

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO-ESPE

CARRERA DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS - IASA

“GRAD. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”

“PRODUCCION DE INOCULANTES A BASE DE *Trichoderma* spp. PARA EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae* EN INJERTOS DE BABACO (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco)”

ELABORADO POR: DIANA MARÍA CUEVA ROSILLO

INFORME TÉCNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO COMO REQUISITO PARA OPTAR EL TÍTULO DE ING. AGROPECUARIA

SANGOLQUÍ-ECUADOR

2007

I. RESUMEN

Este estudio evaluó la producción de bioformulados (inoculantes) a base de *Trichoderma* spp para el control de *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae* en plantas de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco) injertadas en papaya hawaiana. Para lo cual se aislaron diversas cepas de *Trichoderma* spp de tres provincias, tomando muestras de suelo a 20 cm de profundidad, luego se purificó y se preservaron las cepas obtenidas. En laboratorio se efectuaron pruebas de eficiencia *in vitro* (pruebas duales) entre las cepas de *Trichoderma* spp y *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* para medir el crecimiento diametral y la capacidad antagónica por 6 días, seleccionando así las dos mejores cepas, *Trichoderma album* y *Trichoderma koningii*. En arroz se produjo los bioformulados a base de *T. album* y *T. koningii* incubados 28°C por 7 días para luego almacenarlos en refrigeración a 4°C, por cinco meses efectuando controles de calidad cada mes, mediante un conteo en la cámara de Neubauer en donde se halló que el mayor número de esporas x ml perteneció a *T. album* y fue de 2 a 2.9×10^{10} ufc/ml. Se aplicó bajo invernadero a temperatura y humedad controlada mediante disoluciones las diversas concentraciones de las dos mejores cepas de *Trichoderma*, a las plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana y 15 días después se inoculó artificialmente *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* en concentración de 10^4 ufc/ml y se evaluaron durante dos meses, las distintas variables. Los datos demostraron que el mejor incremento diario de altura del injerto fue de 0.06 cm en el grupo de plantas tratadas con inoculante a base de *T. album* debido al efecto positivo en el crecimiento, sin embargo las dos cepas de *Trichoderma* realizaron un buen control sobre el fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*. Papaya hawaiana como patrón otorgó cierto grado de tolerancia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*, pero es susceptible a otros patógenos como *Phytophthora palmivora* y bacterias, por lo que es un patrón poco apto para las condiciones ambientales de nuestro país.

II. SUMMARY

This study evaluated the bioformulated production based on *Trichoderma* spp for the control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae* in plants of babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco) grafted in hawaiian paw paw. For these were isolated diverse stumps of *Trichoderma* spp of three provinces, taking soil samples to 20 cm of depth, then the obtained stumps became purified and were preserved. In laboratory efficiency test *in vitro* (dual tests) were made between the stumps of *Trichoderma* spp and *Fusarium oxysporum* f sp *caricae* to measure the diametrical growth and the antagonistic capacity for 6 days, selecting this way the two better stumps that were *Trichoderma album* and *Trichoderma koningii*. In rice we produced the bioformulated based on *T. album* and *T. koningii* incubated for 7 days at 28°C for then to be stored in refrigeration at 4°C for five months making quality controls every month by a count in the Neubauer camera where was that the biggest number of spores x ml belonged to *T. album* and it went from 2 to 2.9×10^{10} ufc/ml. It was applied inside a hothouse to temperature and humidity controlled by dissolution of the diverse concentrations of the two better stumps of *Trichoderma*, to the babaco plants implanted later in hawaiian paw paw and 15 days later we inoculates artificially *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* in concentration of 10^4 ufc/ml, they were evaluated during two months, the different variables. Data showed that the best daily increment in height of the grafted was of 0.06 cm in the group of plants inoculated with *T. album* because of positive effect on growth, however the two stumps of *Trichoderma* carried out a good control on the fitopatogeny *Fusarium oxysporum* f sp. *caricae*. Hawaiian paw paw like pattern grants certain grade of tolerance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*, but it is vulnerable to another patogeny like *Phytophthora palmivora* and *bacterium*, for what is a not very capable pattern for the environmental conditions of our country

1. INTRODUCCION

El babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco) es una especie originaria de la región sur de nuestro país, en las últimas décadas ha sido catalogada dentro del mercado internacional como una fruta exótica que está dirigida a nichos de mercado gourmet, adicionalmente es exportada hacia la Unión Europea especialmente por Holanda y Alemania.

En el año 1998 una empresa agroindustrial realizó una amplia promoción para el cultivo de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv babaco), ofreciendo comprar la producción para su procesamiento y exportación en pulpa (Falconí y Brito, 2004). La potencialidad del cultivo es grande siendo así muy cotizada en los mercados internacionales llegando a venderse hasta en 3.30 USD por kilogramo (CFN, 1986)

En las últimas dos décadas se ha intensificado la producción bajo invernadero, con altibajos tanto en rendimiento como en el incremento de problemas fitosanitarios. La problemática del cultivo gira entorno a los limitantes en la producción relacionados con la forma de reproducción del cultivo y el impacto de enfermedades fungosas. El babaco se reproduce de forma asexual lo que además de causar problemas de pérdida de variabilidad genética, está directamente relacionado con el desarrollo de enfermedades causadas por patógenos, especialmente hongos.

En cuanto a enfermedades, el principal problema del cultivo es la marchitez vascular o fusariosis causada por el hongo parásito *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*.

que se caracteriza por su gran capacidad de sobrevivencia en el suelo (Galarza, 2002), la infección se inicia a nivel vascular desde el tallo hasta el ápice; luego se propaga por todo el terreno, inhabilitando la siembra de babaco en un tiempo mediano. Actualmente esta enfermedad es el principal limitante en la producción de este cultivo en el Ecuador, ha llegado a distribuirse en todo el país, alcanzando una incidencia de hasta el 100% (Fonseca citado por en Galarza, 2002).

Para controlar la marchitez vascular del babaco el agricultor utiliza generalmente el control químico mediante mezclas de fungicidas como mancozeb y thiram por ser productos ligeramente a moderadamente tóxicos (Stefanova, 1998). Sin embargo, este tipo de mecanismos de control resultan no amigables con el medio ambiente. Por otro lado, técnicas de manejo cultural como rotación de cultivos por largos periodos de tiempo y la implementación de nuevas áreas de siembra, se han utilizado tradicionalmente con resultados de relativa eficiencia en el control de la enfermedad.

Una alternativa efectiva al uso de productos químicos es el control biológico que en sentido amplio se puede definir como la reducción del agente patógeno causante de la enfermedad por acción de microorganismos vivos (Baker, 1987), esta es una de las posibilidades en protección de plantas y frutas frente a las enfermedades.

Se ha demostrado que un buen control de *Fusarium* spp, se puede lograr realizando un filtrado de esporas con *Trichoderma viride*, *T. harzianum* y *T. pseudokoningii*, lo cual indica que la inoculación de este antagonista en plantas puede resultar muy interesante para el control de enfermedades fúngicas (Erazo, 2000).

Lo que se plantea en esta investigación es la producción de inoculantes a base de *Trichoderma* spp., y la protección de plantas injertadas de babaco en papaya hawaiana (*Vasconcellea papaya* var. hawaiana) midiendo así el comportamiento del patrón y antagonista frente a la inoculación del patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* todo esto permitirá dar un servicio de calidad a los agricultores proporcionando plantas libres de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*., y de esta manera asegurar que la cosecha esperada será de calidad exportable.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Producir inoculantes a base de *Trichoderma* spp., para control de *Fusarium oxysporum* f.sp *caricae* en injertos de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco).

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Aislar y caracterizar cepas de *Trichoderma* spp., con potencial microbiológico de control a *Fusarium oxysporum* f.sp *caricae*.

Realizar pruebas de eficiencia *in vitro* (antagonismo) de cepas de *Trichoderma* spp contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*.

Formular inoculantes (bioformulados) a base de *Trichoderma* spp. , eficiente en el control *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*.

Realizar un control de calidad de los inoculantes obtenidos por hasta cinco meses.

Determinar la eficiencia bajo invernadero de inoculantes a base de *Trichoderma* spp en plantas injertadas de babaco (*Vasconcellea heilbornii* cv. babaco) en papaya hawaiana (*Vasconcellea papaya* var. hawaiana).

3. REVISION DE LITERATURA

3.1. CULTIVO DEL BABACO

3.1.1 *Origen y Distribución Geográfica.*

El babaco es un híbrido natural proveniente de la cruce de las especies *Vasconcellea stipulata* (toronche) y *Vasconcellea pubescens* (chamburo), siendo así parte del la genero *Vasconcellea*, a la cual también pertenecen el papayuelo (*V. goutodiana*) y siglagón (*V. cundinamarcensis*) (Falconí y Brito, 2004).

El babaco es una especie vegetal originaria de las zonas altas de Ecuador y Colombia. En estos lugares recibe varios nombres como babaco o papayuela. En estado silvestre se encuentra, desde hace varios decenios, en los valles abrigados del callejón interandino y lugares secos de la costa. Según Falconí y Brito (2004), esta distribución geográfica se debe a que el babaco requiere de zonas donde no exista una fuerte presencia de vientos y heladas.

En el Ecuador el cultivo del babaco se localiza principalmente en las provincias de: Imbabura (Chaltura, Pimampiro, Atuntaqui, Perucho); Tungurahua (Patate y Baños); Pichincha (Tumbaco, Guayllabamba y Sangolquí), Carchi (Mira, Bolivar); Azuay (Paute); Loja (Vilcabamba, Catamayo), entre otros (Soria y Viteri, 1999).

En la actualidad mediante el empleo de invernaderos se ha ampliado a zonas de mayor altura y altas precipitaciones (Soria y Viteri, 1999). Se afirma que el babaco produce 200 Tm/ha durante un periodo de producción determinado de dos años, con una densidad de 5500 plxha⁻¹ y un peso promedio de 1.5 y 1.6 kgxfruto⁻¹ (Viteri, 1992).

3.1.2 Clasificación Taxonómica

El babaco fue clasificado, por primera vez en 1922 como *Carica pentágona* H, por O. Heilborn. La denominación se debió a la forma pentagonal del fruto en baya con aristas angulares levemente deprimidas y cinco lados. Por su etiología el babaco está ubicado dentro del género *Carica* del griego *karike* nombre de una higuera, establecido por Linneo debido a la semejanza de sus hojas. Según Storey revisado por Falconí y Landázuri (2005), la familia *Caricaceae* incluye los géneros *Carica*, *Jacaratia*, *Jarilla*, *Cylicomorpha*. Dentro de estos se han descrito 31 especies, todas las *Caricas* incluyendo el babaco, tienen número cromosómico de $2n = 2x = 18$.

Badillo (1967), establece el carácter híbrido del babaco por el cruce natural entre *Vasconcellea pubescens* L. (chigualcán) y *Vasconcellea estipulata* (toronche) lo que le da la categoría de notomórfo (noto: nuevo, morfo: segregado genético de una población) (Badillo citado por Requena, 1972; CFN, 1986).

Mediante esta descripción Badillo establece una nueva nomenclatura del babaco como: *Carica heilbornii* Badillo nm *pentágona* (Heilborn Badillo) (Camacho y Rodríguez, 1982). Posteriormente Horovit y Jiménez confirman la denominación realizada por Badillo como un híbrido natural entre las dos especies, haciendo cruces

entre *V. pubescens* y *V. stipulata* reproduciendo una serie de híbridos idénticos al babaco, descartando la primera clasificación de Heilborn (Cossio, 1987).

Badillo (2001), citado por Marcillo y Ruales, (2004), registran como nota correctiva en el proyecto Valorización Integral del Babaco, el nombre científico del babaco como *Vasconcellea heilbornii* cv babaco, quedando la clasificación taxonómica de la siguiente manera: Reino: Plantae, Clase: Angiospermae; Subclase: Dicotyledonae; Orden: Parietales; Familia: Caricaceae; Género: *Vasconcellea*; Especie: *heilbornii* (INIAP, 2003).

3.1.3 Aspectos Botánicos.

Planta arbustiva, semi-perenne- cuyo tallo alcanza más de 2 m de altura. El sistema radical lo conforman raíces carnosas verticales que generalmente no alcanzan profundidades superiores a 1m., o menos, de las cuales se desprenden raíces secundarias absorbentes superficiales que pueden llegar a medir de 50 a 60 cm., de color crema amarillento oscuro, cuando se cortan exudan látex (Soria y Viteri, 1999).

El tallo es recto, cilíndrico, no leñoso, verde cuando joven para tornarse de tono castaño grisáceo en edad adulta. Puede alcanzar una altura de 2 a 3m o más dependiendo de la edad de planta. El tallo puede medir 30 a 40 cm

de diámetro basal; retiene gran cantidad de agua, es succulento, no muy lignificado, flexible pero a la vez resistente (Camacho y Rodríguez, 1982).

Las hojas insertadas al tronco alternadamente, limbo lobulado con cinco a siete lóbulos son palmo-lobulares; nervadura marcada, pecíolo largo. Su verde cambia de tonalidades, según la fase de desarrollo. Una hoja adulta incluido su pecíolo puede llegar a tener una longitud de 80 a 100 cm. (Fabara *et al*, 1985).

El babaco es una planta monoica constituida por flores femeninas de pétalos blanco-amarillento-verdoso y sépalos verde-oscuro. No presenta anteras y filamentos. El fruto es una baya pentagonal, sin semilla de 20 cm. de largo por 6 cm. de diámetro que no necesita polinización para desarrollarse. El fruto promedio pesa de 300 a 1200 g. La epidermis del fruto es verde cuando está en crecimiento y a la madurez es amarilla; la pulpa de color crema, acuosa y con olor especial, sobre todo cuando está maduro (Falconí y Brito, 2004). El número de frutos por planta varía, pues los produce a medida que va creciendo. Cada planta puede producir anualmente 25 a 30 frutos.

3.1.4 Manejo del Cultivo

El cultivo comienza a producir a los 10 o 12 meses luego de la siembra y se alarga hasta los 36 o más meses. Bajo invernadero comienza a producir luego de los 16 meses pero pueden producir 32 kg de fruta por m² con una densidad de 0.8 plantas por m².

3.1.4.1 Propagación.

El babaco se puede reproducir solamente por vía asexual o vegetativa, debido a que posee un fruto paternocárpico, que no produce semilla.

3.1.4.1.1. Por estacas.

Se propaga a través de estacas en vivero, la plantación se realiza cuando las estacas que brotaron alcanzan una altura de 30 a 40 cm. El tiempo que generalmente se demora para llegar a dicha altura es de 60 a 70 días luego de haber sido sembrada (Falconí y Brito, 2004).

Las estacas se obtienen de plantas maduras de mínimo dos años de producción. La longitud de las estacas debe estar entre los 25 a 30 cm y 3 a 20 cm de diámetro. Deben tener un corte superior en bisel para evitar el

empozamiento de agua por motivo de las lluvias y un corte basal transversal para tener una mayor superficie de enraizamiento (AAIC, 2003).

Se aconseja para luego de la realización de los cortes la aplicación de Rootone en dosis de 4 g en 20 litros de agua, en la base de la estaca, para estimular la producción de raíces (enraizamiento). Este material debe permanecer durante 4 días bajo sombra tiempo en el cual eliminará el látex y cicatricen los cortes. Una vez realizadas estas labores se desinfecta las estacas con un fungicida sistémico para evitar enfermedades (Falconí y Brito, 2004). Se siembra en el terreno o en estaquilleros, que tienen un sustrato que permita la aireación para evitar el exceso de humedad, se puede utilizar pomina, el enraizamiento se logra a las 10 semanas.

3.1.4.1.2. Por brotes tiernos.

Es una forma de propagación muy utilizada a nivel de invernadero o en camas de enraizamiento protegido con plástico (semitransparente). El método consiste en extraer de plantas en crecimiento o en fase de producción brotes que tengan una longitud de 10 cm y un diámetro de 1.0 a 2.5 cm (AAIC,

2003). Luego se procede a enraizar pero previamente se corta la parte superior para estimular la brotación de las yemas. El lugar donde se coloca los nuevos brotes debe desinfectarse con anterioridad con Vitavax (captan + carboxin). Los brotes deben ser mantenidos en condiciones circundantes de 90% de humedad relativa y 22 °C de temperatura (Falconí y Brito, 2004). Luego de 6 a 7 semanas los brotes están listos para ser transplantados a fundas plásticas. El sustrato usado en las fundas debe contener dos partes de tierra negra y una de pomina, además debe estar adecuadamente desinfectado con hidróxido de cobre 200 g y carbendazim 200 cm³ mezclados en 200 litros de agua (Falconí y Brito, 2004).

3.1.4.1.3. Por injerto.

La injertación según Zecca (2000), es un proceso por el cual dos porciones de tejido vegetal viviente son unidos entre si, con la finalidad que se desarrollen como si se tratara de una sola planta. Por lo general los portainjertos son especies de la misma familia que proporcionan cierta

resistencia a enfermedades como la papaya criolla que proporciona cierto grado de tolerancia a *Fusarium oxysporum*.

El tipo de injerto más usual para estos casos es el de púa terminal o asa terminal, que consiste en decapitar el patrón ya sea babaco o papaya a una altura de 10 a 15 cm., luego se realiza una hendidura diametral longitudinal donde se injerta al babaco con 2 o más yemas, por último se cubre con cinta plástica para favorecer la unión del patrón y evitar el ingreso de agentes nocivos al vegetal (AAIC, 2003).

Chávez (2006), afirma afinidad de brotes de babaco con portainjertos de papaya, utilizando la técnica de injertación en púa terminal, mostrando buen nivel de compatibilidad entre el babaco y las variedades de papaya criolla y hawaiana.

Algunas especies por su misma naturaleza presentan un carácter de rusticidad frente a condiciones adversas ya sea del tipo sustrato, del tipo climático o efectos producidos por alguna plaga o enfermedad (Cabrera, 2000). Dicha rusticidad o resistencia a estas condiciones no la comparten otras especies vegetales que son útiles para el hombre. Gracias al injerto las características de los dos tipos de plantas, se

combinan y se logra plantas menos susceptibles que pueden gozar de los beneficios de otras resistentes, creando así una especie vegetal útil y a la vez resistente (Zecca, 2000).

3.1.4.1.4 Propagación *in vitro*

En la actualidad se está realizando cultivos *in vitro*. El cultivo *in vitro* comprende un grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal) se cultiva en forma aséptica en un medio artificial que aporta los nutrientes necesarios para el desarrollo inicial y posteriormente se mantienen en ambiente externo controlado (Roca y Mroginski, 1993).

Uno de los objetivos que persiguen el cultivo *in vitro* es la obtención de material vegetal libre de patógenos que pueda ser propagado posteriormente con éxito. Al obtener en laboratorio plantas que se encuentren libres de patógenos, se garantiza que el agricultor pueda disponer de plantas limpias y disminuir los riesgos de enfermedades por manejo de material de propagación contaminado (Roca y Mroginski, 1993).

En Italia y Nueva Zelanda, los programas están enfocados a la producción *in vitro* de plantas de babaco libres de bacterias endógenas las cuales se ha comprobado que afectan considerablemente el rendimiento y productividad del cultivo (Litz y Conover, 1981).

3.1.4.2. Siembra

Las labores de siembra se inician con el arado que tiene como función el roturar el suelo. Generalmente el arado llega hasta una profundidad de 40 cm., para producir un

adecuado desarrollo radical del babaco. La época adecuada para realizar el arado es al final de la estación seca. En Ecuador coinciden con los meses de agosto, septiembre y octubre (AAIC, 2003).

Para el babaco se aconseja terrenos planos y cuadrados. La distancia de plantación entre planta y planta dentro del lote es de 1.2m x 1.5m (5,500 plantas por hectárea), según la pendiente del terreno (pero en los casos de tener pendiente se aconseja el sistema de siembra de tres bolillo o en curvas de nivel). Finalmente se aplica un desinfectante antes de la siembra con hidróxido de cobre 200g y carbendazin 200cm³, en 200 litros de agua (Falconí y Brito, 2004).

3.1.4.3 Brotes y poda

Generalmente las plantas de babaco jóvenes emiten varios brotes nuevos, por lo que se deberá seleccionar el número de brotes deseados de acuerdo a las distancias de plantación, nutrición, tipo de plantación (invernadero o campo abierto), calidad de la fruta (tamaño y peso), de acuerdo al mercado de destino, determinado en la planificación (Soria y Viteri, 1999).

En invernadero, debido a que es necesario aprovechar al máximo el espacio, se recomienda dejar uno a dos brazos por planta, debiendo estar opuestos para el caso de 2 brazos. En el caso de tres brazos las plantas ocupan mucho espacio y se amplía la competencia por luz; esta sería una alternativa junto con la de 2 brazos, para reducir el tamaño de la fruta para su exportación (Soria y Viteri, 1999).

3.1.4.4 Control de malezas

La mejor opción para el control de malezas son las actividades de tipo manual para mantener el suelo limpio. El objetivo es evitar la proliferación de enfermedades y plagas (Viteri, 1992).

3.1.4.5 Riego

El manejo del riego se constituye en una práctica fundamental en el desarrollo del cultivo de babaco. Este dependerá del tipo de suelo, profundidad del suelo y raíces, estado fenológico del cultivo, método de riego, así como de la temperatura y humedad relativa del invernadero (Calvache, 1998).

3.2 TRICHODERMA

3.2.1 Origen y Distribución Geográfica

El género *Trichoderma* es un hongo cosmopolita presente en suelos silvestres, madera descompuesta y material vegetal. Numerosas especies de *Trichoderma* son frecuentemente componentes dominantes de la microflora del suelo en diversos hábitats. Esto es atribuible a la diversa capacidad metabólica de especies de *Trichoderma* y su naturaleza agresivamente competitiva (Kubicek y Harman, 1998).

La mayor parte de especies conocidas del género *Trichoderma* están raramente asociadas con enfermedades en plantas, sin embargo cepas agresivas como *T. harzianum* pueden causar pérdidas significativas en la producción comercial de hongos comestibles (Kubicek y Harman, 1998).

Desde el punto de vista agrícola *Trichoderma* junto con *Gliocladium* son hongos no patogénicos habitantes del suelo, más estudiados por su antagonismo con otros hongos incluyendo patógenos propios del suelo, como *Rhizoctonia solani*. Las especies de *Trichoderma* son productoras de enzimas quitinolíticas y glucanasas que les permiten degradar paredes celulares de otros hongos (Soglio revisado por Erazo 2001). Su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales, son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Harman, 1998). Esta capacidad de adaptación a diversas condiciones medioambientales y sustratos confiere a *Trichoderma* la posibilidad de ser utilizado en la industria biotecnológica en la producción de biopesticidas eficientes en el control de enfermedades del suelo.

3.2.2 Taxonomía y Características Morfológicas

Según Webster (1989) revisado por Yandum V, 2001; Gams y Bissett revisado por Kubicek y Harman (1998); clave interactiva de la APS de Samuels *et al* (2006);

Trichoderma se clasifica dentro del Reino: Myceteae; División: Eumycota; Subdivisión: Deuteromycotina; Clase: Hyphomycetes; Subclase: Hyphomycetidae; Orden: Moniliales; Familia: Moniliaceae; Género: *Trichoderma*.

Las diversas especies de *Trichoderma* son mas o menos similares, presentando unos pocos caracteres taxonómicos diferentes que tienen importancia para la identificación de especies (Rifai, 1969). La morfogénesis se define como el desarrollo de un organismo. Para género *Trichoderma* uno de los caracteres taxonómicos mas usados para la clasificación de especies de *Trichoderma* es la diferenciación de sus células, en cuanto a forma, tamaño, función y composición química (Turian, 1983).

Papavizas (1985), refiere que el estudio sobre el desarrollo, morfogénesis y esporulación *in vitro* del género *Trichoderma* es muy útil si la información derivada de estos puede ser utilizada para el desarrollo de biomasa a grandes escalas y emplearlas en el control biológico.

La esporulación en la mayoría de las especies del género *Trichoderma*, es favorecida por su fotosensibilidad y como consecuencia de esto esporulan bien en varios sustratos, ya sean naturales o artificiales (Papavizas, 1985). Este mismo autor señala que la exposición de cepas a luz, durante un tiempo de 20 a 30 segundos induce la esporulación, sin embargo la mejor fotoinducción a fialoconidiogénesis ha sido obtenida cuando las cepas fueron expuestas a la luz del día durante tres minutos.

Trichoderma forma colonias de color blanco a verde intenso que crecen rápidamente en medios de cultivo artificiales, el color varía debido a la pigmentación de las esporas, son floccosas, suaves. Las colonias pueden ser compactas o sueltas,

existiendo variaciones entre ambos extremos; estas características pueden estar correlacionadas en parte con las estructuras de los conidióforos (Rifai, 1969).

El micelio es septado y hialino (transparente); a partir de él se originan los conidióforos aterciopelados, erectos o arrastrados, altamente ramificados más o menos cónicos, débiles o fuertemente verticilados y cortos que se separan con facilidad en cuyas partes terminales producen esporas (conidias) unicelulares, esféricas no septadas, subglobosas a elipsoidales y viscosas, a menudo reunidas en forma de racimos. Comúnmente forma clamidosporas, intercaladas o raramente terminales, las cuales son globosas a elipsoidales, hialinas y de pared suave (Romo y Ávila, 2000).

3.2.3 Mecanismos Antagónicos

En general los antagonistas no tienen un único modo de acción, por tanto la multiplicidad de modos de acción es una característica a seleccionar en un antagonista. Los riesgos de seleccionar al patógeno por resistencia al antagonista se reducen al actuar éste último por varios mecanismos. El riesgo de resistencia se reduce también mediante el uso de combinaciones de antagonistas de diferente modo de acción (Cook y Baker, 1983).

Trichoderma ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros hongos y así, aprovechar una fuente nutricional adicional. Se reporta varios mecanismos demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma* actúa como biocontrolador y como colonizador de las raíces.

Entre los principales mecanismos antagónicos utilizados por *Trichoderma* spp., se puede mencionar los siguientes:

3.2.3.1 Antibiosis

Esta ocurre cuando hay producción de metabolitos tóxicos o antibióticos de un organismo con acción directa sobre otro. Muchos microorganismos tienen la capacidad de producir antibióticos en cultivos puros, lo cual es la más fuerte evidencia de la posible acción de este tipo de compuestos como mecanismo de ataque de *Trichoderma* spp., bajo condiciones de campo. No obstante para este hongo en particular la producción de metabolitos está fuertemente ligada a la producción de enzimas propias del proceso de micoparasitismo (Hhjeljord y Tronsmo, 1998).

Trichoderma produce sustancias como trichodermina, dermadina, sequisterpeno, suzukacillina, alamethicina, trichotoxina y acetaldehído, todas con propiedades antifúngicas y antibacteriales; adicionalmente enzimas como β -1,3 glucanasa, quitinasa y celulasa son producidas por varias especies de *Trichoderma* que facilitan la habilidad del antagonista para atacar un amplio rango de patógenos ejerciendo su efecto sobre las paredes celulares (Romo y Ávila, 2000).

Trichoderma produce una variedad de metabolitos secundarios volátiles Ej: *Trichoderma koningii* produce un olor a coco y no volátiles, algunos de los cuales inhiben a otros organismos con los cuales no establece contacto físico. Entre las sustancias inhibitoras se encuentran la gliotoxina, viridina y gliovirina (Howell *et al*, 2000).

Trichoderma ha sido usado para combatir enfermedades en diversos cultivos como: algodón, ciruelos, uvas, camotes, lechuga, cebolla, arveja, manzanas y zanahorias causadas por patógenos como: *Pythium* sp., *Phytophthora* sp., *Rhizoctonia* sp.,

Sclerotinia sp. , *Botrytis* sp., y *Fusarium* sp. Varios aislamientos han demostrado ser exitosos en invernaderos y campo abierto, en el suelo y la filósfera (Erazo, 2001).

3.2.3.2 Micoparasitismo

Este mecanismo abarca diferentes interacciones antagonista-patógeno. Consiste en que el hongo antagonista enrolla y penetra el micelio del patógeno. Las hifas del antagonista se multiplican y expanden dentro de las hifas del hospedero, provocando la pérdida total del protoplasma, dejando solo células vacías. Durante este proceso el antagonista actúa como parásito, forma diferentes estructuras como abrazaderas, ganchos o apresorios que le permiten adherirse y provocar lisis y huecos en las células del patógeno. Desde 1932 cuando se reportó a *Trichoderma* como micoparásito de *Rhizoctonia solani*, se ha observado su parasitismo en numerosos hongos fitopatógenos (Romo y Ávila, 2000).

En el mecanismo de parasitación entre *Trichoderma* a otros hongos, se distingue cuatro estados: a) crecimiento quimiotrófico, en el cual, el estímulo químico proviene del hongo objeto de control; b) reconocimiento específico, probablemente mediado por aglutininas (lecitinas) sobre la superficie celular tanto del hongo antagónico como del patógeno; c) unión y crecimiento de las hifas alrededor del hospedero y d) secreción de enzimas líticas que degradan las paredes celulares del hospedero (Erazo, 2001).

3.2.3.3 Competencia

Se produce cuando dos o más organismos demandan un mismo recurso vital. La competencia entre agentes de control biológico y el fitopatógeno puede resultar en control biológico por aniquilación de la población perjudicial, y que puede favorecer a *Trichoderma* spp., debido a su alta frecuencia de crecimiento y desarrollo (Hhjeljord y Tronsmo, 1998).

Trichoderma está adaptado biológicamente para una colonización agresiva de nutrientes disponibles y persistencia como clamidosporas y conidias cuando los nutrientes son escasos. Las características saprofiticas de este género está reflejado en su uso como agente de biocontrol, cuando es inducido a comenzar su crecimiento por la presencia de nutrientes, este coloniza el sustrato rápidamente, algunas veces empleando antibiosis o micoparasitismo directo contra sus competidores (Erazo, 2001). La competencia por nutrientes también parece ser aquí el mecanismo mas potente empleado por algunas razas de *Trichoderma* para el control de *Fusarium oxysporum* (Hhjeljord y Tronsmo, 1998).

3.2.3.4 Inducción de resistencia secundaria en el hospedero.

Los procesos de inducción de resistencias en los tejidos vegetales son importantes y susceptibles de manipulación (Andrews, 1984). Algunos estudios indican que agentes de biocontrol pueden interaccionar con los tejidos de la planta, y esta desarrollar mecanismos de resistencia por alteraciones químicas y/u osmóticas que le favorezcan en contra del patógeno (McLaughlin *et al.*, 1990). Además la presencia de metabolitos secundarios producidos por algunos microorganismos, pueden inducir procesos de resistencia de la planta para la producción de sustancias inhibitorias.

3.2.4 Importancia Biotecnológica.

Trichoderma muestra una gran variabilidad genética, muchas razas son efectivas en una gran variedad de habitats contra diversas clases de patógenos del suelo. Se lo ha usado para combatir enfermedades en varios cultivos como algodón, uvas, camote, lechuga, cebolla, arvejas, ciruelos, manzanas y zanahorias. *Trichoderma* es especialmente efectivo en el control de patógenos del suelo como *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis* y *Fusarium*. *Trichoderma harzianum*, *T. koningii* y *T. viriens* han sido reconocidos como efectivos en el control del nematodo *Meloidogyne javanica* en tomate y oca (Revisado por Erazo, 2001). Evidencia científica ha demostrado que varios aislamientos de *Trichoderma* son eficientes en invernaderos, campo abierto, en suelo, la filósfera, y en almacenamientos fríos (Kubicek y Harman revisado por Erazo, 2001).

3.2.4.1 Control Biológico

Las enfermedades de las plantas pueden ser causadas por un número de organismos, incluyendo, bacterias, algas, nemátodos, virus y hongos (Kucharek, 1997).

Este último grupo tiene relevante importancia en la agricultura, debido a que comprende los principales agentes patógenos de vegetales (Shivas y Hyde, 1997).

El impacto ambiental negativo resultante del uso irracional de los productos químicos sintéticos en los agroecosistemas agrícolas ha motivado la búsqueda de alternativas no químicas en el control de enfermedades. En los últimos años ha cobrado gran importancia la utilización de microorganismos como agentes de biocontrol de los parásitos de las plantas (Castellanos, 2001). En particular para enfermedades se usa el control biológico microbiano, el uso de biocontroladores en el suelo ha comenzado a utilizarse con el fin de disminuir el uso de agroquímicos altamente contaminantes en la producción de hortalizas (Escande A y Cols, 1999 revisado por Rodríguez 2002)

Los biocontroladores son selectivos y no dañan los tejidos de la planta, siendo una alternativa ecológicamente más conveniente, evitando problemas de contaminación y de residuos químicos (Loison revisado por Sandoval, 2004). Así, actualmente se han transformado en una herramienta de real importancia dentro del manejo integrado de enfermedades (Bruna revisado por Sandoval, 2004).

El término control biológico o biocontrol de enfermedades fúngicas ha experimentado desde sus inicios cambios en cuanto a su contenido y definición, siendo la más aceptada la indicada por Baker (1987), quien define al control biológico como la reducción del inóculo o de la actividad productora de enfermedad del microorganismo patógeno, debido a uno o más microorganismos incluida la planta hospedera, excluido el hombre.

Según Cooke y Baker (1983), control biológico es la reducción de patógenos, causantes de enfermedades, a partir de uno o más organismos (Hjeljord y Tronsmo,

1998). El uso exclusivo de los agentes de control biológico es un beneficio tanto para los que desarrollan esta ciencia, como para la naturaleza. La naturaleza podría beneficiarse en la valorización del hábitat y en el mejoramiento de la calidad de vida (Elad, 2000).

Por otra parte, Snyder (1960) revisado por Mehrotra (1988), definió al control biológico como una táctica para interrumpir las actividades del microorganismo patógeno, tomando como base la resistencia de la planta, a través del mejoramiento genético y modificaciones de las prácticas culturales para disminuir la infección.

En el control biológico microbiano se utilizan las esporas o filtrados de cultivos de hongos antagonistas que actúan por medio de productos metabólicos que ejercen acción sobre la pared celular, membrana y ácidos nucleicos de sus hospederos o por micoparasitismo matando las estructuras invadidas directamente, reduciendo de esta manera la concentración de esporas o la densidad poblacional, por ende el ataque de muchos hongos fitopatógenos de importancia económica (Elad y Katan, 1980).

El control biológico ha sido utilizado por el hombre desde los inicios de la agricultura. En Europa hace siglos se utilizó el barbecho como la técnica principal de los sistemas de producción, posteriormente se introdujeron sistemas de rotación para disminuir la incidencia de enfermedades e incrementar la fertilización del suelo (Campbell, 1989).

En las últimas décadas el mercado para los productos biológicos generados para el control de plagas y enfermedades ocupó solo el 0,45% del mercado global de los agroquímicos. Dentro de los agentes biológicos más comercializados se citan: *Bacillus thuringiensis*, *Beauveria* spp., *Metharrizium* spp., *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp.,

y nemátodos del género *Steinernema* spp. Es importante mencionar que los productos obtenidos de los agentes antes mencionados presentan limitantes, especificidad, sensibilidad a factores ambientales, problemas con las dosis de formulación y algunos problemas de calidad en la producción a escala industrial debido a la presencia de contaminantes (Powell y Jutsum, 1993).

Trichoderma spp., tiene diversas ventajas como agente de control biológico, pues posee un rápido crecimiento y desarrollo, además produce una gran cantidad de enzimas, inducibles con la presencia de hongos fitopatógenos. Puede desarrollarse en una amplia gama de sustratos, lo cual facilita su producción masiva para uso en la agricultura. Su gran tolerancia a condiciones ambientales extremas y habitats donde los hongos causan enfermedades, le permiten ser eficiente agente de control, de igual forma puede sobrevivir en medios con contenidos significativos de pesticidas y otros químicos (Hhjeljord y Tronsmo, 1998). Además, su gran variabilidad se constituye en un reservorio de posibilidades de control biológico bajo diferentes sistemas de producción y cultivos.

Lewis y Papavizas (1984), señalan como efecto muy importante en la esporulación de *Trichoderma* spp., su habilidad para producir clamidosporas las cuales juegan un rol importante en el control biológico. Las clamidosporas recién formadas presentan un alto porcentaje de germinación, aproximadamente 75% bajo condiciones óptimas, caso contrario entre un 13 y un 31% son viables.

3.2.4.1.1 Características deseables de un agente de control

biológico

En el momento de escoger un agente de control biológico se deben considerar algunas características, pero estas particularidades no siempre son fáciles de conseguir debido a la falta de consistencia en la actuación de los agentes y el estrecho espectro de acción, consecuentemente son considerados como los principales limitantes de los productos biológicos. Entre estas tenemos (Wilson y Wisniewski, 1989): estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones, capacidad de reproducirse en medios de crecimiento económicos, facilidad de aplicación, resistencia a los insecticidas y fungicidas con que pueda entrar en contacto, no patogenicidad para el hospedero, capacidad de sobrevivir en condiciones adversas, no producción de metabolitos secundarios que sean tóxicos para las personas y animales.

3.2.4.2 Formulaciones y producción comercial

La producción de microorganismos para el control de enfermedades depende del tipo de microorganismo, de su estabilidad, los requerimientos y de la factibilidad tecnológica y económica (Yáñez, 2003).

3.2.4.2.1 Producción Artesanal.

En este método existe un gran manejo manual en los diversos procesos y dentro de cual hay cuatro formas de producción:

a). Cultivos sobre soportes sólidos en bandejas, frascos o bolsas. En este tipo de formulaciones se incluye un soporte sólido, que ocupa el mayor volumen del recipiente; el proceso de secado se da por diversas técnicas como congelación, silicagel y/o liofilización. Proporcionan una vida útil larga ya que mantiene las células en estado seco.

b). Cultivos líquidos agitados en zaranda (fermentación sumergida). Se desarrolla sobre sustratos sólidos a los cuales se les puede añadir agua o caldo nutritivos que contengan microorganismos antagonistas (Fernández-Larrea, 2002a).

c). Cultivos líquidos en condiciones estáticas. Se emplean subproductos de la industria azucarera y de la agricultura, se lo realiza en frascos que se colocan en cámaras de reposo con temperatura controlada (Fernández-Larrea, 2002a).

d). Cultivos bifásicos. Se realiza el inóculo en forma líquida agitado o estático y posteriormente se pasa a soporte sólido (Fernández-Larrea, 2002a).

Los métodos más utilizados en el caso de hongos antagonistas son las formulaciones sobre sustratos sólidos y los cultivos bifásicos con una primera fase líquida para obtener los inóculos y una segunda fase de producción sólida en la cual se obtienen los conidios que son las principales estructuras infectivas. En general los productos sólidos a partir de hongos tienen mejor permanencia y se aplican directamente al suelo con buenos resultados. Las dosis varían con el tipo de cultivo, presencia del patógeno en el suelo y tipo de preparado que se utilice.

El almacenamiento de los sólidos, después de secos alcanzan hasta 4 meses a temperaturas inferiores a 25°C. Los líquidos son estables hasta un mes en condiciones iguales de temperatura (Fernández-Larrea, 2002b).

En las formulaciones sólidas las más conocidas son polvos para espolvoreo y humedecibles, cebos y granulados. Una de las ventajas que presentan los hongos pertenecientes al género *Trichoderma* es que tienen

escaso requisitos nutricionales, lo que permite su producción masiva en sustratos que en su mayoría son desechos o subproductos de la producción agropecuaria, disponibles en cantidades suficientes en los países en desarrollo y además muy baratos (Pérez N, 2001).

Entre los medios utilizados para la producción masiva y liberación de *Trichoderma* spp., se encuentran: salvado de diferentes granos, melaza de caña de azúcar, paja de trigo, corteza de árboles composteada, paja humedecida con una solución mineral acida, salvado de trigo mezclado con turba, harina de diferentes cereales y arena, salvado de trigo y aserrín, turba colonizada mezclada con arena o cáscara, granos de cebada (Upadhyay y Rai, 1986).

3.2.4.2.2 Producción Industrial.

Va desde la etapa de laboratorio, con el uso de agitadores, hasta procesos de fermentación sumergida en equipos industriales de alta capacidad (Yáñez, 2003). En estos equipos industriales se controla la humedad y

temperatura de forma adecuada así como los requerimientos de intercambio gaseoso.

3.3 PROBLEMAS FITOSANITARIOS EN EL BABACO

El babaco se ve afectado por varios problemas fitosanitarios y deficiencias nutricionales que afectan el desarrollo normal de la planta y la calidad de la fruta. La incidencia y severidad de las enfermedades, así como las poblaciones de insectos, ácaros, y nematodos puede manejarse de mejor manera bajo invernadero que a campo abierto, siempre y cuando se tenga un adecuado control de las condiciones ambientales internas, y se tomen las necesarias medidas preventivas y de control (Soria y Viteri, 1999).

3.3.1 Plagas

Las plagas que mas afectan al cultivo del babaco son: pulgón (*Aphis* sp), ácaros (*Tetranychus urticae*), nemátodos (*Meloidogyne incognita* y *M javanica* (AAIC, 2003).

3.3.2 Enfermedades

Dentro de las enfermedades mas representativas en el babaco tenemos a la lanchara temprana (*Alternaria* sp), cenicienta (*Oidium* sp),

antracnosis (*Mycosphaerella* sp), peca (*Asperosporium* sp), phoma (*Phylosticta* sp, *Phoma* sp), pudrición del fruto (*Colletotrichum* sp.), bacteriosis (*Erwinia caratovora*), pudrición de raíces y tallos (*Fusarium oxysporum*), (AAIC, 2003).

3.3.3 Enfermedades causadas por virus

Dentro de las enfermedades causadas por virus tenemos el Virus del mosaico y Virus tipo rugoso (AAIC, 2003).

3.3.4 Marchitez Vascular del Babaco o Fusariosis.

3.3.4.1 Impacto de *Fusarium* en el cultivo del Babaco y distribución geográfica.

Los hongos fitopatógenos en el ambiente causan grandes pérdidas en las cosechas, deterioro y desmejoramiento de la calidad vegetal. Para solucionar este problema se utilizan métodos que controlan el crecimiento de estos hongos; siendo el control químico uno de los métodos más utilizados a nivel comercial (Harman, 1996).

Dentro de los hongos fitopatógenos se encuentra *Fusarium* que incluye un gran número de especies presentes en el suelo, de distribución cosmopolita conocidas desde hace muchos años como importantes patógenos de plantas (Moss y Smith, revisado por Pérez, 2002). Recientemente, se ha descrito también a *Fusarium* como un patógeno humano en pacientes inmunodeprimidos (Pérez, 2002).

La especie más común, *Fusarium oxysporum*, causa la marchitez vascular en una gran variedad de cultivos económicamente importantes (Beckman, revisado por Pérez 2002).

En nuestro país el babaco es uno de los cultivos que en los últimos diez años a presentado gran interés por su precio en el mercado y su alta productividad, en condiciones controladas de invernadero y al aire libre. Esto ha propiciado la multiplicación masiva de material vegetativo, sin ningún control sanitario. Dentro de estos problemas fitosanitarios, la marchitez vascular del babaco, causada por *Fusarium oxysporum* f.sp *caricae*, constituye la enfermedad de mayor impacto. Actualmente esta enfermedad es catalogada como el principal limitante en la producción de este cultivo en el Ecuador, llegando a distribuirse en todo el país, alcanzando una incidencia de hasta el 100% (Fonseca en Galarza, 2002).

Una de las principales características de *Fusarium oxysporum*, es su sobrevivencia en el suelo, por medio de esporas de resistencia (clamidosporas), las cuales germinan cuando el cultivo es establecido en el terreno, ingresando principalmente por las zonas de crecimiento de la raíz, heridas causadas sea por nematodos y/o por herramientas de uso agrícola.

Fusarium se distribuye ampliamente en el suelo; sobre las partes aéreas y subterráneas de las plantas. En los desechos y otros sustratos orgánicos (Nuñez, 2000). El hecho que este hongo pueda sobrevivir saprófitamente en el suelo de un terreno de cultivo casi por tiempo indefinido, hace que su control mediante rotación de cultivos, y otras practicas de cultivos sean imprácticos e ineficaces (Agrios, 2002).

3.3.4.2 Clasificación taxonómica

Según Alexopoulos *et al* (1985,1996) revisado por Yangari, (2001), *Fusarium* se clasifica en: Reino: Myceteae, División: Amastigomycota, Clase: Deuteromycetes, Subclase: Hyphomycetidae, Orden: Moniliales; Familia: Tuberculiraceae, Género: *Fusarium*.

Los marchitamientos vasculares son causados en su mayoría por *Fusarium oxysporum*, a diferentes plantas hospedantes que son atacadas por formas especiales o razas del hongo (Yangari, 2001).

3.3.4.3 Morfología del Patógeno

Las colonias de los distintos fusarios crecen de moderada a profusamente, tienen diversos colores (blanco, rosado pálido, rojo, anaranjado, púrpura, celeste, verde aceituna o pardo), especialmente en el reverso de la colonia. El micelio es ralo o denso, ya sea algodonoso, o como una tela (Carrillo, 1991).

Fusarium oxysporum presenta un micelio incoloro al principio, pero conforme madura adquiere un color crema o amarillo pálido y bajo ciertas condiciones adquiere una coloración rosa pálido o algo púrpura (Vizúete, 2000). Produce conidióforos alargados en algunos casos sólo constan de una célula conidiógena, otros están ramificados, a veces en verticilos, septados, individuales, agrupados en esporodoquios (Booth 1971).

Presenta conidias hialinas y variables; produce 3 tipos de esporas asexuales (Vizúete, 2000). Los macroconidios son estructuras largas en forma de media luna o

elípticas, multiseptadas, constituidos de tres a cinco células que se encorvan hacia ambos extremos, los ápices son puntiagudos y en muchas especies con una célula basal en forma de pie (Vizuete, 2000; Agrios, 2002). Los microconidios, que tienen de una a dos células y son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia, su forma pueden ser: elipsoidal, fusiforme, claviforme, piriforme o subgloboso con una base redondeada o truncada, por lo general formando cabezuelas, pero en algunas especies en cadenas basípetas (Carrillo, 1991). No siempre se producen ambos tipos de esporas.

Las clamidosporas son el tercer tipo de espora que produce este hongo. Constituidas por una o dos células, son de pared gruesa, pueden ser terminales, laterales o intercalares, a veces formando cadenas (Carillo, 1991). Las clamidosporas pueden permanecer largo tiempo en el suelo debido a que están adaptadas a condiciones adversas (Vizuete, 2000).

3.3.4.4 Ciclo de Vida y Síntomas.

Fusarium es un organismo saprofito, allí una vez que se introduce en un terreno de cultivo, se establecen allí por tiempo indeterminado, aunque su número poblacional varía en forma considerable, dependiendo de la susceptibilidad y tiempo de cultivo de la planta hospedante en el campo. Los nematodos parásitos del suelo y el uso de herramientas agrícolas, habitualmente incrementan la incidencia de los marchitamientos debido a que proporcionan un mayor número de puntos efectivos de penetración (Agrios, 2002).

Fusarium se propaga en el suelo en menor grado en forma de micelio que se desarrolla en las raíces o restos de la plantas, lo hace principalmente en forma de micelio, esporas o esclerocios llevados por el agua del suelo, equipo agrícola,

transplantes, esquejes de plantas infectadas y en algunos casos, en forma de esporas o esclerocios llevados por el viento (Agrios, 2002).

Tan pronto como llega a la raíz de la planta, el micelio del hongo se extiende hasta los vasos xilemáticos, donde forma micronidios, subsecuentemente el micelio y las esporas del hongo ascienden en la planta a través de sus vasos xilemáticos, siendo llevadas las esporas por la corriente de transpiración (Agrios, 2002).

En los estados iniciales de la infección las hifas se hallan confinadas a los vasos del potoxilema y metaxilema, para invadir lateralmente de vaso a vaso los elementos primarios y secundarios del xilema. A continuación se da un explosivo estado de invasión hacia arriba (tallos y pecíolos), dada principalmente por medio de microconidias, que son arrastradas por la savia. Las mismas conidias germinan y penetran los poros de las barreras, esporulando bajo la obstrucción y volviendo a producir micelio, así en un proceso repetitivo (citado por Galarza, 2002).

En tallos jóvenes recién infectados, el número de vasos xilemáticos formados disminuye y sus paredes celulares se adelgazan más de lo normal. Con frecuencia, las células parenquimatosas entorno a los vasos xilémicos son estimulados por secreciones del patógeno para que se dividan excesivamente y, esto unido a la paredes adelgazadas y debilitadas de los vasos, da como resultado la disminución del diámetro o el colapso total de los vasos. Cuando el hongo llega a la superficie de los tejidos muertos, y esporula profusamente, las esporas son entonces diseminadas hacia nuevas plantas o áreas por medio del viento, el agua y otros factores (Agrios, 2002).

Las plantas afectadas presentan síntomas como hojas o partes de la planta pierden su turgencia, se debilitan, adquieren una tonalidad que va del verde claro al

amarillo verdoso, decaen y finalmente se marchitan, se tornan amarillas, empardecen y mueren. Los retoños tiernos y jóvenes también se marchitan y mueren. Al realizar cortes transversales en los tallos y ramitas infectadas muestran varias zonas café decoloradas dispuestas en forma de un anillo completo o interrumpido que consta de tejidos vasculares decolorados (Agrios, 2002).

La principal causa por la cual esta enfermedad es difícil de controlar es por la imposibilidad del babaco para producir semilla (por ser un híbrido natural) y usar como única alternativa la propagación asexual mediante estacas, con la consecuente pérdida de variabilidad genética y resistencia a enfermedades. De esta manera algunos productores para apalear las pérdidas económicas cortan plantas y producen estacas contaminadas vendiéndolas a otros, propagándose de esta manera la enfermedad en nuevos terrenos de forma acelerada (Galarza, 2002).

Cuando los productores se percatan de los síntomas de la enfermedad en la plantas, la pérdida económica es irreversible, ya que la caída de hojas, flores y frutas trae como consecuencia una drástica disminución en la producción.

3.3.4.5 Control

Este fitopatógeno tiene una gran capacidad de esporulación, ya que una espora que ingrese a la planta es suficiente para introducir el patógeno en ella, así como sobrevivir en el suelo, haciendo difícil su control.

Un método efectivo para controlar los marchitamientos ha sido el uso de variedades resistentes, ya que con el control químico se ha logrado resultados inconsistentes.

Las prácticas de cultivo tales como el barbecho profundo, la rotación de cultivos, el dejar el suelo sin cultivar o la inundación de los terrenos de cultivo, han sido útiles para disminuir poblaciones del patógeno en el suelo, sin eliminarlo totalmente. La fumigación de los suelos ha tenido éxito en algunos casos, pero es demasiado costosa y su efecto es tan poco duradero que se considera inadecuada. En los invernaderos, la esterilización del suelo proporciona un control eficaz (Agrios, 2002).

Otra buena práctica podría ser la producción de material limpio *in vitro*, con la utilización del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Brevemente, las múltiples posibilidades de aplicación de tales cultivos se puede resumir en: estudios básicos de fisiología, genética, bioquímica y ciencias afines; bioconservación y producción de compuestos útiles; incremento de la variabilidad genética; obtención de plantas libres de patógenos; propagación de plantas; y conservación e intercambio de germoplasma (Roca y Mroginski, 1993).

La micropropagación a través de meristemas partiendo de plantas enfermas, permite obtener plantas genéticamente idénticas a la planta madre pero libre de enfermedades. El método consiste en obtener bajo condiciones de asepsia, una porción microscópica del meristema de la planta a sanear (injerto). Esa porción se coloca en el corte de un plantín de semilla decapitado, que se ha criado en condiciones asépticas (portainjerto) (Roca y Mroginski, 1993).

El conjunto injertado se cultiva en un sustrato compuesto previamente desinfectado y bajo condiciones ambientales controladas, posteriormente la planta, se traslada a condiciones de invernadero.

Por su ubicación en la planta, el tejido meristemático de donde se toma el injerto, tiene una baja probabilidad de estar afectado, pero no absolutamente libre de virus; por tanto luego de la mini injertación las plantas deben ser sometidas a pruebas de diagnóstico (Roca y Mroginski, 1993).

En el control químico se utilizan mezclas de Carbendazim (Bavistin, Cekudazim, Goldazim) + hidróxido de cobre (Cuadrox, Volcan), en dosis de 200g + 200 g en 200 l de agua.

Se puede también usar productos como: Dazomet (40g/m², a 20 cm de profundidad por incorporación); Carboxin +Captan (2ml/l de agua.); Benlate (4g/l de agua) o Busan 30 WB (3 a 4 l/ha), (MAG 2001).

El impacto ambiental del uso irracional de los plaguicidas químicos en los agroecosistemas agrícolas ha motivado la búsqueda de alternativas no químicas en el control de plagas. (Castellanos, 2001).

Una alternativa al uso de productos químicos para el control de la marchitez vascular del babaco o fusariosis es la utilización de microorganismos benéficos.

Dentro de los agentes de control biológicos mas utilizados para la fusariosis están los hongos antagonicos del género *Trichoderma*, *Gliocladium*, el empleo de bacterias del género *Pseudomonas*, obteniendo resultados alentadores al inocular previamente en las plantas (Agrios, 2002).

Las dosis a utilizar de estos organismos antagonistas son: *Trichoderma viride* (10⁶ UFC/ml); *Trichoderma harzianum* (10⁷ UFC/ml) o *Gliocladium virens* (10⁶ UFC/ml.), (MAG, 2001).

3.4. CULTIVO DEL PAPAYO (var. hawaiana)

3.4.1 Origen y Distribución Geográfica

La papaya es nativa de las planicies de Centroamérica y su cultivo se ha extendido a lo largo del mundo, especialmente en los trópicos. La fruta tiene una forma ovalada - redonda, ligeramente filiforme o elongada. Su piel es lisa, cerácea, fina y varía de color entre amarillo pálido y naranja – rojo según la variedad y nivel de maduración. La pulpa, de color amarillo – naranja a rojo, es firme y de sabor dulce (Jiménez, 2002).

El cultivo tradicional de papaya en el Ecuador ha sido de las variedades grandes del grupo mexicano, de pulpa amarilla y de pulpa roja. La papaya se produce todo el año en las diferentes zonas tropicales y subtropicales del Ecuador. En la actualidad se han establecido plantaciones comerciales de nuevas variedades pequeñas de tipo hawaiana, cuya exportación es factible durante todo el año (MAG, 2001).

Las variedades de papaya existentes en el ámbito mundial son: Solo y Solo Sunrise. En Ecuador, la principal variedad de exportación es la *Solo* conocida

popularmente como Hawaiana, cuyo fruto tiene forma de pera, con cáscara dura y sabor dulce. Actualmente constituye un rubro de exportación no tradicional, la inversión por hectárea se estima en USD\$4,000.00 para la plantación y primer año de mantenimiento (MAG, 2001).

Las principales zonas de cultivo de papaya en Ecuador se encuentran en las provincias de Manabí (San Mateo, El Carmen, Chone), Los Ríos (Quevedo), Pichincha (Santo Domingo) y Guayas (Península de Santa Elena, Yaguachi, El Empalme).

3.4.2 Clasificación Taxonómica

La clasificación taxonómica es la siguiente: Reino: Plantae, Clase: Angiospermae, Subclase: Dicotiledónea, Orden: Parietales, Familia: Caricaceae, Género: *Vasconcellea*, Especie: *papaya* (Jiménez, 2002).

3.4.3 Aspectos Botánicos

El papayo es una planta semileñosa que puede alcanzar de 8 a 10 metros de altura, es una dicotiledónea de tronco hueco y de madera carnosa. La corteza de la planta es lisa o ligeramente rugosa y de color parduzco; está siempre marcada por las cicatrices que dejan las hojas al caer, cuando se corta y se rasguña exuda un jugo lechoso claro (MAG, 2001).

En la parte apical se desarrollan constantemente nuevas hojas, y a medida que el tallo va creciendo, las hojas viejas maduran y caen, este fenómeno deja libre el espacio en que ha de desarrollarse el fruto. Las hojas son lisas, palmeadas y normalmente con siete lóbulos de color verde oscuro en el haz y verde claro en el envés.

Las plantas poseen solo flores hermafroditas que generalmente se autofecundan; el polen se derrama sobre los estigmas con la corola cerrada, evitando la llegada de polen extraño. Esto favorece un mejoramiento eficaz de la variedad mediante la selección de árboles progenitores deseables (MAG, 2001).

El fruto tiende a ser pequeño (450 g.), de forma piriforme a oblonga y de excelente sabor. Un papayo joven produce de 10 a 20 frutos, luego producirá de 50 a 60, si las condiciones son favorables (Jiménez, 2002).

3.4.4 Manejo del Cultivo

Si el clima y el suelo son propicios dará frutos desde el primer año. El rendimiento agrícola promedio del papayo es de 35 TM/ha en el segundo año y 50 TM/ha en el tercer año (MAG, 2001).

3.4.4.1 Propagación Sexual

En la actualidad el método más práctico y comercial es mediante semilla sexual. Las estacas enraízan fácilmente, pero las plantas obtenidas no son vigorosas y en cantidad muy limitada debido a que la planta ramifica muy poco (MAG, 2001).

La semilla debe extraerse de frutos sanos y maduros de plantas hermafroditas

3.4.4.2 Micropropagación

Bajo este método la multiplicación se obtiene por medio del cultivo de secciones nodales de la planta con dominancia apical que se han desarrollado *in vitro*. Los rebrotes que se desarrollan de estos nudos, se enraízan como microcortes. Las nuevas plantas se desarrollan a partir de yemas axilares o yemas apicales (Jiménez, 2002).

3.4.5 Plagas y Enfermedades

La papaya esta afectada por un sinnúmero de plagas y enfermedades que afectan al cultivo desde sus primeras etapas hasta la etapa de poscosecha por lo cual las pérdidas pueden ser irreversibles sino se da un manejo adecuado dentro de cada etapa.

3.4.5.1 Plagas

Dentro de la principales plagas tenemos: Áfido del melocotero (*Myzus persicae*), Mosca blanca (*Trialeurades variabilis*), Saltahojas de la Papaya (*Empoasca papayae*), Escamas (*Dysmicoccus* sp.), Escama minadora (*Howardia biclavis*), Gusano cortador negro (*Agrotis ipsilon*), Mosca de la papaya (*Toxitripana curvicauda*), Ácaros (*Tetranychus cinnabarinus*) y Nematodos (*Meloydogine incognita*) (Jiménez, 2002).

3.4.5.2 Enfermedades

Dentro de las enfermedades la mas comunes son: Pudrición de la base del tallo y de raíces (*Phytophthora palmivora*), Antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides*), Arrepollamiento de las hojas (*Fusarium moniliforme*), Falsa roya (*Puccioniopsis caricae*), Cenicilla (*Oidium caricae*), Manchas foliares (*Ascochyta* sp.), Mancha negra (*Cercospora papayae* o *Corynespora* sp.), Podredumbre húmeda (*Mycosphaerella* sp.), Podredumbre seca (*Phomopsis* sp.), Mancha púrpura (*Erwinia herbicola*), Amarillamiento interno (*Enterobacter cloacae*) (Jiménez, 2002).

3.4.5.3 Enfermedades causadas por Virus y Rickettsia

El “bunchy top” o cogollo arrepollado es causado por *Rickettsia Bellii*, mientras que para enfermedades causadas por Rhabdovirus son las siguientes: **Agobiamiento mortal** (PDNY), **Necrosis apical** (PANV) y por ultimo el virus de Mancha anular del Papayo (PRV) (Jiménez, 2002).

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 *Características del Ensayo*

4.1.1 Ubicación Geográfica

El proyecto se ejecutó en la Facultad de Ciencias Agropecuarias – IASA de la Escuela Politécnica del Ejército - ESPE, ubicada en el Barrio Loreto, Cantón Rumiñahui, Provincia de Pichincha, con las siguientes características agro-climáticas: altura aproximada 2760 m.s.n.m., temperatura promedio anual de 13.9 °C, precipitación promedio anual de 1280 mm/año, heliofanía promedio de 4.5 HL/día, humedad relativa promedio 68%, presencia de vientos débiles 2 m/s.

4.1.2. Características del Campo Experimental

La primera fase del proyecto se realizó en el laboratorio del Centro de Investigaciones de Control Biológico en el IASA, bajo condiciones controladas entre 22 a 28°C de temperatura de incubación para el desarrollo de los microorganismos y de -8°C para la preservación de los mismos.

La segunda fase se realizó en un invernadero, del Centro de Investigaciones de Control Biológico la Facultad cuyas medidas son: 12m de largo por 4 de ancho, a una temperatura máxima: 32 °C, temperatura mínima: 8 °C, humedad relativa: 66% y riego por aspersión.

4.2 *Materiales*

En la fase de laboratorio se utilizaron los siguientes materiales y equipos: cajas petri plásticas, bisturí, vasos de precipitación, probetas, botellas de 250 a 100 ml, tubos de ensayo, bandejas, cubetas, pinzas, mangos de bisturí, asa de platino, cobre y porta objetos, gradilla, pinzas. sacabocados, asa de Drigalski, puntas de micropipetas, micropipetas, parafilm, jeringuillas, tijeras, mecheros, papel reciclado, papel aluminio, papel toalla, papel estéril, guantes quirúrgicos, mascarillas, guantes de plástico, fundas de celofán (9x17), barreno, bandejas plásticas pequeñas, cucharas, crioviales de 1.8 ml., atomizador, muestras de suelo, muestras de material enfermo, alcohol 70%, detergente, alcohol potable, agua destilada, agua estéril, Medio de Martin o TSMC citado por Gams y Bissett revisado por Kubicek y Harman, (1998) (sulfato de magnesio heptahidratado, fosfato ácido de potasio, cloruro de potasio, nitrato de amonio, glucosa, rosa de bengala, agar-agar), agar papa dextrosa (PDA), hidróxido de potasio, aceite de inmersión, cloromycetin, cloruro de sodio, silicagel, turba, aceite de vaselina, aceite de cocina,

pomina, melaza, levadura, arroz, cámara de flujo laminar, cámara de Neubauer, microscopio, estereomicroscopio, fotomicroscopio, incubadora, refrigeradora, esterilizadora, microondas, ollas de esterilización, vortex, balanza analítica, regla.

Para la fase de campo se utilizó lo siguiente: plantas injertadas, pico, azadón, pala, regadera, fertilizantes, fundas de palma, regadera, regla, pie de rey, cabetas plásticas, regadera, turba, tierra negra de páramo, pomina, cuchillo, jeringas, bioformulados, etiquetas.

La composición y cantidades de los medios de cultivos se encuentran en la sección de Anexos.

4.3 Métodos

4.3.1 Factores en estudio

Se consideraron 3 factores en estudio:

Factor 1 Cepas de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*.

Factor 2 Concentración de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*.

Factor 3 Efecto de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*., en plantas injertadas y adaptadas en un invernadero, en la Hcda. El Prado-IASA; Sector San Fernando; Valle de los Chillos.

4.3.2 Tratamientos

El estudio fue dividido en 2 fases:

Fase de Laboratorio

A1 → *Trichoderma koningii*. (cepa 1) + *Fusarium oxysporum* f..sp. *caricae*.
 A2 → *Trichoderma album* (cepa 2) + *Fusarium oxysporum* f..sp. *caricae*.
 A3 → *Trichoderma viride* (cepa 3) + *Fusarium oxysporum* f..sp. *caricae*.
 A4 → *Trichoderma harzianum* (cepa 4) + *Fusarium oxysporum* f..sp. *caricae*.
 A5 → *Trichoderma koningii* (cepa 5) + *Fusarium oxysporum* f..sp. *caricae*.
 A6 → AO → *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*.

Se estableció 6 tratamientos. Las pruebas duales se realizaron en PDA entre las diversas cepas de *Trichoderma* v.s. *Fusarium oxysporum* f..sp. *caricae*.

Fase de campo

De la fase de laboratorio se eligieron las 2 especies de los antagonistas más eficientes, en tres diferentes concentraciones

C1 → concentración 1 = 10^8 . + AO

C2 → concentración 2 = 10^9 . + AO

C3 → concentración 3 = 10^{10} . + AO.

Además se incluyo un testigo absoluto AO → *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae* (10^4).

Los tratamientos se establecieron como se indican en la Tabla 1:

Tabla 1. Tratamientos y concentraciones de las 2 cepas de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* f.sp. *caricae*

| Nº de TRAT. | NOMENCL | DESCRIPCION |
|-------------|---------|--|
| T1 | C1 A1 | Se aplicó 10^8 UFC/ml, de <i>Trichoderma koningii</i> , y 10^4 UFC/ml de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> . |
| T2 | C2 A1 | Se aplicó 10^9 UFC/ml, de <i>Trichoderma koningii</i> , y 10^4 UFC/ml de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> . |
| T3 | C3 A1 | Se aplicó 10^{10} UFC / ml, de <i>Trichoderma koningii</i> , y 10^4 UFC/ml de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> . |
| T4 | C1 A2 | Se aplicó 10^8 UFC / ml, de <i>Trichoderma album</i> , y 10^4 UFC/ml de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> . |

| | | |
|----|-------|---|
| T5 | C2 A2 | Se aplicó 10^9 UFC / ml, de <i>Trichoderma album</i> , y 10^4 UFC/ml de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> . |
| T6 | C3 A2 | Se aplicó 10^{10} UFC / ml, de <i>Trichoderma album</i> , y 10^4 UFC/ml de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> . |
| T7 | A0 | Se aplicó 10^4 UFC/ml, de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> |

4.3.3. Diseño experimental

4.3.3.1 Tipo de Diseño

El ensayo se estableció en un diseño completamente al azar (DCA), para determinar la acción antagonista de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* en laboratorio; mientras que para la fase de campo se implantó un diseño bloques al azar (DBA).

4.3.3.2 Número de Repeticiones

Se realizaron 5 repeticiones para la fase en laboratorio y 3 para la fase de campo.

4.3.3.3 Unidades Experimentales

El ensayo tuvo 30 unidades experimentales en donde cada unidad estuvo formada por una caja petri de 9.2 cm de diámetro, dentro de laboratorio.

En el campo cada unidad estuvo constituida por 5 plantas de babaco injertadas en papaya, en fundas de 16 x 22 cm y en sustrato constituido por pomina, turba y tierra negra (2:2:1); la distancia entre fundas en el invernadero fue de 25 cm x 25 cm entre plantas, con un número total de plantas de 105 y un área neta de 7 m².

4.3.4. Análisis Estadístico.

4.3.4.1 Modelo matemático y Esquema del Análisis de Variancia

El modelo matemático utilizado fue:

$$Y_{ij} = U + T_i + E_{ij}$$

U = media.

T_i = efecto del i-esimo tratamiento.

E_{ij} = error.

El esquema de análisis de variancia para la fase de laboratorio se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Esquema del análisis de variancia para la fase de laboratorio

| FUENTE DE VARIACION | GRADOS DE LIBERTAD |
|---------------------|--------------------|
| TOTAL | 29 |
| TRATAMIENTOS | 5 |
| ERROR | 24 |

4.3.4.2 Análisis Funcional

El análisis funcional para la fase de laboratorio se realizó mediante la prueba de Duncan al 5% para tratamientos.

4.3.4.3 Modelo matemático y Esquema Análisis de Varianza

Se utilizo el siguiente modelo matemático y análisis de varianza que se muestra en la Tabla 3 para la fase de campo:

$$Y_{ij} = U + B_j + T_i + E_{ij}$$

U = media.

B_j = efecto del i-esimo bloque.

T_i = efecto del i-esimo tratamiento.

E_{ij} = error.

Tabla 3. Esquema del Análisis de Varianza para la fase de campo.

| FUENTE DE VARIACION | GRADOS DE LIBERTAD |
|---------------------|--------------------|
|---------------------|--------------------|

| | |
|--------------|----|
| TOTAL | 20 |
| REPETICIONES | 2 |
| TRATAMIENTOS | 6 |
| ENTRE GRUPOS | 2 |
| G3 vs G1, G2 | 1 |
| G1 vs G2 | 1 |
| DG1 | 2 |
| Lineal | 1 |
| Cuadrático | 1 |
| DG2 | 2 |
| Lineal | 1 |
| Cuadrático | 1 |
| ERROR | 12 |

4.3.4.4 Análisis Funcional

El análisis funcional para la fase de campo se realizó mediante la prueba de Duncan al 5 % para tratamientos, y concentraciones.

Regresión y correlación entre las concentraciones con cada variable en estudio dentro de cada cepa.

4.3.5 Análisis Económico

Se realizó el análisis de costos por planta y costos por tratamientos, ya que no se obtendrá producción.

4.3.6 Datos Tomados

Fase de laboratorio

4.3.6.1 Capacidad antagónica de las cepas de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*.

Esta variable se midió en base a la escala propuesta por Elías y Arcos (1984) citado por Bernal. A y cols. (1996) para capacidad microbiana antagónica en condiciones *in vitro*, que se muestra en el tabla 4., las evaluaciones se realizaron 2^{do}, 3^{ro}, 4^{to} y 6^{to} días posteriores de haber colocado los 2 hongos en cada caja petri. Se colectaron datos de cada unidad experimental con un total de 30.

Tabla 4. Escala de Capacidad antagónica.

| Grado | Capacidad antagónica |
|--------------|--|
| 0 | Ninguna invasión de la superficie de la colonia del hongo patógeno. |
| 1 | Invasión de ¼ de la superficie de la colonia del hongo patógeno. |
| 2 | Invasión de ½ de la superficie de la colonia del hongo patógeno |
| 3 | Invasión total de la superficie de la colonia del hongo patógeno. |
| 4 | Invasión total de la superficie de colonia del hongo patógeno y esporulación sobre ella. |

4.3.6.2 Eficiencia *in vitro* de pruebas duales de antagonismo de 6 cepas de *Trichoderma* spp versus *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae*.

Se midió en centímetros luego de 24, 48 y 72 horas de colocadas las rodela con cada hongo a una distancia inicial de 4,2 cm., entre ellas. Las medidas fueron en dos direcciones, **(D1)** desde el antagonista hacia el patógeno y viceversa en línea recta y **(D2)** hacia el borde de la caja tanto para el patógeno como para el antagonista (Grafico 1). Se evaluó cada unidad experimental con un total de 30 cajas, más 5 cajas testigos.

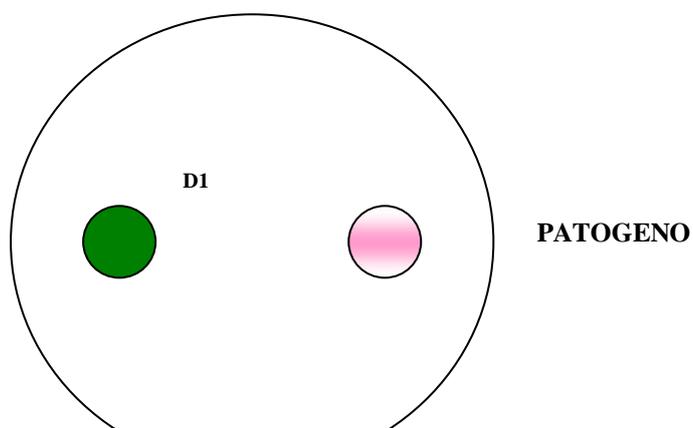




Grafico 1. Forma de medir para los antagonistas y el patógeno.

Fase de campo

4.3.6.3 Efecto de inoculantes a base de *Trichoderma koningii* y *T. album* en el crecimiento en altura del injerto de babaco en papaya hawaiana.

Se evaluó cada 15 días después de la aplicación de *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae* y *Trichoderma album* y *koningii*., por un lapso de 2 meses. Se tomó como referencia el punto de injertación para medir hasta la última hoja formada, para cada unidad experimental.

4.3.6.4 Efecto de inoculantes a base de *Trichoderma koningii* y *T. album* en el crecimiento del diámetro del tallo de plantas de babaco (zona de injertación) injertadas en papaya hawaiana.

Se midió esta variable cada 15 días después de la aplicación de *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae* y *Trichoderma album* y *koningii* por un lapso de 2 meses. Se tomó el diámetro en el punto de injertación.

4.3.6.5 Infección del injerto

Para esta variable se colectaron datos a los 30 y 60 días de la aplicación de los hongos. Se observaron signos y síntomas externos de la fusariosis, por cada unidad experimental para verificar el estado del injerto.

4.3.6.6 Efecto de los inoculantes *Trichoderma koningii* y *T. album* en la variación de la severidad externa de los injertos de babaco.

Para esta variable se tomaron los datos a los 30 y 60 días mediante observación en cada unidad experimental en base a la escala de severidad propuesta por Vintimilla (2000), que se muestra en el tabla 5.

Tabla 5. Escala de Severidad Externa

| Nivel | Síntomas |
|-------|--|
| 0 | Planta sana. |
| 1 | Clorosis inicial de las primeras hojas bajas. |
| 2 | Clorosis intensa de aproximadamente el 50% del follaje. Defoliación moderada. |
| 3 | Clorosis total de follaje. Defoliación severa. Bandas oliváceas longitudinales y deprimidas en el tallo. |
| 4 | Plantas completamente defoliadas. Necrosis descendente desde el ápice de tallo (muerte de la planta). |

4.3.6.7 Escala de Severidad Interna

Se tomaron datos a los 60 días después de la aplicación de *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae* y *Trichoderma album* y *koningii*, mediante observación de cada planta fuera del sustrato y haciendo cortes en la planta para detectar infecciones internas causadas por el patógeno en el patrón e injerto. Se evaluó cada unidad experimental basándose en la tabla propuesta en Vizuete (2000), tabla 6.

Tabla 6. Escala de Severidad Interna

| Grado | Descripción |
|----------------------|--|
| 0 | Raíces sanas, ausencia de lesiones. Sistema vascular sano sin coloración |
| 1 | Lesiones leves en corteza, raíz y/o raicillas. |
| 1^a | Lesiones pronunciadas en la corteza de la raíz/raicillas y cuello de la planta patrón. |
| 2 | Colonización vascular limitada a la raíz. |
| 3 | Colonización vascular significativa de la raíz que progresa hasta el nivel del cuello del patrón |
| 4 | Colonización vascular de la raíz, cuello y parte del tallo del patrón. |
| 5 | Colonización vascular abundante de toda la planta, incluyendo el injerto. |

4.3.6.8 Mortalidad de plantas debido a otros agentes fitopatógenos diferentes a *Fusarium oxysporum* f sp. *caricae*.

Este variable se la evaluó a lo largo del ensayo de campo evaluando planta por planta y se realizo las respectivas anotaciones.

4.3.7 Métodos Específicos del Experimento

FASE DE LABORATORIO

4.3.7.1 Aislamiento y purificación de potenciales cepas benéficas de *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum* f.sp *caricae*.

a) Localidades

Se tomaron muestras de suelo a 20 cm., de profundidad con ayuda de un barreno, en diferentes localidades de productoras de babaco. El muestreo se hizo en zig-zag, colectando 1 kg de suelo de cada localidad. Las localidades fueron: San Vicente ubicado en la parte norte de la ciudad de Loja, zona de clima templado andino a 2135 msnm con temperaturas que oscilan entre los 16 y 21 °C, humedad relativa del 74,6%. Calvas ubicado a 2200 msnm, de clima templado, temperatura promedio de 16°C. Vilcabamba valle de la provincia de Loja ubicado a 1500 msnm, donde existe gran cantidad de cultivos de babaco, clima templado –seco, temperatura promedio de 19°C.

En Penipe, cantón de la Provincia de Chimborazo, sector de clima templado frío, temperatura promedio de 13°C, ubicado a 2460 msnm. Las muestras se tomaron de invernaderos.

En Pichincha; Quito a 2850 metros de altitud, temperatura anual promedio de 12,8 °C y Papallacta ubicada al noreste de la ciudad de Quito a 3300 msnm, clima frío y temperatura promedio de 9,4°C. Aquí se recolectó “tierra virgen”, ó suelos sin actividad agrícola.

b) Aislamiento y Purificación de *Trichoderma* spp., en laboratorio

Para el aislamiento de cepas de *Trichoderma* spp., se usaron los procedimientos estandarizados reportados por Falconí (1998), y Tuite (1969); para la obtención de hongos habitantes del suelo en medios de cultivo *in vitro*, en Medio de Martin o TSMC citado por Gams y Bissett revisado por Kubicek y Harman, (1998) y su purificación en Agar papa dextrosa (PDA).

b.1) Procedimiento de Laboratorio: De cada muestra se tomaron 100 gramos de suelo y se colocaron en frascos de 1000ml con 900ml de solución de cloruro de sodio al 1%. Las muestras se agitaron a 150 rpm, durante 15 minutos, para obtener una suspensión de flora microbiana.

De esta solución madre, se tomaron alícuotas de 100µl y se inocularon con una micropipeta de 100 a 1000 µl., en cajas de petri con medio agar de Martin o TSMC (Anexos A.1). Las muestras se incubaron a 26°C, por 6 a 10 días hasta visualizar colonias de hongos.

Mediante estereomicroscopio se observó potenciales colonias de *Trichoderma*. Se recolectó porciones del micelio del hongo con un asa de platino, y transfirió a placas portaobjetos con una gota de KOH, observando al microscopio para el reconocimiento de las estructuras con la ayuda de clave de Barnett (1972). Entonces se purificaron las cepas de *Trichoderma* spp., en agar papa dextrosa PDA y agar- agua mediante un estriado simple, e incubando por cuatro días a 26°C. Esto permitió obtener cultivos puros activos.

La cepa de *Trichoderma* spp encontrada en Penipe y denominada R-A (*Trichoderma harzianum*) para su purificación se realizó cultivos monospóricos siguiendo la técnica revisada por Falconí (1998) con una ligera modificación. En una caja petri estéril, vacía se colocó una gota de una solución de cloruro de sodio al 0.99% con ayuda de un capilar. Luego, con un asa de platino se recogió una porción del micelio y se colocó en la gota y se dispersó por la caja. Poco a poco se vertió el agar PDA a una temperatura de 50 a 40°C, se homogenizó y selló con parafilm. Por 48 horas se incubó y procedió a observar la presencia de colonias aisladas puras.

c) Aislamiento de *Fusarium oxysporum*

La cepa patogénica de *Fusarium oxysporum* se obtuvo del cepario del Centro de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agropecuarias-IASA que se encontraba conservada en cajas petri con agar PDA, a 4°C, aislada del invernadero de Producción de Frutales del IASA, de plantas de babaco con fusariosis.

c.1) Activación y Purificación de la cepa patogénica de *Fusarium oxysporum*: Una vez obtenido micelio en cajas petri que contenían muestras de

material enfermo se procedió a purificar mediante la siembra en cajas petri con agar PDA, tomando con un asa de platino un poco de micelio del hongo esporulado y realizando un estriado simple.

Para la activación de la cepa de *Fusarium oxysporum*, se procedió a la inoculación de *Fusarium oxysporum* siguiendo los postulados de Koch (Revisado por Falconí, 1998) mediante la injertación de pedazos cuadraditos de agar PDA de 6mm x 6mm de micelio del hongo en cortes laterales en brotes de las estacas de babaco de 3 meses de edad. Cada estaca tuvo de 2 a 3 brotes. La inoculación se realizó en la parte superior e inferior de los brotes.

- Con parafilm se sellaron los cortes. Las plantas se colocaron dentro de una cámara de humedad a una temperatura de 28°C y 60% de humedad, por aproximadamente 25 días o hasta que se observaron signos y síntomas de fusariosis.

- Para confirmar la presencia del hongo se procedió a reaislarlo, mediante cortes de los brotes siguiendo el método sugerido por Falconí (1998).

- Se partieron las muestras de babaco sobre papel estéril, con una hoja de bisturí, en fragmentos de 5mm de largo y ancho. Se colocaron en hipoclorito al 10% por 1 minuto, se enjuagaron con agua estéril y secaron los fragmentos en papel estéril. Dos a cuatro fragmentos se colocaron en cajas de petri con agar papa dextrosa PDA. Las muestras se incubaron a 26°C, durante 3 a 4 días hasta observar crecimiento de micelio y esporulación de *F. oxysporum*.

- Con un sacabocados de 1 cm diámetro se tomaron rodajas del aislado y se transfirieron a cajas con medio PDA para purificación.

4.3.7.2 Conservación de cepas del género *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* en silica gel y cultivos en PDA+aceite de vaselina.

Para realizar la conservación de cepas del género *Trichoderma* y *Fusarium* en silica gel se utilizó una modificación de la metodología diseñada por Perkins (1962) en el manual de Tuite (1969) para conservación de cultivos de *Neurospora* en silica gel.

- A partir de cada aislado puro obtenido de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* en cajas de petri con agar PDA se realizó un raspado con un bisturí del micelio del hongo y se colocó en tubos con solución de cloruro de sodio estéril al 1%. Así se obtuvo una suspensión concentrada de cada aislado de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum*

- Por separado se prepararon 35 crioviales de 1.8ml de volumen con 0.5g de silica gel y turba estéril, se inoculó 200 µl de suspensión de cada aislado de *Trichoderma* spp y *Fusarium oxysporum*., en cada criovial.

- Se colocaron los crioviales en una campana de desecación a temperatura ambiente, por 3 a 5 días y se almacenaron en cajas de criocultivo etiquetadas y selladas a -8°C.

- Los aislados de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* por separado fueron inoculados mediante una asa de transferencia en una cámara de flujo laminar, en

tubos con agar PDA inclinado. Se dejó crecer por 7 días a 26°C, hasta observar crecimiento y esporulación del hongo en el tubo. Aparte se esterilizó aceite de vaselina a 121°C por 15 minutos y se dejó enfriar. Se cubrió con aceite de vaselina estéril los tubos y se conservaron bajo refrigeración con tapa a una temperatura de 4°C.

- Se conservaron las muestras de cada aislado de *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* por duplicado en tubos con PDA más aceite de vaselina como respaldo de muestras para transferencia y activación inmediata de cada cultivo.

4.3.7.3 Caracterización de cepas del género *Trichoderma* spp.

- Para la identificación de las cepas en el género *Trichoderma* spp., se usó las claves taxonómicas de Gilman (1956); Harman, G y Kubicek, C (1998), clave interactiva de la APS de Samuels *et al* (2006), Barnett y Hunter (1972). Se complementó con los diagramas descritos por Ainsworth (1971) en el Diccionario de hongos para términos micológicos y el reconocimiento de estructuras fungosas.

- Los resultados de las medidas tomadas a las esporas y cuerpos fructíferos fueron registrados en tablas de caracterización con los siguientes parámetros: conidias (forma, largo, ancho, radio, ornamentación, color); fiálides (Largo, punto medio, base, soporte de célula, radio de largo del punto mas ancho, radio largo del soporte celular, radio del punto mas ancho para el ancho del soporte de la célula, fiálides intercaladas) y clamidospora (presencia, ancho, forma).

- Se tomaron fotografías mediante un fotomicroscopio Olympus Ch30 y sistema microfotográfico PKCH3.

4.3.7.4 Caracterización de cepa de *Fusarium oxysporum*.

Para la caracterización de la cepa y su forma especial se consideraron características de color, forma y crecimiento de micelio y de esporas con las descripciones realizadas por Yangari (2001). Se tomó fotografías mediante un fotomicroscopio Olympus Ch30 y sistema microfotográfico PKCH3.

4.3.7.5 Pruebas de eficiencia *in vitro* entre *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* y las diversas cepas de *Trichoderma* spp.

Las cepas de *Trichoderma* spp y *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*., crecieron en agar PDA por 5 días a una temperatura de 26°C previamente. Para luego determinar la eficiencia de las diversas cepas de *Trichoderma* spp., se usaron pruebas duales (gráfico 2). Se confrontaron dos hongos, un antagonista con un patógeno colocados a una distancia ya establecida. Se elaboró una plantilla en la cual ubicaron las rodela de 0.9 cm de diámetro con un sacabocados #6 llenas de micelio, tanto de *Trichoderma* spp., como de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*., en línea recta, a una distancia de 4.2 cm., entre ellas.

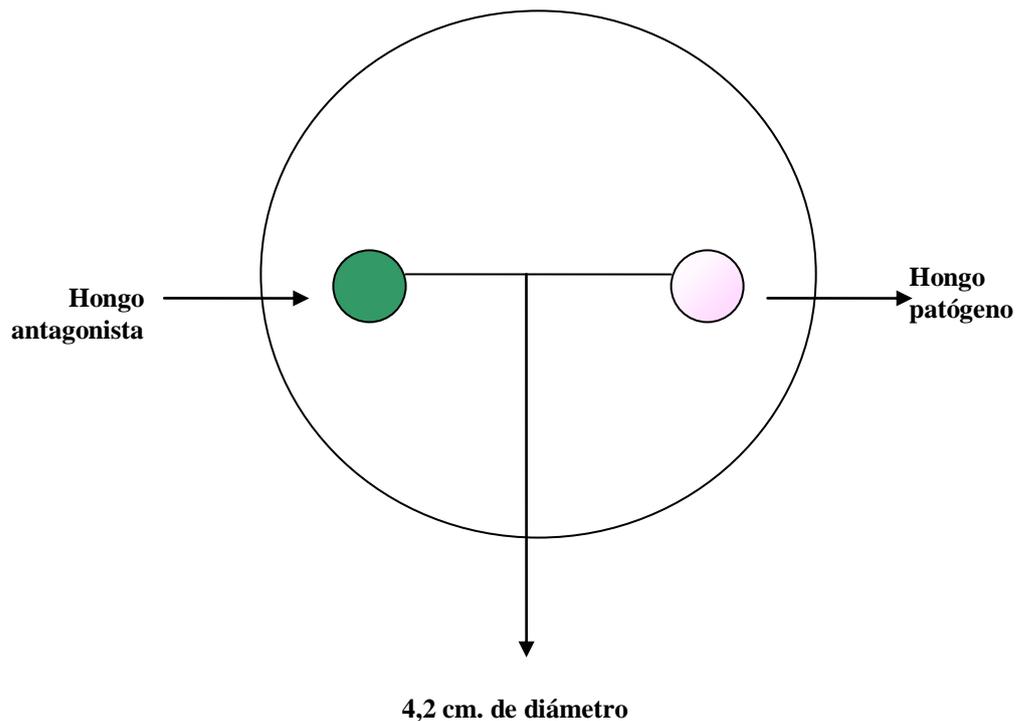


Grafico 2. Prueba Dual entre hongos antagonistas (*Trichoderma* spp.) y el patógeno (*Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*).

4.3.7.6. Producción de inoculantes a base de *Trichoderma album* (IQP) y *Trichoderma koningii* (C-19).

Con las mejores cepas por lo cual se procedió a realizar bioformulados siguiendo la metodología citada por Yáñez para la Producción de *Trichoderma* spp. (2003) con algunas modificaciones para cada cepa y como soporte se uso solo arroz.

a) Producción de inoculantes a base de *Trichoderma album* (IQP).- para esta cepa se uso el Caldo Nutritivo “B” (anexo A3). Se efectuaron las siguientes actividades.

- Se lavó 1000 g., de arroz, se dejó remojar por 30 minutos, luego se eliminó el agua y se procedió a colocar 6 cucharadas de aceite vegetal y 8 cucharadas de pomina molida para evitar que el arroz se apelmace, y se mezcló todo.

- En un vaso de precipitación se preparó el caldo de nutritivo "B" (260 ml.) y se dejó hervir por 10 minutos, luego se dejó enfriar y se agregó cloranfenicol para evitar la presencia de bacterias.

- Se colocó el arroz en vasos de precipitación de 1000 ml con el caldo nutritivo B, se mezcló y se tapó con papel aluminio y se esterilizó a 118°C por 5 minutos y se retiró para dejar enfriar.

- Luego se desinfectó las tarrinas plásticas transparentes pequeñas con una solución de cloro al 10% y se dejan secar.

- Una vez que se haya enfriado el arroz se transporta junto con las tarrinas a la cámara de aislamiento y se dispensa en cada tarrina 80g., de arroz.

- En tubos se preparó 40ml de una solución salina al 0.9%, se esterilizan a 121°C por 15 minutos, una vez fría dicha solución; con un bisturí se realizó un raspado de la caja petri que tiene el hongo ya esporulado, se lo adiciono a los tubos y se agita por 2 minutos en el vortex a velocidad moderadamente alta para que haya una buena suspensión de esporas.

- En cada tarrina se colocó 10 ml de suspensión concentrada de esporas con una jeringa y se dejó semi-tapada cada tarrina, se mezcló y se almacena a 28°C con una humedad del 56% durante 7 días. Se agito frecuentemente cada tarrina para favorecer la aireación y evitar que se comprima el arroz.

- Una vez crecido el hongo en el arroz se traspaso a fundas de celofán y se cello para etiquetarlas y almacenarlas a 4°C.

b) Producción de inoculantes a base de *Trichoderma koningii* (C-19).-
para esta cepa se uso el Caldo Nutritivo “B” (anexo A3). Se efectuaron las siguientes actividades.

- Se realizó de igual manera los dos primeros pasos anteriores de la cepa *Trichoderma album* (IQP) para la formulación de *Trichoderma koningii* (C-19).

- En fundas de celofán (9x17) se colocó 80 g., de arroz y 20 ml., de caldo nutritivo “B” y se mezcló todo para luego cerrar las fundas dejando una pequeña abertura en una esquina. Las fundas se introdujeron en fundas de papel periódico y se esterilizaron a 121°C por 15 minutos. Se deja enfriar para transportarlas a la cámara de aislamiento.

- Se preparó en tubos 40ml de una solución salina al 0.9%, se esterilizan a 121°C por 15 minutos, una vez fría dicha solución con un bisturí se realiza un raspado de la caja petri que tiene este hongo ya esporulado y se lo adiciona a los tubos y se agita por 2 minutos en el vortex a velocidad moderadamente alta para que haya una buena suspensión de esporas.

- En la cámara de aislamiento se inocular con una jeringa 10ml., de suspensión concentrada de esporas por funda y se mezcla para luego sellar las fundas completamente llenándolas previamente de aire. Se almacena a 28°C con una humedad del 56% durante 7 días. Agito frecuentemente cada funda para evitar que se comprima el arroz. Se almacenó las fundas en el refrigerador a 4°C.

FASE DE CAMPO

4.3.7.7 Determinación de la eficiencia de inoculantes a base *Trichoderma album* (IQP) y *Trichoderma koningii* (C-19) de en plantas injertadas de babaco en papaya hawaiana.

- Se tomó una funda de inoculante (bioformulado) y se colocó en 200ml de agua destilada y se agitó por 15 minutos a 125 r.p.m., para que haya una adecuada suspensión de esporas.

- Se filtró por medio de una gasa y se realiza un conteo en a cámara de Neubauer para determinar la cantidad de UFC (esporas) x ml⁻¹. Para verificar la pureza se realizó resiembras en agar PDA.

- Obtenida una solución madre y mediante diluciones, se logró las concentraciones requeridas que fueron de 1x10⁸, 1x10⁹ y 1x10¹⁰, estas concentraciones fueron las ocupadas en los distintos tratamientos bajo invernadero para lo cual se hizo controles de calidad de cada inoculante (las tres concentraciones).

- Luego se inoculó 30ml por planta, de cada concentración de acuerdo a los tratamientos ya establecidos.

4.3.7.8. Inoculación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*. , en plantas injertadas de babaco en papaya hawaiana.

- Se hizo crecer a *F. oxysporum* f. sp. *caricae*. , en cajas petri con agar PDA, una vez que el micelio haya crecido y sea de un color rosado pálido, con un bisturí se hizo un raspado y se colocó 5 ml de agua estéril en la caja petri.

- Con una jeringa se recogió el agua y se la añadió a 200ml de agua destilada estéril, con la cámara de Neubauer se determinó la cantidad de esporas $\times \text{ml}^{-1}$ y por medio de diluciones se obtuvo la concentración requerida que fue de 1×10^4 .

- Se inoculó 15 días después de haber añadido el antagonista, 30ml de la suspensión del patógeno por planta.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Fase de Laboratorio

5.1.1. Cepas del género *Trichoderma* spp., usadas para el estudio.

De las muestras de suelo tomadas en tres provincias del país en seis localidades, se aislaron y purificaron tres diferentes tipos de cepas pertenecientes al género *Trichoderma* spp. En el cuadro 1, se muestra las localidades de las que se obtuvieron los aislados.

Cuadro 1 Provincias y localidades muestreadas para la obtención de cepas del género *Trichoderma* spp.

| Provincia | Localidad | Nº Aislados | Denominación |
|------------|-------------|-------------|--------------|
| Pichincha | Papallacta | ----- | ----- |
| | Quito | 1 | IQP |
| Chimborazo | Penipe | 2 | R-B y R-A |
| Loja | Vilcabamba | ----- | ----- |
| | San Vicente | ----- | ----- |
| | Calvas | ----- | ----- |

Adicionalmente, cuatro cepas de *Trichoderma* sp., procedentes de la provincia de Pichincha y pertenecientes al cepario de los laboratorios de Manejo de Microorganismos benéficos y Fitopatología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA-1) fueron seleccionadas para el estudio. El manejo de las cepas se realizó en base a los códigos asignados en el cepario según se siguen: IASA-A, IASA-B, C-19, TH. En ambos casos el mantenimiento posterior de las cepas *in vitro* en agar PDA durante el periodo de estudio demostró ser una técnica eficiente para mantener la viabilidad y pureza de los aislados obtenidos.

5.1.2 Aislados *in vitro* y pruebas de patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f sp. *caricae*.

A partir de muestras mantenidas en el cepario de los laboratorios de Manejo de Microorganismos benéficos y Fitopatología de la Carrera de Ciencias Agropecuarias (IASA 1) se obtuvieron aislados *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*. Cultivos *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* presentaron características de crecimiento del micelio de aspecto blanco algodonoso y tornando a una coloración rosado pálido típico de la especie cuando esporuló (Foto 1A). Además, al analizar bajo microscopio se observó la presencia de microconidias, hialinas y oblongas (Foto 1B). Al comparar las características macroscópicas (cultivo *in vitro*) y microscópicas de los aislados obtenidos con las descripciones por Yangari (2001) para razas patogénicas de *F. oxysporum* f sp *caricae* se encontraron idénticas especificaciones en crecimiento de micelio de color, forma y esporas. Bajo esto se confirmó el uso de aislados patogénicos pertenecientes a la especie *Fusarium oxysporum*.

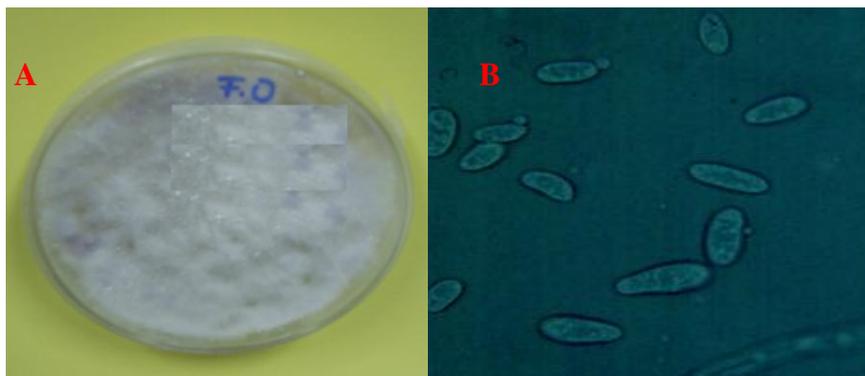


Foto 1. A) Micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae* después de cinco días de incubación a 28°C. B) Esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae*.

En base a pruebas de patogenicidad de los aislados *in vitro* de *Fusarium oxysporum* en agar PDA inoculados en plantas de babaco se determinó que era un *F. oxysporum* de forma especial (f. sp. *caricae*). El proceso de infección causado por la inoculación artificial del patógeno coincidió con los signos y síntomas de marchitez vascular o fusariosis en plantas de babaco según las descripciones realizadas por Agrios (2002) quien señala que las plantas afectadas presentan los primeros síntomas como una ligera aclaración de las nervaduras en los folíolos jóvenes externos, esta ligera aclaración va del verde claro al amarillo verdosos, las hojas decaen, finalmente se marchitan y tornan amarillas, empardecen y mueren. Las hojas marchitas pueden estar extendidas o bien enrollarse. Ochoa y Fonseca (1998) y Yangari (2001) al comparar con los resultados obtenidos en las pruebas de patogenicidad de *F. oxysporum* f. sp. *caricae* sobre plantas de babaco se confirma que la cepa de *F. oxysporum* f. sp. *caricae* es patogénica y los síntomas registrados corresponden a la infección causada por el patógeno sobre el hospedero.

Al inocular el patógeno en plantas de babaco se observó la presencia de los primeros síntomas a los 10 días (Foto 2A), con el amarillamiento de las hojas bajas y a los 20 días el necrosamiento de estas hojas, luego presencia de micelio blanquecino en la parte superior del tejido necrosado (Foto 2B). A los 32 días hubo una defoliación completa de las plantas, lo que comprueba la alta capacidad infectiva con la presencia de micelio en las hojas necrosadas de babaco (Foto 2C) causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* .



Foto 2. Plantas de babaco inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *caricae*, A) planta infectada después de 12 días. B) planta infectada después de 22 días. C) planta infectada después de 32 días.

Adicionalmente los aislados obtenidos en cajas de petri con agar PDA a partir de plantas infectadas demostraron que los aislados patogénicos de *F. oxysporum* f. sp. *caricae*., causaron la enfermedad en plantas inoculadas (Foto 3A y 3B).

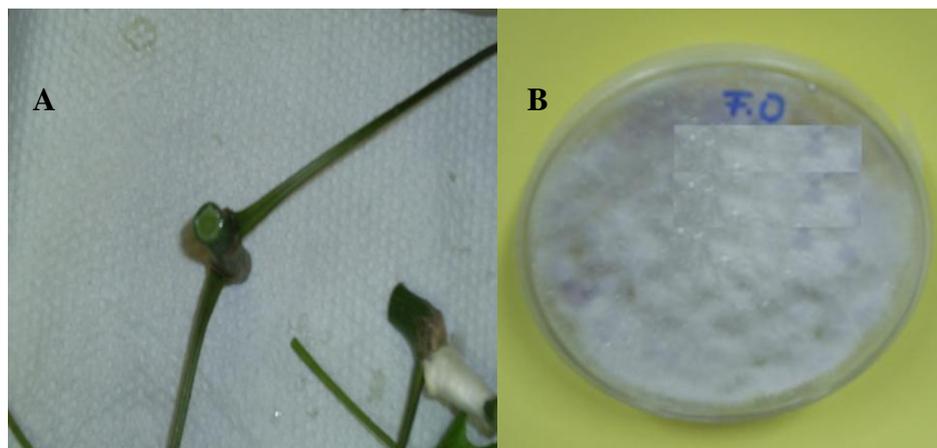


Foto 3. A) Material vegetal de plantas infectadas con *F. oxysporum* f sp *caricae* B) reisolamiento de *F. oxysporum* f. sp *caricae* proveniente de plantas de babaco sometidas a pruebas de patogenicidad.

5.1.3. Caracterización de las cepas de *Trichoderma* spp.

Los resultados de las características morfológicas y mediciones de las estructuras macro y microscópicas de las seis cepas del género *Trichoderma* spp, (cuadro2). Al confrontar los resultados obtenidos con las claves taxonómicas de Gilman (1956); Kubicek, C y Harman, G (1998), clave interactiva de la APS de Samuels *et al* (2006), para especie y la clave de identificación de géneros de Deuteromicetes de Barnett y Hunter (1972) y los diagramas descritos por Ainsworth (1971) en el Diccionario de hongos para términos micológicos y estructuras fungosas. Se identificaron los 6 aislados como: dos especies pertenecientes a *Trichoderma koningii* (Foto 4 y 8), una especie a *T. viride* (Foto 5), tres especies a *T. harzianum* (Fotos 6, 7 y 9) y una especie a *T. album* (foto 10). En el cuadro 3, se muestran los resultados obtenidos de las claves taxonómicas.

Cuadro 2. Cuadro de características morfológicas (microscópicas) y medidas de seis cepas de *Trichoderma* spp.

| Estructuras | | Características | IASA-A | IASA-B | B-R | R-A | C-19 | IQP |
|---|---------------|------------------|----------------|----------------|---------------|----------------|---------------|---------------|
| M I C R O S C O P I C A S | Conidia | Forma | Oblonga | Elíptica | globosa | globosa a sub | Elíptica | glob a subgl |
| | | Largo | 3,25 μ m. | 3,75 μ m. | 2,5 μ m. | 3 μ m. | 3 μ m. | 2,5 μ m. |
| | | Ancho | 1,75 μ m. | 2,5 μ m. | 2,5 μ m. | 2,5 μ m. | 2,5 μ m. | 3,75 μ m. |
| | | Radio | 1,625 μ m. | 1,875 μ m. | 0,5 μ m. | 1,25 μ m. | 1,25 μ m. | 1,25 μ m. |
| | | ornamentación | Lisa | liso | liso | liso | Liso | liso |
| | | Color | verde fuerte | verde | verde | verde | verde oscuro | verde claro |
| | Fialides | Largo | 10,75 μ m. | 10,5 μ m. | 7,5 μ m. | 11,25 μ m. | 8,75 μ m. | 10 μ m. |
| | | pto mas ancho | 3 μ m. | 3,0 μ m. | 3 μ m. | 3 μ m. | 3 μ m. | 2,5 μ m. |
| | | Base | 2,5 μ m. | 2,3 μ m. | 2,5 μ m. | 2,5 μ m. | 2,25 μ m. | 1,25 μ m. |
| | | Soport de celu | 0,75 μ m. | 1,0 μ m. | 1,25 μ m. | 2 μ m. | 2 μ m. | 1,25 μ m. |
| | | radio largo h | 5 μ m. | 3,0 μ m. | 5 μ m. | 7,5 μ m. | 2,5 μ m. | 4,5 μ m. |
| | | radio largo/cell | 5,5 μ m. | 4,0 μ m. | 2,5 μ m. | 3,75 μ m. | 5 μ m. | 5,5 μ m. |
| | | radio/ancho | 5,5 μ m. | 4,0 μ m. | 2,5 μ m. | 3,75 μ m. | 5 μ m. | 5,5 μ m. |
| | | Intercaladas | presente | presente | intercalada | presente | ausente | ausente |
| | Clamidosporas | Presencia | ausente | ausente | ausente | presente | ausente | ausente |
| | | Ancho | | | | 6,25 μ m. | | |
| | | forma | | | | multicell | | |

Cuadro 3. Caracterización de especies de *Trichoderma* spp.

| Denominación Anterior | Especie de <i>Trichoderma</i> spp |
|-----------------------|-----------------------------------|
| IASA-A | <i>Trichoderma koningii</i> |
| IASA-B | <i>Trichoderma viride</i> |
| R-A | <i>Trichoderma harzianum</i> |
| R-B | <i>Trichoderma harzianum</i> |
| C-19 | <i>Trichoderma koningii</i> |
| T-H | <i>Trichoderma harzianum</i> |
| IQP | <i>Trichoderma album</i> |

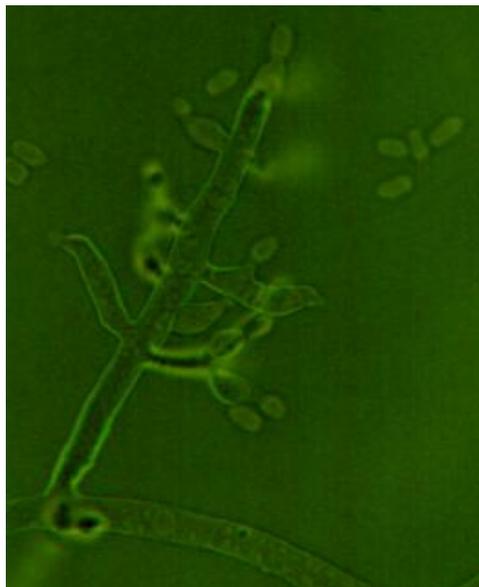


Foto 4. Microfotografía del cuerpo fructífero y conidias de *Trichoderma koningii* (IASA-A) con lente 400 veces.

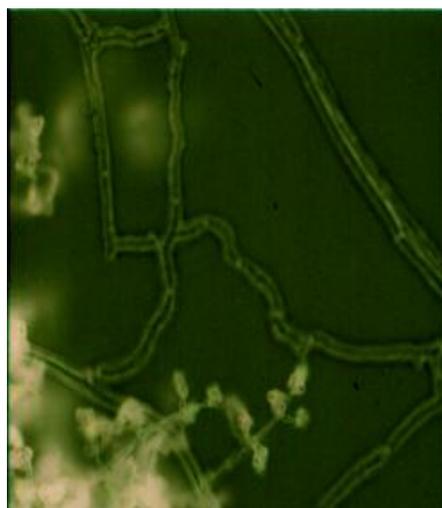


Foto 5. Microfotografía del cuerpo fructífero de *Trichoderma viride* (IASA-B) aumento 1000 veces.

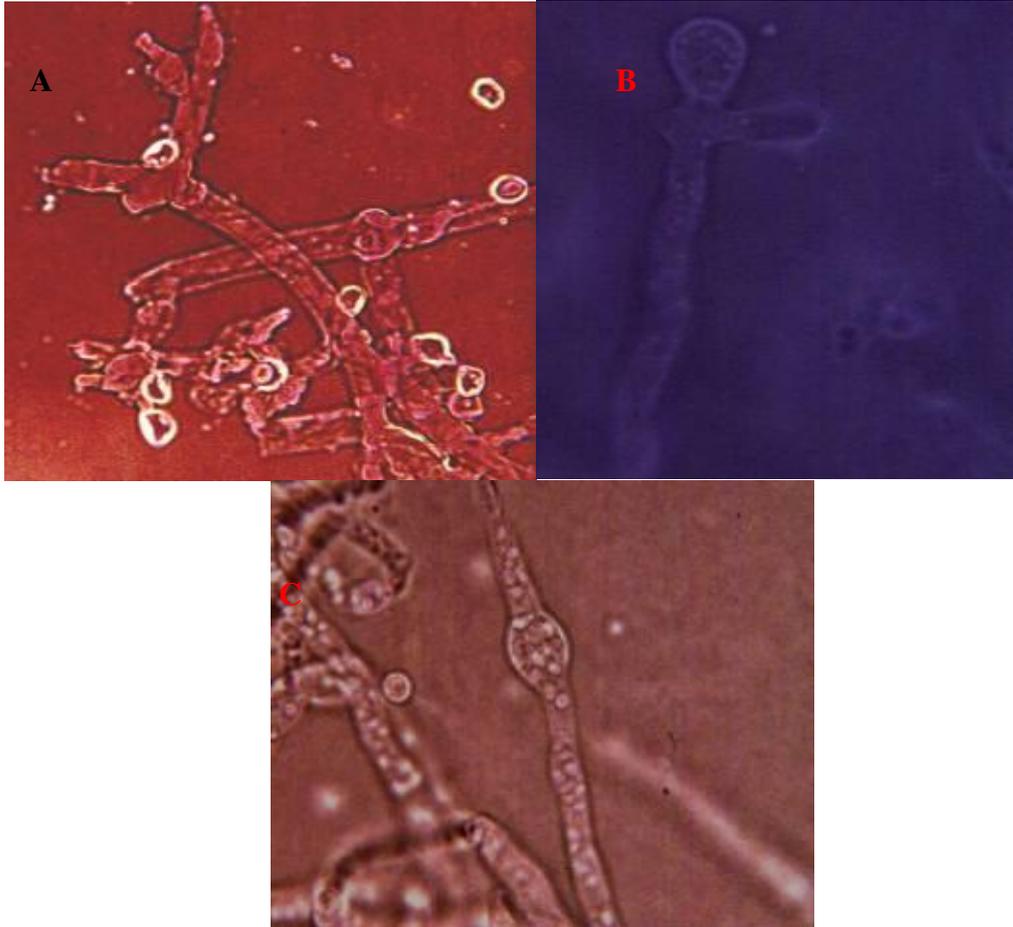


Foto 6. Microfotografías. A) Cuerpo fructífero. B) clamidospora terminal. C) clamidospora central de *Trichoderma harzianum* (R-A) aumento de 1000 veces.



Foto 7. Microfotografía del cuerpo fructífero y esporas de *Trichoderma harzianum* (R-B) aumento 1000 veces.

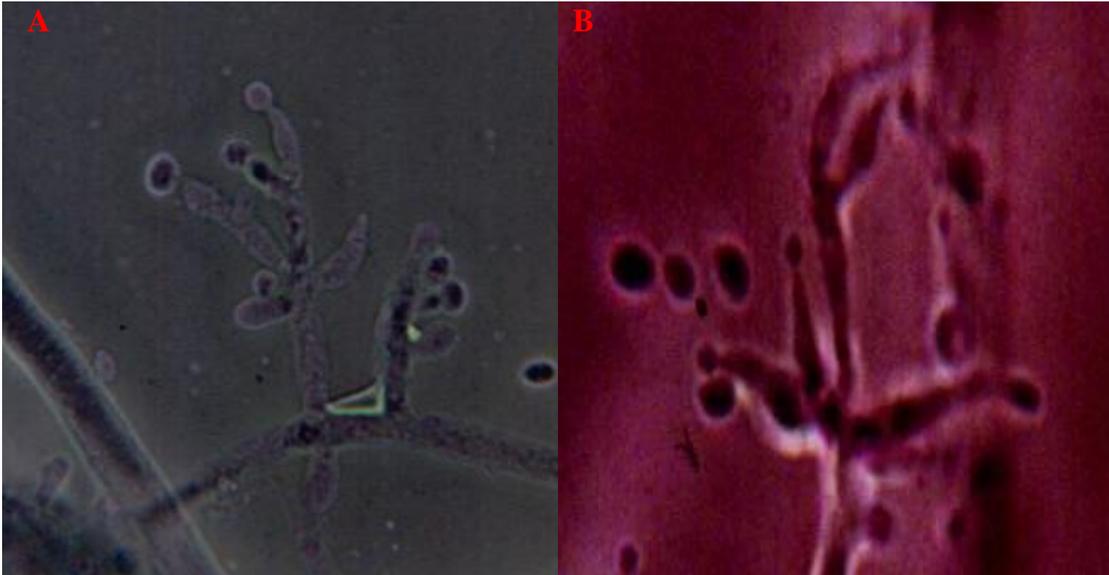


Foto 8. Microfotografías. A) cuerpo fructífero. B) esporas de *Trichoderma koningii* (C-19) aumento de 1000 veces.



Foto 9. Microfotografía del cuerpo fructífero de *Trichoderma harzianum* (T-H) aumento 1000 veces.

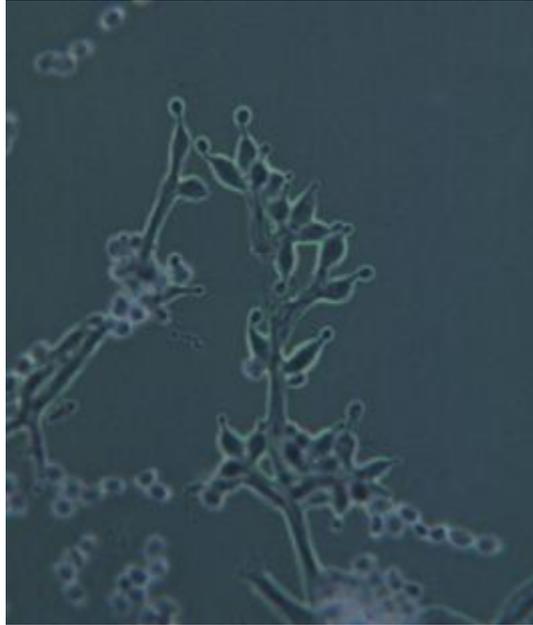


Foto 10. Microfotografía del cuerpo fructífero y esporas de *Trichoderma album* (IQP) aumento 1000 veces.

Conservación de aislados puros de 6 cepas del género *Trichoderma* spp. y *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*.

Las técnicas de conservación en silica gel y tubos con agar PDA más aceite de vaselina demostraron ser eficientes para conservar las 6 cepas del género *Trichoderma* spp., y *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* en términos de viabilidad y pureza, verificando mediante controles de calidad de los respaldos almacenados realizando resiembras en cajas con agar PDA.

Sin embargo, para la realización de las pruebas de antagonismo la cepa de *Trichoderma harzianum* (R-A) no se purificó en cajas petri con agar PDA, a pesar de haber realizado cultivos monospóricos ya que luego del segundo día de incubación se mezclaba con la cepa *Trichoderma harzianum* (R-B). La diferencia entre estas dos especies de *Trichoderma* radica en que la cepa denominada R-A, libera un pigmento de color amarillo encendido en el medio agar PDA de color amarillo encendido (Foto

11A), mientras que la denominada R-B mantenía el medio de agar PDA blanquecino (Foto 11B).

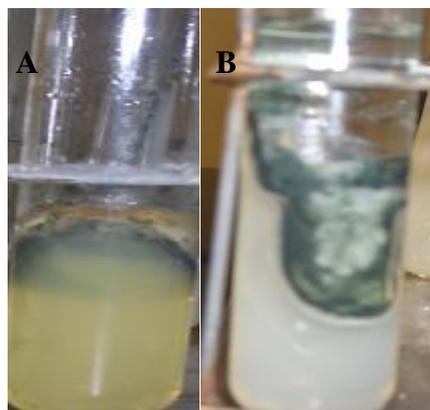


Foto 11. A) *Trichoderma harzianum* (R-A). B) *Trichoderma harzianum* (R-B).

5.1.5. Eficiencia *in vitro* (pruebas de antagonismo) de seis cepas de *Trichoderma* spp., para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*.

Al establecer el análisis de variancia para el crecimiento radial de *Trichoderma* spp., y evaluar así su capacidad de antagonista, se detectaron diferencias estadísticas del 1% entre tratamientos. Dentro de tratamientos los antagonistas se diferenciaron al mismo nivel, únicamente los antagonistas que se diferenciaron estadísticamente en dirección hacia el hongo patógeno (D1) y hacia el borde la caja petri (D2) fueron G2 *T. koningii* (C-19) a las 24 horas inhibió significativamente el micelio de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*. A las 48 horas G2 *T. koningii* (C-19) y G6 *T. album* mostraron diferencias inhibitorias al 5% a las, mientras que a las 72 horas todos las cepas de *Trichoderma* mostraron diferencias significativas al 1% (Cuadro 4). Los promedios generales del crecimiento radial fueron de 0.451, 2.114 y 2.680 cm para las evaluaciones a las 24, 48 y 72 horas respectivamente, con coeficientes de variación de 25, 12 y 8 %, lo que indica que hubo un adecuado crecimiento de *Trichoderma*.

Cuadro 4. Análisis de variancia del crecimiento radial de micelio de 6 cepas de *Trichoderma* spp frente a *F. oxysporum* f. sp *caricae*, luego de 24, 48 y 72 horas de incubación a 26°C.

| FUENTES DE VARIACION | GL | EVALUACIONES PARA EL ANÁLISIS DE VARIANCIAS DEL CRECIMIENTO RADIAL DEL MICELIO DE SEIS CEPAS DE <i>TRICHODERMA</i> spp. | | |
|-----------------------------------|-----------|---|--------------|--------------|
| | | 24 HORAS | 48 HORAS | 72 HORAS |
| TOTAL | 69 | | | |
| TRATAMIENTOS | 13 | 0.318** | 4.281** | 7.901** |
| ANTAGONISTAS | 6 | 0.598 ** | 9.072 ** | 14.109 ** |
| DG1 IASA-A (<i>T. koningii</i>) | 1 | 0.025 ns | 0.100 ns | 4.624 ** |
| DG2 C -19 (<i>T. koningii</i>) | 1 | 0.441 ** | 0.400 * | 2.116 ** |
| DG3 IASA- B (<i>T. viride</i>) | 1 | 0.025 ns | 0.100 ns | 1.225 ** |
| DG4 R-B (<i>T. harzianum</i>) | 1 | 0.036 ns | 0.256 ns | 2.401 ** |
| DG5 T-H (<i>T. harzianum</i>) | 1 | 0.004 ns | 0.009 ns | 3.721 ** |
| DG6 IQP (<i>T. album</i>) | 1 | 0.009 ns | 0.361 * | 3.969 ** |
| DG7 (testigo) | 1 | 0.000 ns | 0.000 ns | 0.000 ns |
| ERROR | 56 | 0.013 | 0.072 | 0.048 |
| \bar{X} (cm) | | 0.451 | 2.114 | 2.680 |
| CV(%) | | 25.19 | 12.68 | 8.20 |

* Diferencias significativas (p>0.05)

** Diferencias significativas (p>0.01)

En el cuadro 5 se puede apreciar que *T. koningii* (C-19) presenta una notoria diferencia entre la medida del diámetro en dirección al patógeno (D1) y hacia el borde de la caja (D2) después de 24 horas. A las 48 horas la diferencia más relevante se produjo para *Trichoderma album*, a las 72 horas *T. album* manifestó mejor inhibición en dirección al patógeno presentó un alto crecimiento radial quizá debido a su capacidad de competir por nutrientes y espacio, así como un aprovechamiento de los metabolitos producidos por *F. oxysporum* f. sp. *caricae*. IASA-A (*Trichoderma koningii*) y T-H (*Trichoderma harzianum*) fueron las otras cepas que tuvieron un crecimiento mayor hacia el patógeno lo que indica su alta capacidad inhibitoria *in vitro*. Humeres (2004), demostró el efecto de *Trichoderma harzianum* y *koningii* para controlar patógenos como *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium* sp, y *Verticillium dahlie* entre otros, sin embargo no hay reportes anteriores acerca del efecto de *Trichoderma album* sea eficiente en el control de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae*.

De los resultados anteriores se desprende que la cepa de *Trichoderma album* constituye el antagonista con mayor capacidad antagónica *in vitro* ya que anula el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*. Este tipo de *Trichoderma* se encuentra en la Colección Nacional de Microorganismos cultivados en el Instituto Pasteur en París considerado que es un microorganismo excelente para ser reproducido en medio sólidos y líquidos lo que demuestra que la cepa nativa obtenida posee potencial de control a *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*.

Cuadro 5. Datos del promedio del crecimiento radial de seis cepas de *Trichoderma* spp frente a *F. oxysporum* f. sp. *caricae* luego de 24, 48 y 72 horas de incubación a 26°C.

| TRATAMIENTOS | EVALUACIONES EN EL TIEMPO DEL CRECIMIENTO RADIAL (cm) EN | | |
|---|--|-----------|----------|
| | 24 HORAS | 48 HORAS | 72 HORAS |
| <i>T. koningii</i> IASA-A (D1) | 0.320 ef | 2.360 bcd | 3.720 ab |
| <i>T. koningii</i> IASA-A (D2) | 0.220 f | 2.560 bcd | 2.360 e |
| <i>T. koningii</i> C-19 (D1) | 0.700 ab | 2.660 bc | 3.540 bc |
| <i>T. koningii</i> C-19 (D2) | 0.280 ef | 2.260 d | 2.620 de |
| <i>T. viride</i> IASA-B (D1) | 0.620 abc | 2.520 bcd | 3.360 c |
| <i>T. viride</i> IASA - B(D2) | 0.520 cd | 2.320 bcd | 2.660 de |
| <i>T. harzianum</i> R-B(D1) | 0.540 bcd | 2.500 bcd | 3.580 bc |
| <i>T. harzianum</i> R-B (D2) | 0.420 d | 2.180 d | 2.600 de |
| <i>T. harzianum</i> T-H (D1) | 0.600 abc | 2.280 cd | 3.780 ab |
| <i>T. harzianum</i> T-H (D2) | 0.640 abc | 2.220 d | 2.560 de |
| <i>T. album</i> IQP (D1) | 0.700 ab | 3.060 a | 4.000 a |
| <i>T. album</i> IQP (D2) | 0.760 a | 2.680 b | 2.740 d |
| Testigo (<i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>caricae</i>) | 0.000 g | 0.000 e | 0.000 f |
| Testigo (<i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>caricae</i>) | 0.000 g | 0.000 e | 0.000 f |

Medidas seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales, según Duncan ($p>0.05$)

Al establecer el análisis de variancia del crecimiento radial para conocer la capacidad patogénica de *Fusarium oxysporum* se detectaron diferencias estadísticas al 5% a las 24 y 48 horas y al 1% a las 72 horas para los tratamientos. Dentro de tratamientos los antagonistas se diferenciaron al mismo nivel, únicamente a las 24 horas fueron DG1 IASA-A (*T. koningii*) al 5% y DG2 C-19 (*T. koningii*) al 1%, mientras que a las 48 horas no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. A las 72 horas se produjeron diferencias significativas al 1% DG6 IQP (*T. album*) y para el testigo al se

produjeron diferencias a nivel 5% ya que *Fusarium oxysporum* f sp *caricae* no se encontraba frente a las cepas de *Trichoderma* (Cuadro 6).

Los promedios generales del crecimiento radial fueron de 0.186, 0.829, 1.041 cm para las evaluaciones a las 24, 48 y 72 horas respectivamente, con coeficientes de variación de 30, 31, 17%.

Cuadro 6. Análisis de variancia dentro de grupos del crecimiento radial del micelio perteneciente a *F. oxysporum* f. sp. *caricae* frente a seis cepas de *Trichoderma* spp luego de 24, 48 y 72 horas de incubación a 26°C. IASA-ECUADOR, 2006.

| FUENTES DE VARIACION | GL | EVALUACIONES PARA EL ANÁLISIS DE VARIANCIAS DEL CRECIMIENTO RADIAL DEL MICELIO DE <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>caricae</i> . | | |
|-----------------------------|-----------|---|--------------|--------------|
| | | 24 HORAS | 48 HORAS | 72 HORAS |
| TOTAL | 69 | | | |
| TRATAMIENTOS | 13 | 0.008 * | 0.153 * | 0.201 ** |
| ANTAGONISTAS | 6 | 0.009 * | 0.156 * | 0.263 ** |
| DG1 (<i>T. koningii</i>) | 1 | 0.016 * | 0.025 ns | 0.025 ns |
| DG2 (<i>T. koningii</i>) | 1 | 0.025 ** | 0.081 ns | 0.064 ns |
| DG3 (<i>T. viride</i>) | 1 | 0.001 ns | 0.196 ns | 0.000 ns |
| DG4 (<i>T. harzianum</i>) | 1 | 0.001 ns | 0.121 ns | 0.064 ns |
| DG5 (<i>T. harzianum</i>) | 1 | 0.001 ns | 0.484 ns | 0.016 ns |
| DG6 (<i>T. album</i>) | 1 | 0.000 ns | 0.049 ns | 0.676 ** |
| DG7 (testigo) | 1 | 0.004 ns | 0.100 ns | 0.196 * |
| ERROR | 56 | 0.003 | 0.068 | 0.033 |
| X̄(cm) | | 0.186 | 0.829 | 1.041 |
| CV(%) | | 30.87 | 31.47 | 17.37 |

* Diferencias significativas (p>0.05)

** Diferencias significativas (p>0.01)

En el cuadro 7 se puede apreciar que *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* frente a *T. koningii* (IASA-A) presenta una marcada diferencia entre la medida de crecimiento hacia el borde de la caja que en la dirección al antagonista sin embargo *T. viride* (IASA-B) seguido por *T. album* tienen un mayor crecimiento hacia el patógeno que en dirección al borde de la caja a las 24 horas por lo que inhibición fue mayor ; a las 48 horas lo más relevante se produjo dentro del *T. koningii* (IASA-A y C-19) y *T. album* (IQP), a las 72 horas *Trichoderma viride* y *T. harzianum* (T-H) marco un alto crecimiento hacia el patógeno , al igual que el testigo ya que el crecimiento de *F.*

oxysporum f. sp. *caricae.*, fue bueno debido a que no estaba sometido a la presencia de un antagonista, para el caso de *Trichoderma album* su eficiencia es excelente ya que su notoria capacidad antagónica para inhibir el crecimiento radial del patógeno esta resalta a las 96 horas.

Cuadro 7. Datos del promedio del crecimiento radial de *F. oxysporum* f. sp. *caricae*. Frente a seis cepas de *Trichoderma* spp., luego de 24, 48 y 72 horas de incubación a 26°C. IASA-ECUADOR, 2006.

| TRATAMIENTOS | EVALUACIONES EN EL TIEMPO DEL CRECIMIENTO RADIAL DE <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>caricae</i> . | | |
|--|---|-----------|-----------|
| | 24 HORAS | 48 HORAS | 72 HORAS |
| <i>T. koningii</i> IASA-A (D1) | 0.160 c | 0.680 bc | 1.080 abc |
| <i>T. koningii</i> IASA-A (D2) | 0.240 ab | 0.780 bc | 1.180 ab |
| <i>T. koningii</i> C-19 (D1) | 0.260 a | 0.900 abc | 1.060 bc |
| <i>T. koningii</i> C-19 (D2) | 0.160 c | 0.720 bc | 1.220 ab |
| <i>T. viride</i> IASA-B (D1) | 0.160 c | 1.020 ab | 0.820 cd |
| <i>T. viride</i> IASA - B(D2) | 0.140 c | 0.740 bc | 0.820 cd |
| <i>T. harzianum</i> R-B(D1) | 0.220 abc | 0.940 abc | 1.040 bc |
| <i>T. harzianum</i> R-B (D2) | 0.240 ab | 0.720 bc | 1.200 ab |
| <i>T. harzianum</i> T-H (D1) | 0.200 abc | 1.240 a | 0.760 d |
| <i>T. harzianum</i> T-H (D2) | 0.180 bc | 0.800 bc | 0.840 cd |
| <i>T. album</i> IQP (D1) | 0.160 c | 0.700 bc | 1.340 a |
| <i>T. album</i> IQP (D2) | 0.160 c | 0.560 c | 0.820 cd |
| Testigo D1 (<i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>caricae</i>) | 0.180 bc | 1.000 ab | 1.340 a |
| Testigo D2 (<i>Fusarium oxysporum</i> f sp <i>caricae</i>) | 0.140 c | 0.800 bc | 1.060 bc |

Medias seguidas por la misma letra son estadísticamente iguales, según Duncan ($p>0.05$).

5.1.6 Capacidad antagónica de seis cepas de *Trichoderma* spp., versus *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*.

Al analizar los resultados obtenidos en función de la escala de capacidad antagónica propuesta por Elías y Arcos (1984) citado por Bernal. A y cols. (1996) y al establecer el análisis de variancia para seis cepas de *Trichoderma* spp frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*, se encontraron diferencias estadísticas luego del segundo día de incubación al 5% de significancia, mientras que para evaluaciones posteriores al tercer, cuarto y sexto día no se determinaron diferencias estadísticas (Cuadro 8).

Los promedios generales en base a la escala de capacidad antagónica fueron: de 0.067, 2.067, 2.667 y 3.333 cm para las evaluaciones al segundo, tercero, cuarto y sexto

día respectivamente, con coeficientes de variación de 335, 24, 19, 12%. El coeficiente de variación alto al segundo día se debe a que únicamente *T. album* manifestó capacidad antagonica, en tres de las 5 repeticiones.

Cuadro 8. Análisis de variancia de la capacidad antagonica de 6 cepas de *Trichoderma spp*, frente a *F. oxysporum* f.sp. *caricae* en medio PDA, luego de 6 días de incubación a 26°C. IASA-ECUADOR.

| FUENTES DE VARIACION | GL | EVALUACIONES BAJO LA ESCALA DE CAPACIDAD ANTAGONICA. | | | |
|----------------------|----|--|--------------|--------------|--------------|
| | | 2° día | 3° día | 4° día | 6° día |
| TOTAL | 29 | | | | |
| TRATAMIENTOS | 5 | 0.133 * | 0.293 ns | 0.053 ns | 0.453 ns |
| ERROR | 24 | 0.050 | 0.267 | 0.267 | 0.183 |
| \bar{X} (escala) | | 0.067 | 2.067 | 2.667 | 3.333 |
| CV(%) | | 335.41 | 24.99 | 19.36 | 12.85 |

* Medias significativas al 5%

En el cuadro 9 se presentan los promedios de la capacidad antagonica de los seis antagonistas. Se puede apreciar que *T. album* manifestó una mayor agresividad inicial fue el único que en el segundo día se diferencio estadísticamente. Su capacidad antagonica fue consistentemente mayor en comparación con los otros aislamientos durante los seis días de evaluación, sin embargo su diferencia no fue significativa.

Al sexto día en cuatro de las cinco evaluaciones *T. album* invadió totalmente la colonia del hongo patógeno, incluso esporuló sobre ella. (Foto 12).

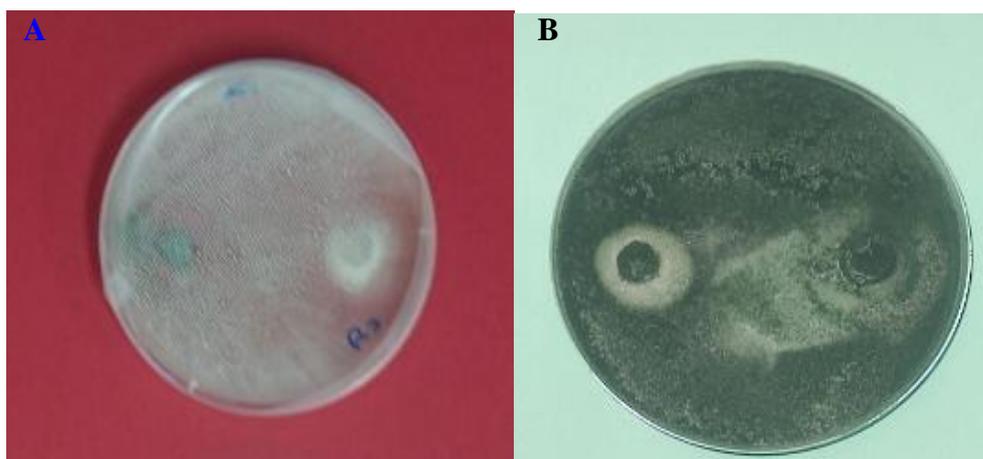


Foto 12. Capacidad antagónica de la cepa *Trichoderma album*, al segundo día (A) y al sexto día (B).

Cuadro 9. Promedios de la capacidad antagónica de seis cepas de *Trichoderma* spp., frente a *Fusarium oxysporum* f. sp *caricae*, luego de seis días de incubación a 26°C. IASA-ECUADOR.

| ANTAGONISTAS | EVALUACIONES BAJO LA ESCALA DE CAPACIDAD ANTGONICA EN EL TIEMPO | | | |
|-----------------------------|---|--------|--------|--------|
| | 2° día | 3° día | 4° día | 6° día |
| <i>T. koningii</i> (IASA-A) | 0.000 b | 1.800 | 2.600 | 3.000 |
| <i>T. koningii</i> (C-19) | 0.000 b | 2.200 | 2.600 | 3.600 |
| <i>T. viride</i> (IASA-B) | 0.000 b | 2.000 | 2.800 | 3.200 |
| <i>T. harzianum</i> (R-B) | 0.000 b | 2.200 | 2.600 | 3.200 |
| <i>T. harzianum</i> (T-H) | 0.000 b | 1.800 | 2.600 | 3.200 |
| <i>T. album</i> (IQP) | 0.400 a | 2.400 | 2.800 | 3.800 |

Igual letra para tratamientos iguales. Duncan (p>0.05)

5.2 Fase de Campo

5.2.1. Concentración de biomasa y viabilidad (control de calidad) de inoculantes a base de *Trichoderma koningii* y *T. album*.

En base a la capacidad inhibitoria y colonización sobre el patógeno, se selecciono a *T. koningii* (C-19) y *T. album* como los mas eficientes y se formularon en arroz para pruebas posteriores. En los inoculantes (bioformulados) a base de *Trichoderma koningii* y *T. album* se observó la presencia de micelio verde sobre los granos de arroz y se almacenaron en fundas selladas herméticamente durante 30 días en refrigeración a 4°C por cinco meses. Se extrajeron las esporas con agua destilada, se realizó un conteo de suspensión madre en una cámara de Neubauer y se obtuvieron los siguientes resultados: *Trichoderma koningii* osciló entre 1 a 1.06×10^{10} UFC(esporas)/ml o 1.28×10^8 ufc/g de inoculante y *Trichoderma album* 2 a 2.9×10^{10} UFC (esporas)/ml o 3.06×10^8 ufc/g de inoculante, lo que indica que poseen una alta capacidad de esporular

en arroz. También se sembró granos de arroz en agar PDA, se visualizo el crecimiento y desarrollo normal del hongo sobre el medio de cultivo. Para aplicar en el campo las diversas concentraciones se realizaron disoluciones de la suspensión madre a concentraciones de 1×10^8 , 1×10^9 y 1×10^{10} esporas/ml realizando conteos en la cámara de neubauer (Foto 13).



Foto 13. Conteo de *Trichoderma* en una cámara de Neubauer, hematocitómetro de 0.001mm³ (A). Suspensión de esporas de *Trichoderma koningii* en las tres concentraciones requeridas (B).

5.2.2. Efecto de inoculantes a base de *Trichoderma koningii* y *T. album* en el crecimiento en altura del injerto de babaco en papaya hawaiana.

Es importante indicar que para evaluar esta variable, se tomo el promedio de plantas vivas hasta el final. Al establecer el análisis de variancia para la altura de plantas, se encontraron diferencias estadísticas a los 0, 30, 45 y 60 días a nivel del 5%, mientras que a los 15 días después de la inoculación del antagonista y el patógeno se encontraron diferencias estadísticas al 1% de significancia, dentro de las repeticiones. Mientras que para tratamientos y entre grupos no se encontraron diferencias estadísticas.

Dentro del grupo dos G2 (*Trichoderma album* en las diversas concentraciones) se encontraron diferencias estadísticas a los 30 y 45 días a nivel de 5%; sin embargo a los 60 días se encontraron diferencias significativas al 1% para este grupo (Cuadro 10).

Los promedios generales de altura del injerto fueron 6.66, 7.2, 7.92, 8.74 y 9.6cm., para las evaluaciones a los 0, 15, 30, 45, y 60 días, respectivamente, con coeficientes de variación del 24, 19, 21, 20 y 18 %

Cuadro 10. Análisis de Variancia para la altura del injerto de babaco en papaya hawaiana bajo el efecto de inoculantes a base de *T. koningii* y *T. album*. . IASA-ECUADOR; 2006.

| Fuentes de Variación | GL | Evaluaciones | | | | |
|---------------------------------|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| | | 0 día | 15 días | 30días | 45días | 60días |
| TOTAL | 20 | | | | | |
| REPETICIONES | 2 | 12.85 * | 14.55** | 16.89 * | 14.58 * | 14.56 * |
| TRATAMIENTOS | 6 | 2.32 ns | 2.18 ns | 2.77 ns | 2.85 ns | 8.40 ns |
| ENTRE GRUPOS | 2 | 4.01 ns | 3.30 ns | 2.10 ns | 4.05 ns | 6.44 ns |
| G3 vs G1, G2 | 1 | 1.57 ns | 0.73 ns | 0.01 ns | 0.62 ns | 0.66 ns |
| G1 vs G2 | 1 | 0.12 ns | 0.14 ns | 0.46 ns | 0.07 ns | 3.54 ns |
| DG1 (<i>T. koningii</i>) | 2 | 2.18 ns | 2.19 ns | 1.83 ns | 0.17 ns | 0.05 ns |
| <i>T. koningii</i> lineal | 1 | 3.47 ns | 4.35 ns | 2.75 ns | 0.15 ns | 0.09 ns |
| <i>T. koningii</i> cuadrático | 1 | 0.89 ns | 0.04 ns | 0.92 ns | 0.20 ns | 0.02 ns |
| DG2 (<i>T. album</i>) | 2 | 0.77 ns | 1.03 ns | 4.37 * | 4.31 * | 18.69 ** |
| <i>T. album</i> lineal | 1 | 0.12 ns | 0.22 ns | 1.87 ns | 3.78 ns | 24.12 ns |
| <i>T. album</i> cuadrático | 1 | 1.42 ns | 1.84 ns | 6.88 ns | 4.85 ns | 13.26 ns |
| ERROR | 12 | 2.63 | 1.97 | 2.78 | 3.08 | 3.20 |
| \bar{X} (cm) | | 6.66 | 7.2 | 7.92 | 8.74 | 9.6 |
| CV(%) | | 24.36 | 19.50 | 21.05 | 20.07 | 18.63 |

* Diferencias significativas (p>0.05)

** Diferencias significativas (p>0.01)

En el cuadro 11 al analizar la altura del injerto por grupos de tratamientos (G1 *T. koningii*, G2 *T. album* con sus dosis respectivas y G3 testigo) se destacan las plantas bajo la aplicación de *Trichoderma album* debido a que alcanzaron los promedios más altos, en cada una de las evaluaciones establecidas, mientras que la menor altura dentro de cada evaluación correspondió al testigo inoculado únicamente con *Fusarium oxysporum* f sp *caricae*, el cual afecta al crecimiento de las plantas debido a su capacidad de colonizar las raíces lo que impide la adecuada nutrición de la planta. (Figura1). Al comparar estos resultados con los que obtuvo Chávez 2006 donde su crecimiento fue de 1.13 cm a los 28 días bajo invernadero tomando en cuenta que no evaluó con respecto al patógeno ni en presencia de *Trichoderma*.

Cuadro 11 Promedio de altura por grupos en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de inoculantes a base de *T. koningii*, *T. album* y *F. oxysporum* f.sp *caricae*. IASA-ECUADOR; 2006.

| Grupos | Evaluaciones | | | | |
|--|--------------|---------|---------|---------|---------|
| | 0 días | 15 días | 30 días | 45 días | 60 días |
| G1 (<i>T. koningii</i> bajo tres concentraciones) | 6.99 | 7.52 | 7.94 | 8.93 | 9.43 |
| G2 (<i>T. album</i> bajo tres concentraciones) | 6.83 | 7.34 | 8.26 | 9.06 | 10.31 |
| G3 (Testigo- <i>F. oxysporum</i> f sp <i>caricae</i> 1×10^4) | 5.16 | 5.84 | 6.89 | 7.23 | 7.96 |

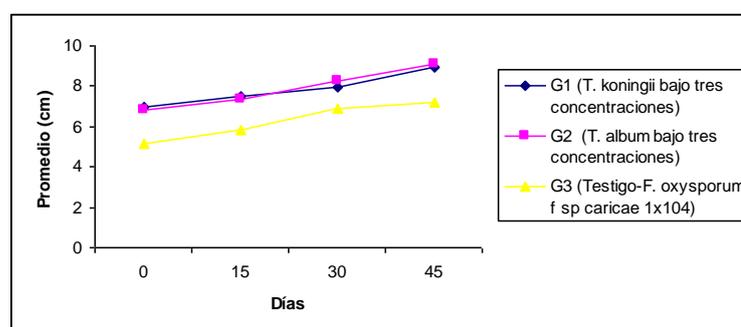


Figura 1. Representación gráfica de los promedios de altura por grupos en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de *Trichoderma koningii*, *T. album* y *F. oxysporum* f.sp *caricae* en el tiempo de evaluación. IASA-ECUADOR, 2006.

En la Figura 2 y Cuadro 12 se observa la evolución del crecimiento de las plantas por grupo a los 0, 15, 30, 45, 60 días, ajustado para cada grupo en una regresión lineal. Dentro del Grupo 2 G2 (*T. album* y sus tres concentraciones) se encuentra el mayor incremento diario que es de 0.06 cm. Chávez (2006) obtuvo un crecimiento de 1.13 cm., a los 28 días lo que implica que el incremento diario es de 0.04 cm, comparado con el incremento diario obtenido en esta investigación se destaca que algunas cepas de *Trichoderma* tienen un efecto positivo en el crecimiento vegetal. Galindo (2006) aisló y seleccionó cepas de *Trichoderma harzianum*, un eficiente antagonista de varios hongos fitopatógenos y productor de factores de crecimiento vegetal. Cuando se aplicó el hongo *Trichoderma harzianum* en belenes y nochebuenas, se presentó un menor índice de las enfermedades que afectan típicamente a éstos cultivos, se logrando disminuir el tiempo de cultivo de las plantas hasta en un 30 % y e incrementando el tamaño y la floración de las plantas. *Trichoderma koningii*, *T. viride*, *T. harzianum*, *T. hamatum* y otras cepas, presentan algunos atributos como incrementar el porcentaje de crecimiento y el desarrollo, incluido la habilidad de producir raíces robustas y profundas, mecanismos que están siendo recién conocidas. Las raíces profundas causan que plantas ornamentales, maíz y césped sean más resistentes a la sequía Harman (2000).

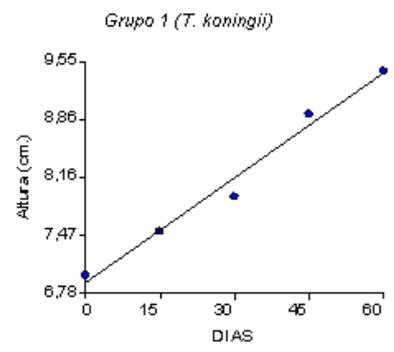
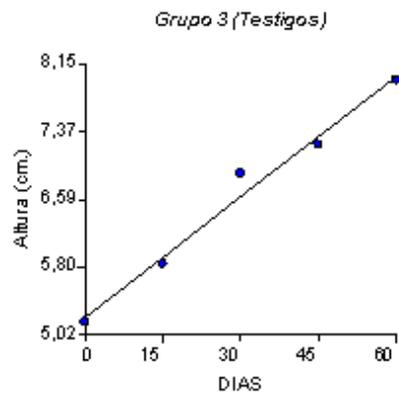
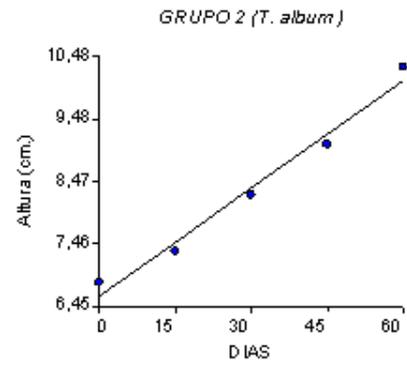


Figura 2. Regresiones lineales en el tiempo de altura del tallo por cada grupo en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de inoculantes a base de *Trichoderma koningii*, *T. album* y *F. oxysporum* f.sp. *caricae*. IASA-ECUADOR, 2006.

Cuadro 12. Ecuaciones de regresión para la altura de plantas de cada grupo, en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de *Trichoderma koningii*, *T. album* y *F. oxysporum* f.sp. *caricae*. IASA-ECUADOR, 2006.

| GRUPO | ECUACION DE REGRESION | C. DETERMINACION |
|---|-----------------------|------------------|
| G1 (<i>T. koningii</i> y sus tres concentraciones) | Y=6.90+0.04X | 0.98 |
| G2 (<i>T. album</i> y sus tres concentraciones) | Y=6.62+0.06X | 0.98 |
| G3 (Testigo- <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | Y=5.52+0.05X | 0.98 |

No hubo diferencias significativas a los 0, 15, 30, 45, días entre los diferentes tratamientos, aunque a los 60 días en el cuadro 13 se muestra que el tratamiento T4 (*T. album* 1×10^8) se diferenció al 5% de los demás tratamientos, con un promedio de 13.18 cm, mientras que los demás no sobrepasaron los 10 cm (figura 3).

Cuadro 13. Promedio de altura por tratamientos en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo los efectos del antagonista y el patógeno. IASA-ECUADOR; 2006.

| Tratamientos | Evaluaciones | | | | |
|--|--------------|---------|---------|---------|------------|
| | 0 días | 15 días | 30 días | 45 días | 60 días |
| T1 (<i>T. koningii</i> 1×10^8 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 7.53 | 8.32 | 8.39 | 8.98 | 9.52 a |
| T2 (<i>T. koningii</i> 1×10^9 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 7.43 | 7.61 | 8.39 | 9.14 | 9.49 a |
| T3 (<i>T. koningii</i> 1×10^{10} + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 6.01 | 6.62 | 7.03 | 8.67 | 9.27 a |
| T4 (<i>T. album</i> 1×10^8 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 7.25 | 7.85 | 9.43 | 10.37 | 13.18 b |
| T5 (<i>T. album</i> 1×10^9 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 6.27 | 6.70 | 7.02 | 8.02 | 8.60 a |
| T6 (<i>T. album</i> 1×10^{10} + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 6.97 | 7.47 | 8.32 | 8.78 | 9.17 a |
| T7 (<i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 5.16 | 5.84 | 6.89 | 7.23 | 7.96 a |

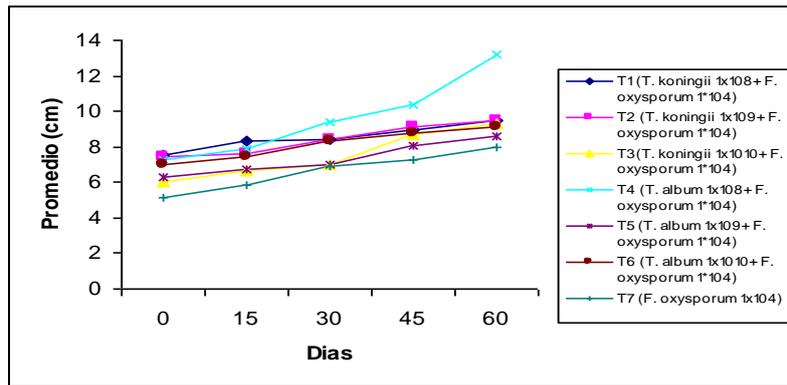
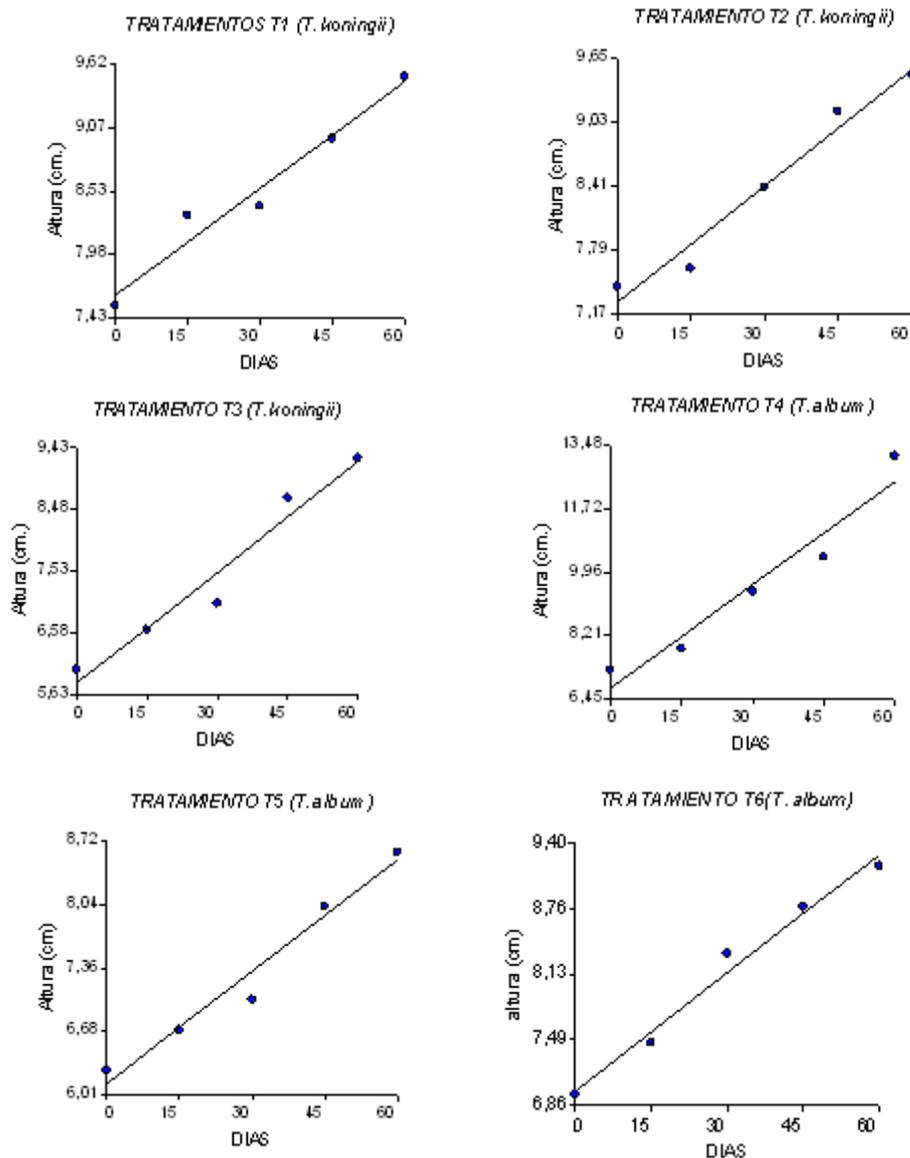


Figura 3. Representación gráfica de los promedios de altura por tratamientos de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo inoculantes a base *Trichoderma koningii*, *T. album* y *F. oxysporum* f.sp. *caricae*. IASA-ECUADOR, 2006.



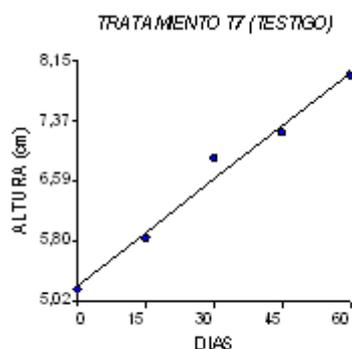


Figura 4. Regresión lineal de la interacción de los antagonistas (*Trichoderma koningii* y *T. album*) y el patógeno, en base a los datos del promedio de altura por cada tratamiento en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana IASA-ECUADOR, 2006.

En la Figura 4 y Cuadro 14 se presenta la ecuación de regresión entre el tiempo de evaluación y la altura del injerto de babaco con el fin de determinar el crecimiento diario, detectándose que el mayor crecimiento diario se presentó bajo el tratamiento de *T. album* 1×10^8 esporas/ml con un crecimiento de 0.1 cm por día mientras que el menor crecimiento correspondió a *T. koningii* 1×10^8 .

Cuadro 14. Ecuaciones de regresión para la altura por tratamiento en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo los efectos de los antagonistas (*Trichoderma koningii* y *T. album*) y el patógeno durante el tiempo de evaluación. IASA-ECUADOR, 2006.

| TRATAMIENTOS | ECUACION DE REGRESION | COEFICIENTE DETERMINACION |
|--|-----------------------|---------------------------|
| T1 (<i>T. koningii</i> 1×10^8 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | $Y=7.62+0.03X$ | 0.96 |
| T2 (<i>T. koningii</i> 1×10^9 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | $Y=7.28+0.04X$ | 0.96 |
| T3 (<i>T. koningii</i> 1×10^{10} + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | $Y=5.81+0.06X$ | 0.95 |
| T4 (<i>T. album</i> 1×10^8 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | $Y=6.74+0.10X$ | 0.94 |
| T5 (<i>T. album</i> 1×10^9 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | $Y=6.13+0.04X$ | 0.97 |
| T6 (<i>T. album</i> 1×10^{10} + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | $Y=7.00+0.04X$ | 0.98 |
| T7 (<i>F. oxysporum</i> f sp <i>caricae</i> 1×10^4) | $Y=5.22+0.05X$ | 0.98 |

5.2.3. Efecto de inoculantes a base de *Trichoderma koningii* y *T. album* en el crecimiento del diámetro del tallo de plantas de babaco (zona de injertación) injertadas en papaya hawaiana

Al establecer el análisis de variancia para el diámetro del tallo de babaco se encontraron diferencias estadísticas al 1% para las repeticiones a los 15 días, mientras que a los 30 y 45 días se diferenciaron al 5%. No se detectaron diferencias estadísticas para tratamientos, entre grupos, y concentraciones dentro de cada grupo (cuadro 15).

Los promedios generales para el diámetro de planta fueron 0.767, 0.803, 0.863, 0.926 y 0.96 cm para las evaluaciones a los 0, 15, 30, 45, y 60, respectivamente, con coeficientes de variación del 8, 8, 12, 14, 15%

Cuadro 15 Análisis de Variancia para el diámetro del tallo de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album* y *T. koningii*. IASA-ECUADOR; 2006.

| Fuentes de Variación | GL | Evaluaciones | | | | |
|-------------------------------|----|--------------|---------|-------------|-------------|---------|
| | | 0 | 15 días | 30días | 45días | 60días |
| TOTAL | 20 | | | | | |
| REPETICIONES | 2 | 0.02 ns | 0.05 ** | 0.07 * | 0.08 * | 0.07 ns |
| TRATAMIENTOS | 6 | 0.01 ns | 0.01 ns | 0.02 ns | 0.02 ns | 0.02 ns |
| ENTRE GRUPOS | 2 | 0.0 ns | 0.01 ns | 0.01 ns | 0.02 ns | 0.02 ns |
| G3 vs G1, G2 | 1 | 0.01 ns | 0.0 ns | 0.0 ns | 0.0 ns | 0.0 ns |
| G1 vs G2 | 1 | 0.0 ns | 0.0 ns | 0.01 ns | 0.0 ns | 0.0 ns |
| DG1 (<i>T. koningii</i>) | 2 | 0.005 ns | 0.01 ns | 0.02 ns | 0.015 ns | 0.0 ns |
| <i>T. koningii</i> lineal | 1 | 0.01 ns | 0.01 ns | 0.03 ns | 0.02 ns | 0.0 ns |
| <i>T. koningii</i> cuadrático | 1 | 0.0 ns | 0.01 ns | 0.01 ns | 0.01 ns | 0.0 ns |
| DG2(<i>T. album</i>) | 2 | 0.005 ns | 0.01 ns | 0.015 ns | 0.035 ns | 0.05 ns |

| | | | | | | |
|----------------------------|----|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| <i>T. album</i> lineal | 1 | 0.0 ns | 0.0 ns | 0.0 ns | 0.04 ns | 0.06 ns |
| <i>T. album</i> cuadrático | 1 | 0.01 ns | 0.02 ns | 0.03 ns | 0.03 ns | 0.04 ns |
| ERROR | 12 | 0 | 0 | 0.01 | 0.02 | 0.02 |
| \bar{X} (cm) | | 0.767 | 0.803 | 0.863 | 0.926 | 0.96 |
| CV(%) | | 8.62 | 8.78 | 12.26 | 13.57 | 15.03 |

* Diferencias significativas (p>0.05)

** Diferencias significativas (p>0.01)

Sin embargo de no diferenciarse estadísticamente los diámetros por grupos G1 (*T. koningii* y sus diversas concentraciones) y G2 (*T. album* con sus diversas concentraciones) presentaron mayores promedios en relación al Grupo G3 testigo (*F. oxysporum* f. sp. *carice* 1×10^4) en cada una de las evaluaciones realizadas a los 0, 15, 30, 45 y 60 días (Cuadro 16). En el Figura 5 se observan los promedios del diámetro de tallo y su evolución a lo largo de la investigación de campo, hasta los 60 días, en donde objetivamente se aprecia la diferencia con el testigo.

Cuadro 16. Promedio de diámetros de tallo por grupos en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album* y *T. koningii*. IASA-ECUADOR; 2006.

| Grupos | Evaluaciones | | | | |
|--|--------------|---------|--------|--------|--------|
| | 0 día | 15 días | 30días | 45días | 60días |
| G1 (<i>T. koningii</i> con sus tres concentraciones) | 0.77 | 0.83 | 0.90 | 0.94 | 0.99 |
| G2 (<i>T. album</i> con sus tres concentraciones) | 0.77 | 0.80 | 0.85 | 0.94 | 0.99 |
| G3 (Testigo- <i>F. oxysporum</i> f.sp <i>caricae</i> 1×10^4) | 0.71 | 0.74 | 0.79 | 0.83 | 0.86 |

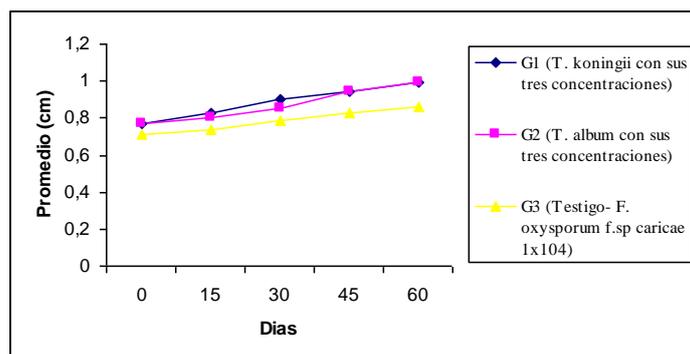


Figura 5. Representación gráfica de los promedios de diámetros del tallo por grupos de tratamientos de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album* y *T. koningii*. IASA-ECUADOR, 2006.

En la figura 6 y cuadro 17 se observa la evolución del crecimiento diametral de las plantas a los 0, 15, 30, 45, 60 días para cada grupo, ajustado en una regresión lineal, el incremento diario en los tres grupos es insignificativo.

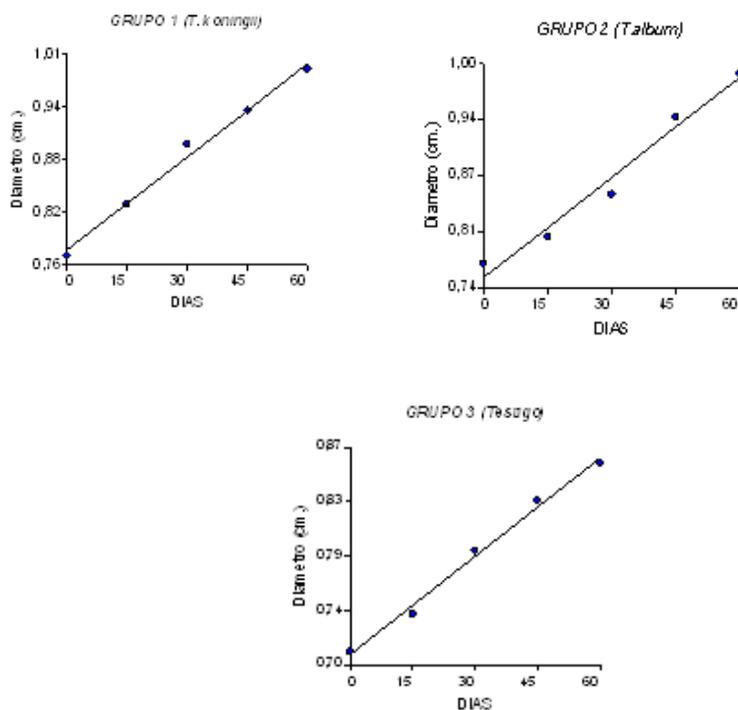


Figura 6. Regresiones lineales en el tiempo del diámetro de tallo por cada grupo en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album* y *T. koningii* y *F. oxysporum* f.sp. *caricae*. IASA-ECUADOR, 2006

Cuadro 17. Regresión para el diámetro del tallo de cada grupo, en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album*, *T. koningii* y *F. oxysporum* f.sp. *caricae*. IASA-ECUADOR, 2006.

| GRUPO | ECUACION DE REGRESION | COEFICIENTE DETERMINACION |
|--|-----------------------|---------------------------|
| G1 (<i>T. koningii</i> con sus diversas concentraciones) | Y= 0.78+0.00X | 0.99 |
| G2 (<i>T. album</i> con sus diversas concentraciones) | Y= 0.75+0.00X | 0.97 |
| G3 (Testigo- <i>F. oxysporum</i> f.sp <i>caricae</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.71+ 0.00X | 0.99 |

Todos los tratamientos en base a *T. koningii* y *T. album* superaron al tratamiento testigo T7 (*F. oxysporum* f sp *caricae* 1x10⁴) en cada una de las cinco evaluaciones establecidas, pero sin diferenciarse estadísticamente (Cuadro 18). En la figura 7 se muestra el promedio del diámetro del tallo por efecto de las dos cepas de *Trichoderma* usadas bajo las diversas concentraciones en todos los tratamientos.

Cuadro 18. Promedio del diámetro del tallo de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana por tratamientos bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album* y *T. koningii*. IASA-ECUADOR; 2006.

| Tratamientos | Evaluaciones | | | | |
|--|--------------|---------|--------|--------|--------|
| | 0 día | 15 días | 30días | 45días | 60días |
| T1 (<i>T. koningii</i> 1x10 ⁸ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | 0.79 | 0.83 | 0.94 | 0.97 | 1 |
| T2 (<i>T. koningii</i> 1x10 ⁹ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | 0.79 | 0.88 | 0.95 | 0.98 | 1.01 |
| T3 (<i>T. koningii</i> 1x10 ¹⁰ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | 0.72 | 0.77 | 0.81 | 0.87 | 0.95 |
| T4 (<i>T. album</i> 1x10 ⁸ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | 0.78 | 0.83 | 0.91 | 1.06 | 1.13 |
| T5 (<i>T. album</i> 1x10 ⁹ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | 0.71 | 0.74 | 0.77 | 0.86 | 0.90 |
| T6 (<i>T. album</i> 1x10 ¹⁰ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | 0.80 | 0.84 | 0.88 | 0.90 | 0.93 |
| T7 (<i>F. oxysporum</i> f. sp <i>caricae</i> 1x10 ⁴) | 0.71 | 0.74 | 0.79 | 0.83 | 0.86 |

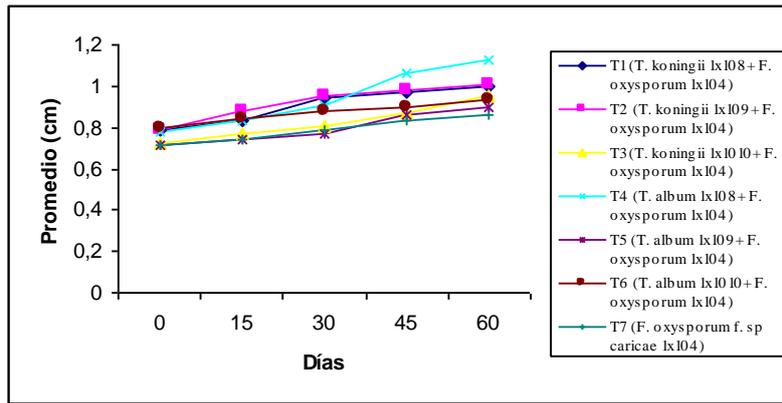
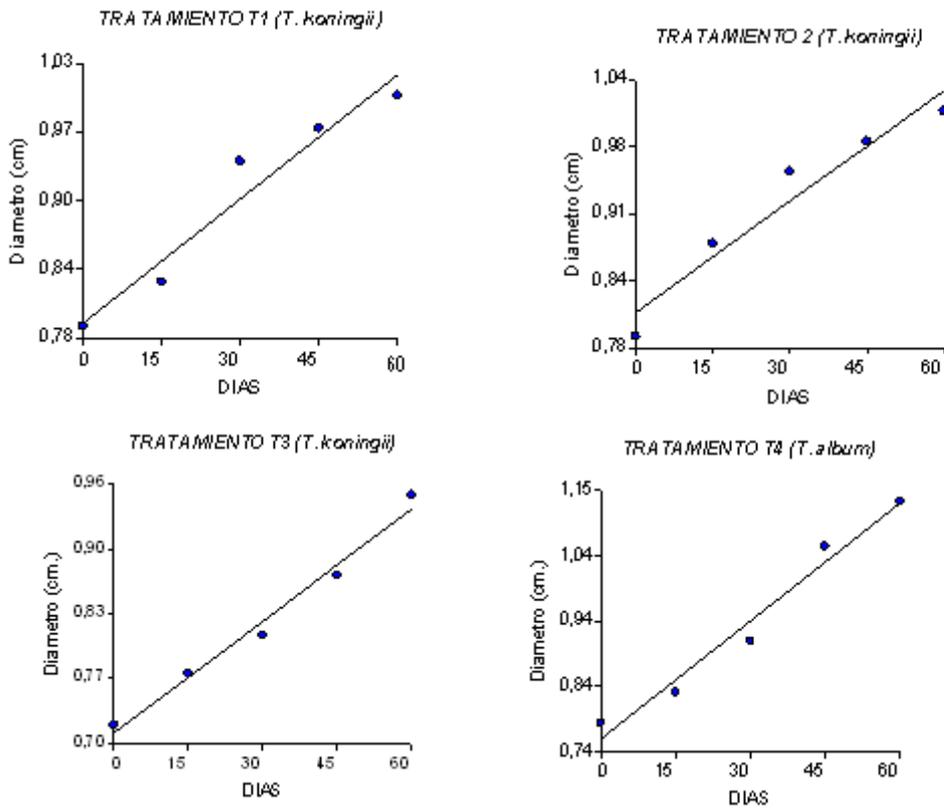


Figura 7. Representación grafica de los promedio de diámetro del tallo por tratamiento en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album* y *T. koningii*. IASA-ECUADOR, 2006.



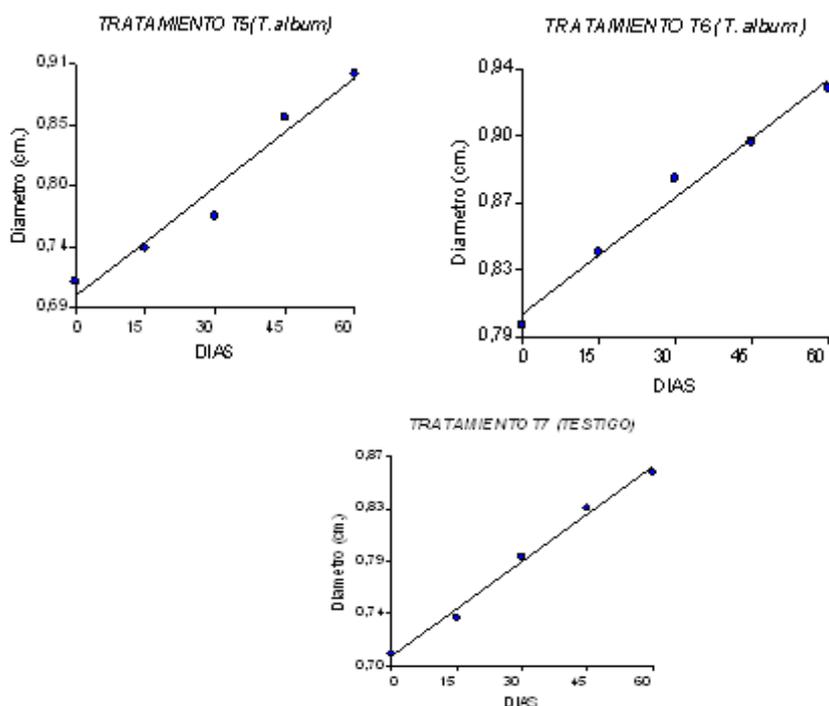


Figura 8. Regresión lineal de la interacción de los antagonistas (*T. koningii* y *T. album*) y el patógeno, en base a los datos del promedio del diámetro de plantas por cada tratamiento en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana IASA-ECUADOR, 2006.

En la Figura 8 y Cuadro 19 se presenta la ecuación de regresión entre el tiempo de evaluación y el diámetro del tallo de plantas de babaco con el fin de determinar el crecimiento diario, detectándose que el mayor crecimiento diario se presentó bajo el tratamiento de *T. album* 1×10^8 con un crecimiento de 0.01 cm, en los demás tratamientos el crecimiento no fue significativo. Chávez (2006) obtuvo un incremento de 0.08 cm a los 28 días sin uso de inoculantes, mientras que el tratamiento T4 (*T. album* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4) fue de 0.28 cm., lo que corrobora que *Trichoderma album* tiene un efecto positivo sobre el crecimiento con respecto al testigo.

Cuadro 19. Regresión para el diámetro de tallo por tratamiento en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana bajo el efecto de los inoculantes a base de *T. album* y *T. koningii* y el patógeno durante el tiempo de evaluación. IASA-ECUADOR, 2006.

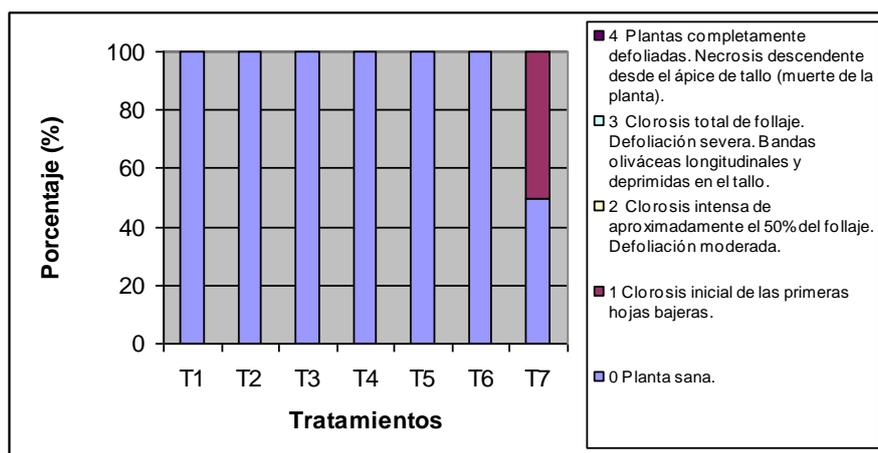
| TRATAMIENTOS | ECUACION DE REGRESION | C. DETERMINACION |
|--------------|-----------------------|------------------|
|--------------|-----------------------|------------------|

| | | |
|--|---------------|------|
| T1 (<i>T. koningii</i> 1x10 ⁸ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.79+0.00X | 0.94 |
| T2 (<i>T. koningii</i> 1x10 ⁹ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.81+0.00X | 0.94 |
| T3 (<i>T. koningii</i> 1x10 ¹⁰ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.71+0.00X | 0.98 |
| T4 (<i>T. album</i> 1x10 ⁸ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.76+0.01X | 0.97 |
| T5 (<i>T. album</i> 1x10 ⁹ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.70+0.00X | 0.96 |
| T6 (<i>T. album</i> 1x10 ¹⁰ + <i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.81+0.00X | 0.98 |
| T7 testigo (<i>F. oxysporum</i> 1x10 ⁴) | Y= 0.71+0.00X | 0.99 |

5.2.4. Efecto de los inoculantes *Trichoderma koningii* y *T. album* en la variación de la severidad externa de los injertos de babaco.

La evaluación de estos datos se hizo en base a la escala propuesta por Vintimilla (2000), para lo cual se contó la cantidad de plantas que alcanzaron las diversas calificaciones tanto a los 30 y 60 días, respectivamente. Por tanto se transformo dichos valores del número de plantas de cada categoría a porcentaje por categoría.

A los 30 días solamente el testigo T7 (*F. oxysporum* 1x10⁴) alcanzó un porcentaje del 50% para la calificación de 1 (Figura 9), ya que las plantas presentaron una clorosis inicial en hojas bajas y un ligero arrugamiento de las hojas lo que indica la patogenicidad de *Fusarium oxysporum* f sp *caricae*, Agrios (2002) menciona que los tejidos pierden turgencia y las hojas que adquieren una tonalidad amarillo verdoso (Foto14). En los demás tratamientos no hubo plantas que presentaran algún síntoma por lo que todas alcanzaron un 100% para la escala de 0. Esto indica que *Trichoderma koningii* y *album* controlaron eficientemente a *Fusarium oxysporum* f sp *caricae*.



T1 (*T. koningii* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T2** (*T. koningii* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T3** (*T. koningii* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T4** (*T. album* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T5** (*T. album* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T6** (*T. album* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T7** (Testigo-*F. oxysporum* 1×10^4).

Figura 9. Porcentaje de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana en las diferentes categorías de la Escala de Severidad Externa a los 30 días. IASA-ECUADOR, 2006.



Foto14. Planta de babaco injertada en papaya hawaiana perteneciente al Tratamiento T7 (testigo *F. oxysporum* 1×10^4) después de la inoculación del patógeno (*F. oxysporum*) a los 30 días. IASA-ECUADOR, 2006.

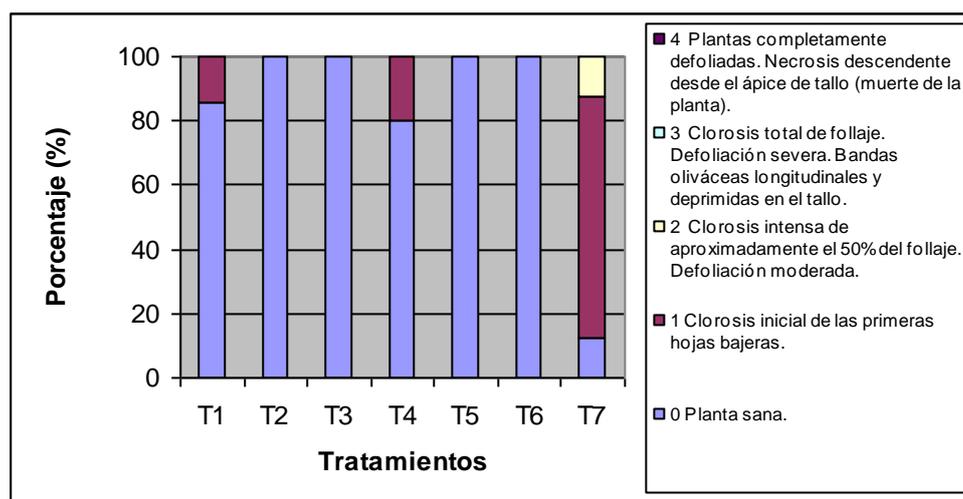
A los 60 días el Tratamiento T1 (*T. koningii* 1×10^8) y Tratamiento T4 (*T. album* 1×10^8) a pesar de su menor concentración, se obtuvo un 14% con el Tratamiento T1 se situándose bajo la escala de 1 mientras que con el Tratamiento T4 el 20%. Esto demuestra que *Trichoderma* con una concentración baja realizó un control eficiente solo hasta los 30 días, aunque el porcentaje de síntomas externos fue mínimo.

Para el tratamiento T7 (Testigo *F. oxysporum* 1×10^4) se determinó que el 12.5% de las plantas evaluadas se encuentran en la en la categoría 0 en la escala, el

75% en la clase 1, mientras que el 12.5% alcanzó la clase 2 que indica una clorosis del 50% en hojas bajas y defoliación moderada (Figura 10). Agrios (2002) y Cañizares (1998), mencionan que al aumentar el crecimiento del patógeno dentro de la planta se produce un decaimiento, así como el encogimiento de las hojas por pérdida de turgencia (Foto 15). Posteriormente a partir del ápice se observó un necrosamiento descendente del tallo debido al ataque y movimiento vascular de la enfermedad.



Foto 15. Planta de babaco injertada en papaya hawaiana perteneciente al Tratamiento T7 después de 60 días de la inoculación con *F. oxysporum* 1×10^4 UFC/ml. IASA-ECUADOR, 2006.



T1 (*T. koningii* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4). **T2** (*T. koningii* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4). **T3** (*T. koningii* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4). **T4** (*T. album* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4). **T5** (*T. album* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4). **T6** (*T. album* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4). **T7** (Testigo-*F. oxysporum* 1×10^4).

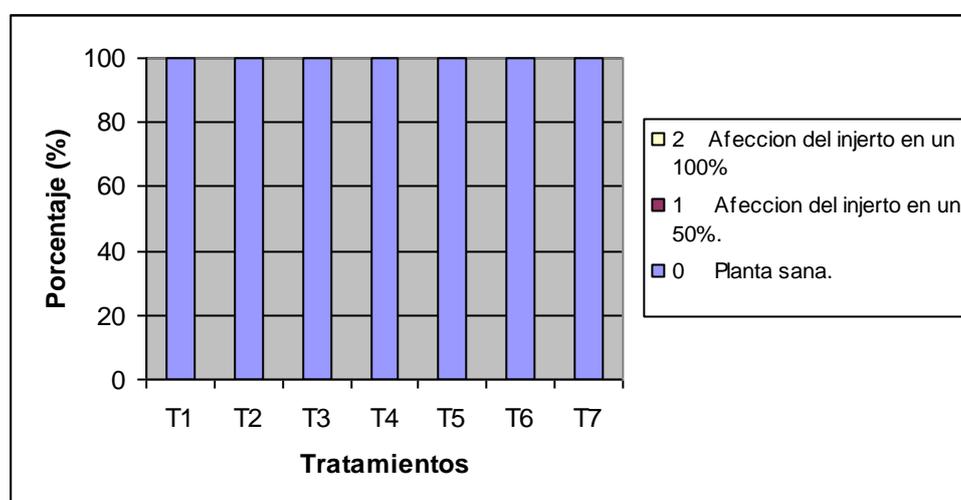
Figura 10. Porcentaje de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana en las diferentes categorías de la Escala de Severidad Externa a los 60 días

después de la inoculación de *Trichoderma koningii* y *T. album*. IASA-ECUADOR, 2006.

5.2.5. Infección del Injerto

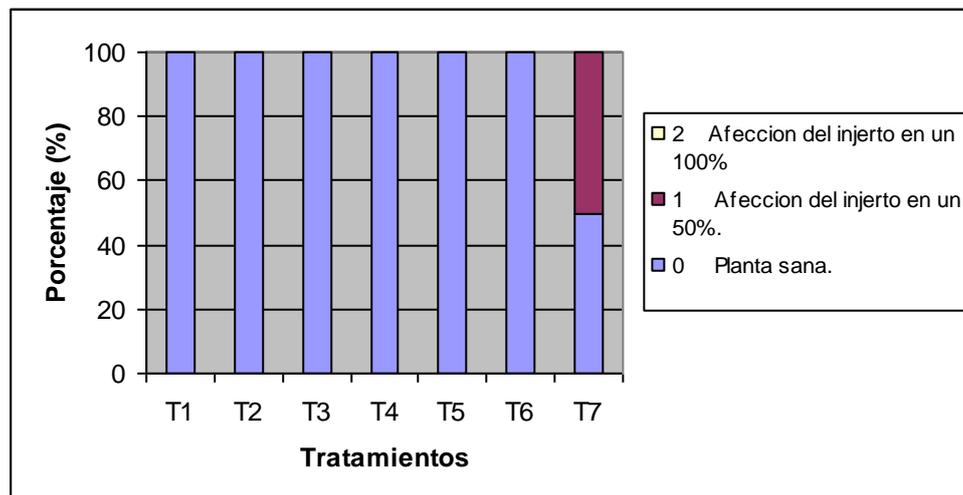
Se evaluaron los signos externos del injerto, luego de 30 días. En todos los tratamientos se obtuvo una calificación de 0 en la escala, esto corresponde a un 100% sanas (Figura 11). A los 60 días con el tratamiento T7 (*F. oxysporum* 1×10^4) según la escala de infección del injerto, el 50% presentó síntomas como amarillamiento de hojas, decaimiento mientras que el resto de tratamientos no presentaron ningún tipo de signos (Figura 12).

Todo demuestra que *Trichoderma koningii* y *T. album* realizaron un buen control. *T. koningii* es un excelente controlador biológico para fitopatógenos al igual que otras especies de *Trichoderma* como: *T. harzianum*, *T. hamatum*, *T. polyspermun* (Citado por Rodríguez V, 2002). No existen reportes acerca de *Trichoderma album* como controlador biológico sin embargo en esta investigación se comprobó su eficiencia para controlar *Fusarium oxysporum* tanto en pruebas duales como *in-vivo*.



T1 (*T. koningii* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T2** (*T. koningii* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T3** (*T. koningii* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T4** (*T. album* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T5** (*T. album* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T6** (*T. album* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T7** (*Testigo*-*F. oxysporum* 1×10^4).

Figura 11. Porcentaje de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana en las diversas categorías de la Escala de Infección del Injerto 30 días de la inoculación de *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum*. IASA-ECUADOR, 2006.



T1 (*T. koningii* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T2** (*T. koningii* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T3** (*T. koningii* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T4** (*T. album* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T5** (*T. album* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T6** (*T. album* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T7** (*Testigo*-*F. oxysporum* 1×10^4).

Figura 12. Porcentaje de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana en las diversas categorías de la Escala de Infección del Injerto luego de 60 días de la inoculación de *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum* en plantas. IASA-ECUADOR, 2006.

5.2.6. Escala de Severidad Interna

La evaluación de estos datos se hizo en base la escala propuesta por Vizúete (2000), para lo cual se cortó transversalmente y se contabilizó la cantidad de plantas que alcanzaron las diversas calificaciones a los 60 días. El número de plantas enfermas se expresó en porcentaje.

El 57% de plantas del tratamiento T1 (*T. koningii* 1×10^8) alcanzó en la escala el valor de 0, el 28,41% el valor de 1 y el 14,59% el valor de 1^a. Para el tratamiento T4 (*T. album* 1×10^8), el 80% se ubicó en la escala de 0 y el 20% en el valor de 1; siendo los de menor concentración (Figura 13). Al cortar las plantas se encontraron leves lesiones en la corteza y raicillas de la planta, así como en algunas lesiones más pronunciadas en la

corteza y una ligera colonización del patógeno en el cuello de la raíz. Estas lesiones fueron de color café lo que indican que el patógeno ha ingresado a la raíz (Foto 16). Estos hechos demuestran que el mejor controlador es *T. album* ya que solo cierto porcentaje de plantas llegó a la categoría de 1 en la escala.

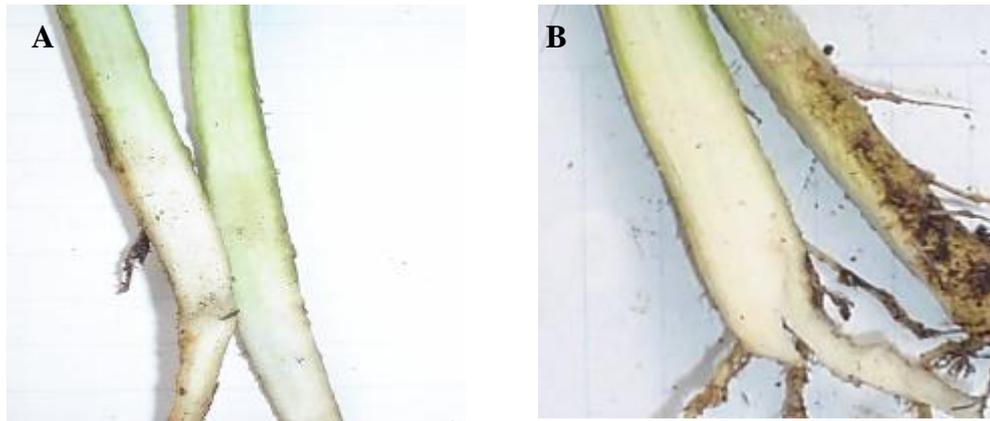


Foto 16. A). Lesiones causadas por *F. oxysporum* en plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana pertenecientes al Tratamiento T1 (*T. koningii* 1×10^8). B) Plantas sanas Tratamiento T6 (*T. album* 1×10^{10}). IASA-ECUADOR, 2006.

En el Tratamiento 7 testigo (*F. oxysporum* 1×10^4 UFC/ml) el 87.5% alcanzó la calificación de 1 y el 12.5% de 1^a, esto prueba la patogenicidad *F. oxysporum* y el cierto grado de tolerancia dada por el patrón como lo registra Galarza y Ochoa (2001). Ninguna planta murió a causa del patógeno, esto se debe a que en *Vasconcellea papaya* la colonización se produjo a nivel de cuello, sin embargo los síntomas de la enfermedad se observaron ya que las raíces fueron afectadas. Ochoa y Fonseca (1998) afirman que la mayoría de los síntomas se presentan en una porción longitudinal de la planta que corresponde a la raíz afectada, para luego involucionar a toda la planta.

Agrios (1995 y 2002) indica que al ingresar el patógeno a la raíz el micelio se extiende por los vasos xilemáticos, al realizar cortes se muestran zonas cafés decoloras

dispuestas en anillo o incompletas que constan de tejidos vasculares decolorados. Con frecuencia, las células parenquimatosas entorno a los vasos xilémicos son estimuladas por secreciones del patógeno para que se dividan excesivamente, esto, unido a las paredes adelgazadas y debilitadas de los vasos. La Foto 17 muestra al tratamiento T7 testigo (*F. oxysporum* 1×10^4) y las manchas cafés a los lados de la corteza de la raíz.

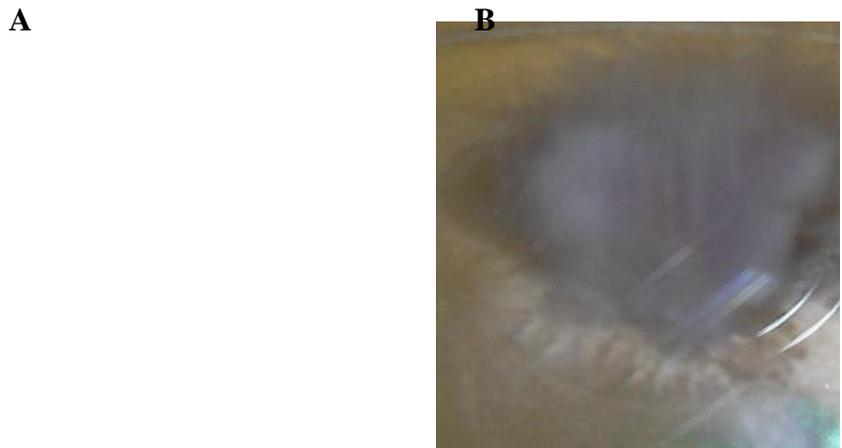
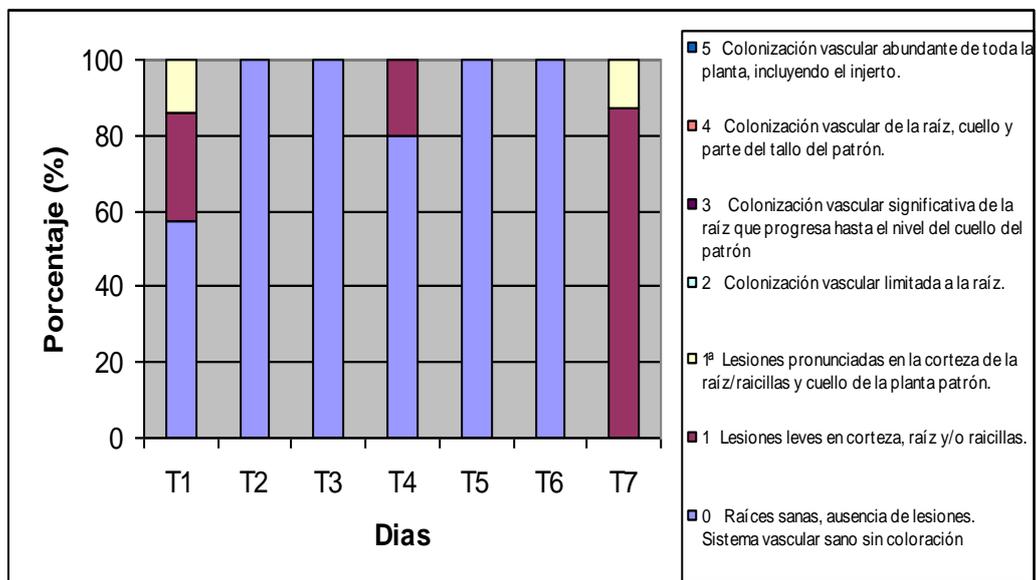


Foto 17. A). Lesiones y decoloración en la raíz de plantas del T7 (*F. oxysporum* 1×10^4). B) Reaislamiento en PDA de *Fusarium oxysporum* del material vegetal enfermo de los testigos.



T1 (*T. koningii* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T2** (*T. koningii* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T3** (*T. koningii* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T4** (*T. album* 1×10^8 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T5** (*T. album* 1×10^9 + *F. oxysporum* 1×10^4), **T6** (*T. album* 1×10^{10} + *F. oxysporum* 1×10^4), **T7** (Testigo-*F. oxysporum* 1×10^4).

Figura 13. Porcentaje de plantas de babaco injertadas en papaya hawaiana representadas en la Escala de Severidad Interna luego de la

inoculación de *Trichoderma album* y *T. koningii* y *Fusarium oxysporum* a los 60 días. IASA-ECUADOR, 2006.

Al comparar los registros de la escala de Severidad interna con la de Severidad externa a los 60 días después de la inoculación de *Trichoderma* y *Fusarium* se observó que solo un porcentaje mínimo de plantas demostró síntomas en sus hojas bajas, pero al realizar cortes transversales en muchas de las plantas que no presentaban síntomas externos se constato que hubo una colonización ligera en las raíz del patógeno debido a la presencia de manchas cafés.

5.2.7. Mortalidad de plantas debido a otros agentes fitopatógenos diferentes de *Fusarium oxysporum* f sp. *caricae*.

Esta variable se la evaluó a lo largo del ensayo y se contabilizó al final. Del total de plantas muertas bajo invernadero se obtuvo que el 27.08% murieron debido a *Phytophthora palmivora* y el 72,92% debido a bacterias como *Erwinia* sp., (Figura 14).

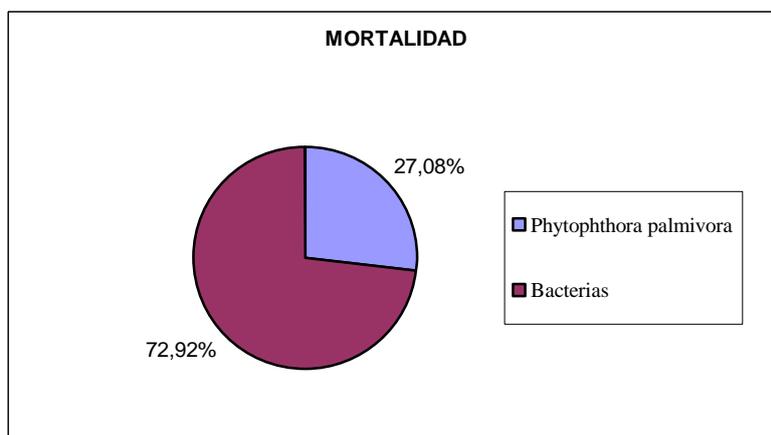


Figura 14. Porcentaje de mortalidad a causa de Bacterias y *Phytophthora palmivora* en plantas de babaco injertadas en papaya. IASA-ECUADOR, 2006.

Se comprobó que papaya hawaiana fue susceptible a *Phytophthora palmivora*. Se hizo un aislamiento del material vegetal enfermo y se obtuvo en PDA un hongo de micelio blanquecino algodonoso (Foto 18A). Se observó en el microscopio estructuras de fructificación esporangiofóros (Foto 18B) y mediante la clave de hongos Oomycetes de los géneros *Pythium* y *Phytophthora* (voxArx 1974). Los síntomas que presentaron las plantas fueron ablandamiento de tejidos, pudrición acuosa sin olor y al final las plantas aparecieron con un tallo agrietado (Foto 18C) y se dobló fácilmente (Jiménez, 2002).

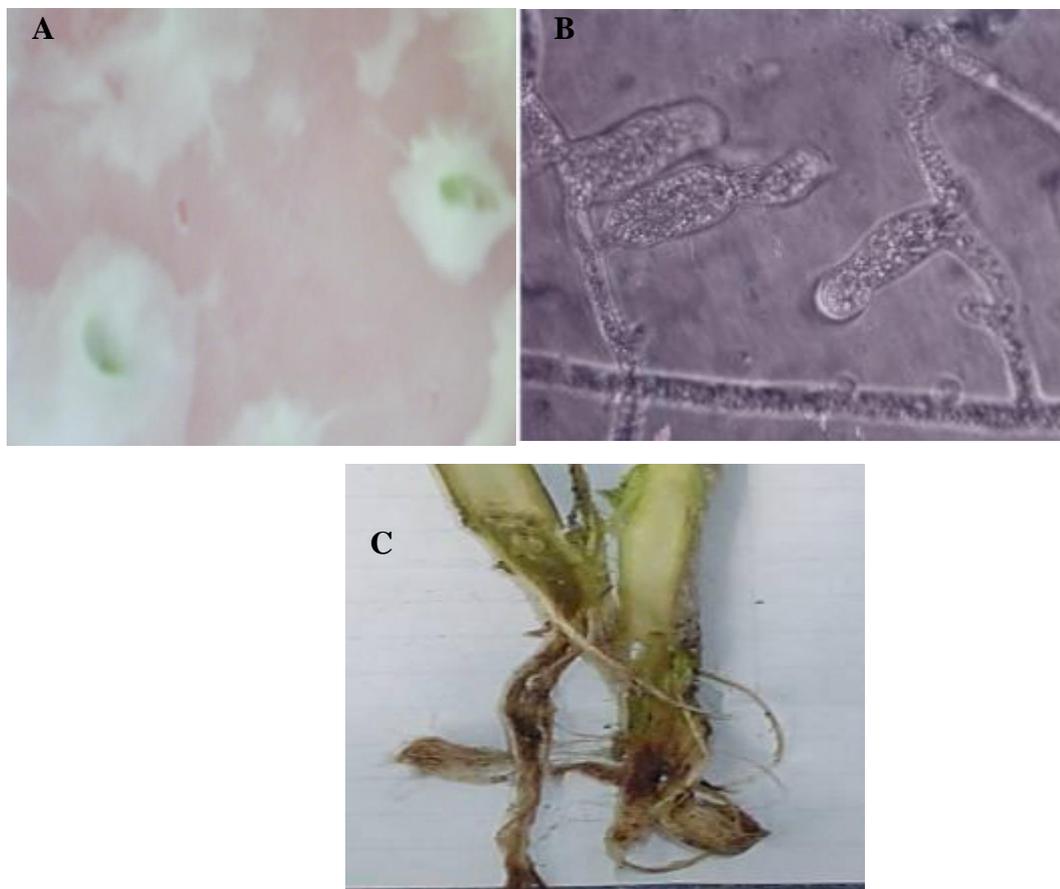


Foto 18. A) Micelio blanquecino y algodonoso perteneciente a *Phytophthora palmivora* B) Esporangioforo de *Phytophthora palmivora*. C) planta afectada de babaco injertada en papaya hawaiana por *Phytophthora palmivora*. IASA-ECUADOR, 2006.

Las bacterias como *Erwinia* sp provocaron pudriciones a nivel de la zona de injerto provocando pudrición blanda y posterior necrosamiento del tejido en la zona de cambium lo que provocó mortalidad en el injerto y la contaminación del patrón. La presencia de dicha bacteria afectó la zona de injerto. Chávez (2006) después de la injertación al termino de los 21 días obtuvo un porcentaje de mortalidad en los injertos de babaco realizados sobre papaya hawaiana del 15% debido a bacterias como *Erwinia* sp., y hongos como *Botrytis* sp., en la zona del injerto, provocando pudriciones acuosas lo que causó mortalidad de los injertos en la fase de laboratorio.

5.3 Análisis Económico.

Se realizó un análisis de costos por planta y costos por tratamientos debido a que no se obtuvo producción, siendo útil para las fases experimentales en la obtención de material vegetal certificado (Cuadro 20). Los costos por planta corresponden al valor del bioformulado, mano de obra, planta. El costo por planta varía dentro de cada tratamiento debido a que el valor de bioformulado disminuye de acuerdo a la concentración ocupada. El costo por tratamiento comprende al número total de plantas enviadas al invernadero más el fertilizante.

Cuadro 20: Costos de plantas y tratamientos. IASA-ECUADOR, 2006.

| TRATAMIENTOS | Costo por plantas | Costo por Tratamiento | Cst. Por planta. Al Final |
|---|-------------------|-----------------------|---------------------------|
| T1 (<i>T. koningii</i> 1×10^8 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 1,802 | 23,56 | 3,48 |
| T2 (<i>T. koningii</i> 1×10^9 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 1,812 | 23,69 | 4,84 |
| T3(<i>T. koningii</i> 1×10^{10} + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 1,97 | 25,74 | 4,36 |

| | | | |
|--|-------|-------|------|
| T4 (<i>T. album</i> 1×10^8 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 1,8 | 23,53 | 4,81 |
| T5 (<i>T. album</i> 1×10^9 + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 1,809 | 23,65 | 3,49 |
| T6 (<i>T. album</i> 1×10^{10} + <i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 1,99 | 26 | 5,30 |
| T7 (<i>F. oxysporum</i> 1×10^4) | 1,85 | 24,18 | 3,14 |

El costo por tratamiento al final de la investigación varía debido a que hubo un porcentaje de mortalidad muy alto de 52.74%, lo que ocasiona que en los tratamientos donde hubo un mayor numero de plantas muertas, el costo al final por planta para cada tratamiento se incrementa

6. CONCLUSIONES.

Las seis cepas de *Trichoderma* spp y *Fusarium oxysporum* f sp *caricae* mantuvieron a lo largo del estudio, óptimas características de viabilidad y pureza ya que al efectuar resiembras en agar PDA se obtuvo un adecuado crecimiento de los antagonistas y del patógeno libre de contaminantes externos lo que determinó su viabilidad por lo que la metodología y medios de cultivo *in vitro* utilizados fueron adecuados.

Las seis cepas *Trichoderma* spp probadas frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae*, demostraron capacidad antagónica. De las seis cepas, *Trichoderma koningii* y *Trichoderma album* demostraron actividades inhibitorias mayores que las otras para las pruebas *in vitro*, ya que al sexto día alcanzaron la categoría 4 dentro de la escala de capacidad antagónica.

Los síntomas de Marchitez vascular del babaco se presentaron en los Tratamientos T1 (*T. koningii* 1×10^8 ufc/ml + *F. oxysporum* 1×10^4 ufc/ml), T4 (*T. album* 1×10^8 ufc/ml + *F. oxysporum* 1×10^4 ufc/ml) luego de 60 días, mientras que en el T7 (Testigo *F. oxysporum* 1×10^4 ufc/ml) se presentaron a los 30 y 60 días. Por lo tanto de los resultados obtenidos demuestran que existe tolerancia en papaya hawaiana como en otras especies de *Vasconcelleas*. Los resultados obtenidos constituyen información nueva para esta especie, a nivel de país.

En invernadero las plantas que fueron inoculadas con *Trichoderma album* tuvieron un mayor incremento en altura comparado con aquellas tratadas con *Trichoderma koningii*. El incremento diario de la altura del injerto fue de 0.06 cm lo que indica que esta cepa tiene un efecto positivo en el crecimiento vegetal.

Las plantas inoculadas con concentraciones de 1×10^8 ufc/ml de *Trichoderma koningii* y *Trichoderma album* presentaron luego de 60 días la categoría de 1 dentro de la Escala de Severidad Interna, sin embargo la colonización de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* se presentó solo a nivel de raíz. Esto implica que el patrón usado otorgó cierto grado de tolerancia al patógeno.

Papaya hawaiana es susceptible a *Phytophthora palmivora* por lo cual el porcentaje de mortalidad fue de 27% y el 73% debido a bacterias como *Erwinia* sp., esto determinó que a pesar de su buena afinidad con el injerto no es un patrón aceptable bajo condiciones de invernadero.

6. RECOMENDACIONES

Hacer un estudio sobre el comportamiento de *Trichoderma album* en formulaciones líquidas y del metabolito activo mediante espectro infrarrojo u caracterización a nivel bioquímico, por ser la cepa más eficiente.

Realizar tratamientos preventivos de semilla seleccionada de papaya con *Trichoderma* para evitar la presencia de hongos y bacterias fitopatógenas en la etapa de semillero e invernadero en los portainjertos

Evaluar por lapsos mayores de tiempo en el campo, el comportamiento de las plantas injertadas de babaco en papaya hawaiana frente a *Trichoderma* mediante variables como: conteo del número de raíces, índice plastocrómico, tasa de fotosíntesis, para determinar el efecto del antagonista sobre el crecimiento y fisiología de la planta.

Para nuevas investigaciones que persigan objetivos similares, incluir varias cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* procedente de diferentes localidades con las que se haya previamente verificado su patogenicidad; a fin de establecer su comportamiento ante la acción antagonista de las diversas cepas de *Trichoderma* spp.

Realizar estudios morfológicos y moleculares de *Fusarium oxysporum* f. sp. *caricae* para determinar nuevas razas y estudios en función del tiempo.

Las posibles interacciones antagonista defensas secundarias de la planta, tienen que ser estudiadas más a fondo con base a los resultados obtenidos.

Realizar análisis económicos en base a la producción para determinar el Costo/Beneficio, demostrando así cuán rentable puede resultar para el agricultor.

