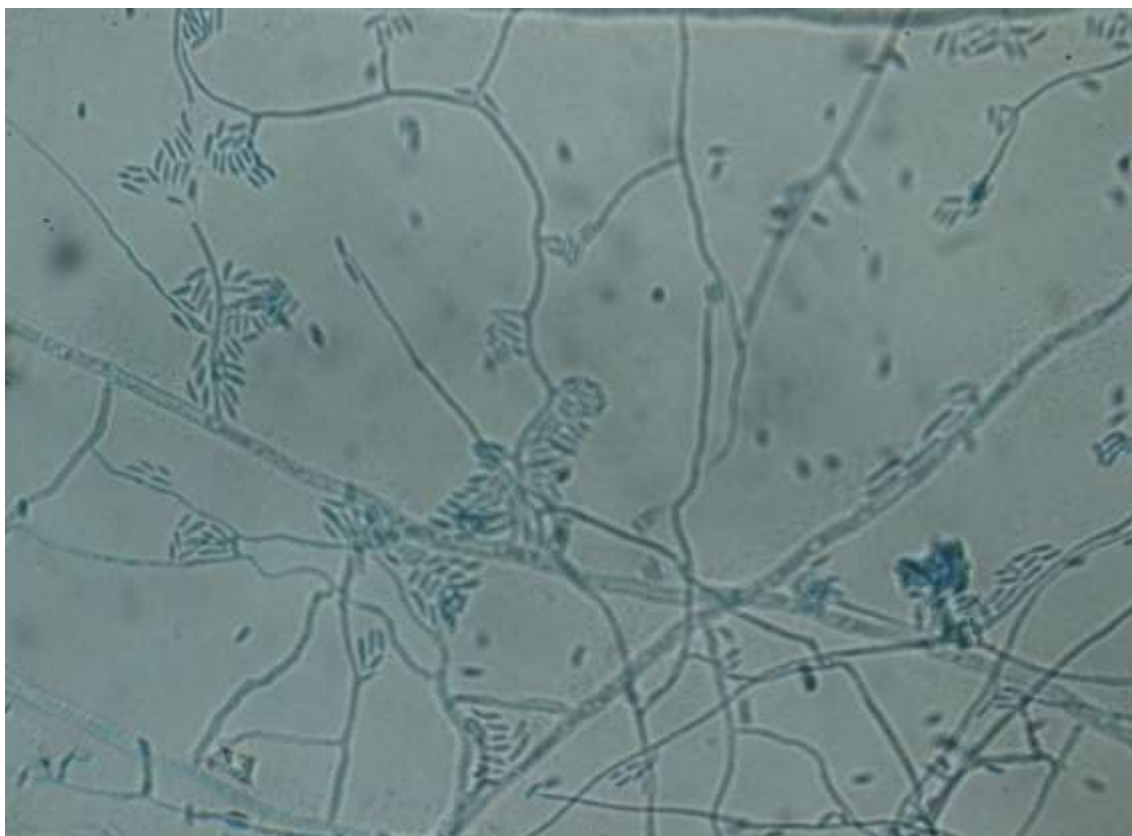
Anexo 6. Cultivo monospórico.**Anexo 7.** Aislados monospóricos

Anexo 8. Conservación de aislados en cajas Petri con medio PDA.



Anexo 9. Aislados conservados en Glicerol para refrigeración.



Anexo 10. Elaboración de microcultivo.**Anexo 11.** Microcultivo bajo microscopio para identificación morfológica

Anexo 12. Muestras enviadas para análisis molecular.



Anexo 13. Evaluación de crecimiento radial.





Anexo 14. Evaluación de la Inhibición de Crecimiento.



Anexo 15. Limpieza y adecuación del laboratorio y materiales del Proyecto.



Anexo 16. Limpieza de cristalería.



Anexo 17. Cajas de Petri en Incubación.



Anexo 18. Desinfección de cámara de flujo laminar.



Anexo 19. Clave de colores para la caracterización cultural.