



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

TEMA: CARACTERIZACIÓN DE LA COMUNIDAD FÚNGICA DE LA
RIZOSFERA DE PLANTAS DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*
Benth), TRATADAS Y NO TRATADAS CON *Trichoderma* spp. COMO
TRATAMIENTO PARA LA ENFERMEDAD DE PIE NEGRO.

AUTOR: BENÍTEZ TORRES, ERIKA PATRICIA

DIRECTOR: ING. FLORES FLOR, FRANCISCO JAVIER, PhD

SANGOLQUÍ

2019

CERTIFICACIÓN



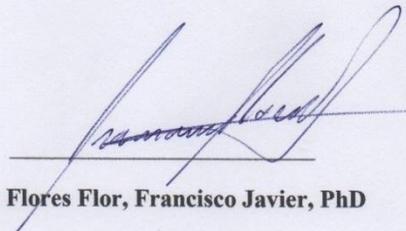
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**Caracterización de la comunidad fúngica de la rizosfera de plantas de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), tratadas y no tratadas con *Trichoderma* spp. como tratamiento para la enfermedad de pie negro.**” fue realizado por la señorita **BENÍTEZ TORRES, ERIKA PATRICIA** el mismo que ha sido revisado en su totalidad, analizado por la herramienta de verificación de similitud de contenido; por lo tanto cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, razón por la cual me permito acreditar y autorizar para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 9 de mayo 2019.



Ing. Flores Flor, Francisco Javier, PhD

DIRECTOR

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **BENÍTEZ TORRES, ERIKA PATRICIA** con cedula de identidad N° 1804335782, declaro que este trabajo de titulación “**Caracterización de la comunidad fúngica de la rizosfera de plantas de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), tratadas y no tratadas con *Trichoderma* spp. como tratamiento para la enfermedad de pie negro.**” ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándolo en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría. En virtud de esta declaración me responsabilizo de su contenido, veracidad y alcance científico.

Sangolquí, 9 de mayo 2019.

BENÍTEZ TORRES ERIKA PATRICIA

C.I. 1804335782

AUTORIZACIÓN



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **BENÍTEZ TORRES ERIKA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la Institución el presente trabajo de titulación **“Caracterización de la comunidad fúngica de la rizosfera de plantas de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), tratadas y no tratadas con *Trichoderma* spp. como tratamiento para la enfermedad de pie negro.”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 9 de mayo 2019.

BENÍTEZ TORRES ERIKA PATRICIA

C.I. 1804335782

DEDICATORIA

*A mis padres Elizabeth e Iván, mi mayor ejemplo de lucha, dedicación y amor, y a mis hermanas
y sobrinos a quienes amo con mi vida.*

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por lo bendecida y afortunada que he sido. A mi familia que en cada paso han estado presentes con sus palabras de aliento y apoyo, a mis hermanas que siempre me han cuidado y han alentado a ser feliz, a mi Mamita que siempre me ha dado todo su amor, a mi Papito por tantas madrugadas y conversaciones, a Juli, Mati e Isa que me dan la alegría que necesito para continuar y a mi abuelita hermosa por compartir su vida conmigo.

Quiero principalmente agradecer al profesor Francisco Flores, quien desde el inicio me ayudó en el muestreo y el análisis de los datos, siempre estuvo pendiente de mis avances, de enseñarme a utilizar las herramientas bioinformáticas y quien siempre desea lo mejor para sus alumnos. Quiero decirle que siempre estaré agradecida con usted por haber sido mi tutor ya que además de ser un buen maestro es una gran persona.

Agradezco a Alma Koch por haber sido una gran maestra y sembrar en mí el gusto por la microbiología, por prestar su ayuda en cada momento requerido y ser de las pocas personas que se preocupan por el bienestar de los estudiantes en la Universidad.

A mis amigas y amigos con quienes he compartido grandes momentos durante esta etapa universitaria, a Mayri y Charli que quiero mucho por la alegría que hemos compartido, a mis compañeras del laboratorio que me han ayudado y guiado y a Dennys quien me ha dado ánimos para seguir, me ayudó a culminar este proceso y ha traído mucha paz y amor a mí vida.

También quiero agradecer al Programa de Fruticultura del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), principalmente al Ing. William Viera quién colaboró en el proyecto.

INDICE DE CONTENIDO

CERTIFICACIÓN	i
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	ii
AUTORIZACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO.....	v
LISTADO DE FIGURAS	viii
LISTADO DE TABLAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del Problema.....	1
1.2 Justificación del Problema	2
1.3 Objetivos de la Investigación.....	3
1.3.1 Objetivo general	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Marco Teórico.....	4
1.4.1 Mora de Castilla (<i>Rubus glaucus</i> Benth)	4
1.4.1.1 Origen y Reseña Histórica.....	4
1.4.1.2 Generalidades y Taxonomía	4
1.4.1.3 Enfermedad del Pie Negro.....	6
1.4.2 <i>Trichoderma</i>	7
1.4.2.1 Generalidades y Taxonomía	7
1.4.2.1.1 Competencia por espacio y nutrientes	9
1.4.2.1.2 Micoparasitismo.....	9
1.4.2.1.3 Antibiosis	9
1.5 Hipótesis	10
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	11
2.1 Zona de estudio	11

2.1.1 Trabajo de campo	11
2.1.2 Trabajo de laboratorio	12
2.2 Procedimientos	12
2.2.1 Toma de muestras.....	12
2.2.2 Extracción de DNA de suelo.....	13
2.2.3 Procesamiento de las secuencias	14
2.2.4 Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	15
2.2.4.1 Preparación de la muestra.....	15
2.2.4.2 Preparación del medio	15
2.2.4.3 Siembra.....	15
2.3 Extracción de DNA de cultivos de <i>Trichoderma</i> aislado.....	16
2.4 Amplificación de DNA mediante PCR.	16
2.5 Ensayo de antagonismo.....	16
CAPÍTULO III: RESULTADOS	18
3.1 Extracción DNA del suelo.....	18
3.2 Procesamiento de las secuencias	19
3.2.1 Secuenciación de segunda generación NGS	19
3.3. Perfiles Taxonómicos y diversidad	20
3.3.1 Diversidad fúngica	25
3.3.2. Grupos Tróficos y asignación de grupos ecológicos.....	27
3.3.2.1 Patógenos de plantas	30
3.4 Aislamiento de <i>Trichoderma</i>	31
3.5 Ensayo de antagonismo.....	33
CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN	39
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES.....	43
CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES	44
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA	45

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Mora de Castilla. Cultivo en Tisaleo- Tungurahua.....	5
Figura 2. <i>Trichoderma asperellum</i>	7
Figura 3. Campos de cultivo de mora de Castilla. Tisaleo, provincia de Tungurahua.....	11
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.....	18
Figura 5. Filos presentes en las muestras de suelo	21
Figura 6. Porcentajes acumulados de los 43 géneros principales encontrados, comparación entre muestras tratadas con <i>Trichoderma</i> y muestras sin tratamiento	22
Figura 7. Porcentajes acumulados de los 43 géneros principales encontrados, comparación entre muestras tratadas con <i>Trichoderma</i> con síntomas y sin síntomas de enfermedad y muestras sin tratamiento con síntomas y sin síntomas de enfermedad	23
Figura 8. Abundancia relativa de <i>Trichoderma</i> , <i>Dactylonectria</i> , <i>Ilyonectria</i> en los cuatro tratamientos.....	24
Figura 9. Abundancia relativa del género <i>Dactylonectria</i> en muestras con tratamiento de <i>Trichoderma</i> y muestras sin tratamiento	25
Figura 10. Abundancia de hongos en muestras con tratamiento de <i>Trichoderma</i> y muestras sin tratamiento	26
Figura 11. Índice de Shannon para muestras con tratamiento de <i>Trichoderma</i> y muestras sin tratamiento	27
Figura 12. Porcentaje de abundancia relativa de los grupos tróficos en los cuatro tratamientos..	28
Figura 13. Abundancia relativa de los grupos ecológicos al que afectan en muestras con tratamiento de <i>Trichoderma</i> y muestras sin tratamiento	29

Figura 14. Abundancia de hongos de géneros patógenos de plantas, comparación en los cuatro tratamientos	30
Figura 15. Abundancia de los principales géneros de hongos patógenos encontrados en muestras con tratamiento de <i>Trichoderma</i> y muestras sin tratamiento.....	31
Figura 16. Conidióforos de <i>Trichoderma</i> (40X).....	32
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1 %	32
Figura 18. Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial en el primer ensayo	38
Figura 19. Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial en el segundo ensayo.....	38

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1 <i>Taxonomía de la Mora de Castilla</i>	5
Tabla 2 <i>Taxonomía de Trichoderma</i>	8
Tabla 3 <i>Código utilizado en las muestras</i>	13
Tabla 4 <i>Concentración de cada muestra de ADN, medido en el NanoDrop</i>	18
Tabla 5 <i>Datos de la secuenciación</i>	19
Tabla 6 <i>Resultados del análisis con BLAST</i>	33
Tabla 7 <i>Primer ensayo de antagonismo</i>	34
Tabla 8 <i>Segundo ensayo de antagonismo</i>	36

RESUMEN

Desde el año 2012, cultivos de mora de la provincia de Tungurahua que presentan síntomas de la enfermedad del pie negro que produce marchitez, son tratadas con *Trichoderma* spp. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la comunidad fúngica de la rizosfera de plantas de mora de Castilla tratadas y no tratadas con *Trichoderma* spp., como tratamiento para la enfermedad del pie negro, ocho muestras fueron recolectadas de la rizosfera de cultivos de mora de Tisaleo, se extrajo ADN del suelo mediante un kit y se realizó secuenciación masiva de ITS, adicionalmente se aisló *Trichoderma* de las muestras y se realizó dos ensayos de antagonismo enfrentando a *T. asperellum* y *T. hamatum* contra especies de *Ilyonectria* y *Dactylonectria* asociados con esta enfermedad en la mora, en el cual se obtuvo como resultado a las 144 horas un porcentaje de inhibición de crecimiento radial en promedio de 45,50 %. Después del procesamiento bioinformático de las secuencias se obtuvo como promedio 125.254,5 secuencias por muestra, las cuales fueron agrupadas por unidad taxonómica operativa en 289 distintos OTUs, a partir de los cuales se elaboraron perfiles taxonómicos. Adicionalmente, se asignó el grupo trófico al que pertenecen y se encontró que el mayor porcentaje de hongos patrótrofos, 38,1 %, pertenece a la muestra de suelo de planta con síntomas de enfermedad y con tratamiento de *Trichoderma* y el mayor porcentaje de hongos saprofitos, 75,4 %, se encuentra en la muestra de suelo de planta sin síntomas de enfermedad y con tratamiento de *Trichoderma*.

PALABRAS CLAVE:

- **TRICHODERMA**
- **PERFILES TAXONÓMICOS**
- **GRUPOS TRÓFICOS**
- **FITOPATÓGENOS**
- **ANTAGONISMO**

ABSTRACT

Since 2012, blackberry crops from the province of Tungurahua that show symptoms of the disease of the black foot that produces wilting, are treated with *Trichoderma* spp. The objective of the present work was to characterize the fungal community of the rhizosphere of blackberry plants treated and not treated with *Trichoderma* sp., As a treatment for the disease of the black foot, eight samples were collected from the rhizosphere of blackberry cultures of Tisaleo , DNA was extracted from the soil and next generation sequencing ITS was performed, *Trichoderma* was isolated from the samples and two antagonism assay were carried out *T. asperellum* and *T. hamatum* against species of *Ilyonectria* and *Dactylonectria* associated with the black foot disease in the blackberry, which resulted after 144 hours a percentage of inhibition of radial growth an average of 45.50 %. After the bioinformatic processing of the sequences, an average of 125,254.5 sequences per sample were obtained, which were grouped by operational taxonomic unit in 289 different OTUs, from which taxonomic profiles were elaborated. Additionally, the trophic group to which they belong was assigned and it was found that the highest percentage of pathotrophic fungi, 38.1 %, belongs to the sample of plant soil with symptoms of disease and with *Trichoderma* treatment and the highest percentage of saprotrophic fungi, 75.4 %, is found in the sample of plant soil without symptoms of disease and with *Trichoderma* treatment.

KEY WORDS:

- **TRICHODERMA**
- **TAXONOMIC PROFILING**
- **TROPHIC GUILDS**
- **PHYTOPATHOGENS**
- **ANTAGONISM**

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

La enfermedad del pie negro fue descrita por primera vez en 1961, es una grave enfermedad que afecta a la producción de varios cultivos (Agustí & Armengol, 2013). Se caracteriza por la marchitez de la planta, lesiones necróticas que se desarrollan a través de la corteza y la vasculatura de las raíces y la base del tallo, clorosis foliar y rizado en las puntas de las hojas (Iturralde, 2017).

Desde el año 2010, cultivos de mora en las provincias de Tungurahua y Bolívar empezaron a presentar síntomas de la enfermedad del pie negro, que produce marchitez en las plantas de mora. Según Iturralde, (2017) especies de *Dactylonectria* e *Ilyonectria* están asociados con esta enfermedad en la mora de Castilla.

En estudios previos se ha investigado el efecto de *Trichoderma spp.* en cultivos con síntomas de la enfermedad de pie negro (Rivadeneira,2016). En 1794, Persoon propone por primera vez a *Trichoderma* como género, cuatro especies son descritas, *T. viride*, *T. nigroscens*, *T. aureum* y *T. roseum*. En 1969, Rifai desarrolló una clave de identificación, hizo el primer agrupamiento en especies agregadas que se utiliza hasta el presente (Martínez, Infante, & Reyes, *Trichoderma spp.* y su función en el control de plagas en los cultivos, 2013).

El potencial de *Trichoderma* como agente biológico fue reportado por Weindling en 1932. En su trabajo, Weindling, describe en detalle el micoparasitismo de un hongo patógeno

(*Rhizoctonia solani*) por las hifas de *Trichoderma lignorum*, además también describe un antibiótico que resulta tóxico para varios hongos y lo nombra Gliotoxina. En los años siguientes, resultados similares fueron reportados por varios fitopatólogos (Howell, 2003; Kumar, y otros, 2017).

Las funciones ecológicas de *Trichoderma* spp. en la rizosfera son muy amplias debido al intercambio y reconocimiento de señales entre el hongo y plantas que pueden alterar aspectos fisiológicos y bioquímicos en ambos (Contreras H. , Macías, Del-Val, & Larsen, 2016). La rizosfera es considerada uno de los ecosistemas más complejos en la Tierra, por su diversidad y complejidad microbiológica, 1g-1 de suelo puede contener más de 10 billones de microorganismos, de los cuales solamente el 1 % puede ser aislado por técnicas convencionales de cultivo.

1.2 Justificación del Problema

La mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), es un cultivo de importancia económica en el Ecuador, donde se reportan alrededor de 5247 ha de mora. En la provincia de Tungurahua, el cultivo de mora es una de las principales actividades del sector agrícola, aproximadamente el 60 % de la producción nacional es cultivada en esta provincia (Producción de mora, un potencial en Tungurahua, 2017).

En el 2012, el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), desarrolló como parte del Programa de Fruticultura Sierra- Central, un ensayo en el cual suelos de cultivo de mora fueron tratados con *Trichoderma* spp. estos trabajos estuvieron orientados a dar alternativas tecnológicas para el manejo limpio y orgánico del cultivo de la mora.

En la presente investigación se pretende determinar perfiles taxonómicos de muestras del suelo previamente mencionados, para establecer los efectos que causa la aplicación de *Trichoderma* sobre la microbiota del suelo y determinar las diferencias en las comunidades fúngicas de suelos tratados y no tratados.

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo general

Caracterizar la comunidad fúngica de la rizosfera de plantas de mora de Castilla, tratadas y no tratadas con *Trichoderma* spp. como tratamiento para la enfermedad de pie negro.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar los perfiles taxonómicos de cada una de las muestras de suelo.
- Comparar la composición fúngica de las diferentes muestras de acuerdo a su clasificación en grupos tróficos.
- Establecer la presencia de especies de *Trichoderma* en el suelo y determinar su capacidad inhibitoria frente a hongos asociados con la enfermedad de pie negro.

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth)

1.4.1.1 Origen y Reseña Histórica

La mora de Castilla es un frutal andino nativa de climas fríos y moderados, descubierta por Hartw en 1840, quien la recolectó por primera vez en las laderas del Pichincha (Ecuador) y descrita por Benth en 1845. Se encuentra distribuido en las zonas altas de Centro y Sur América. En Ecuador se encuentra en la región andina, desde los 1500 a 3500 msnm (Plantas Nativas de la Hoya de Quito, 2016, Martínez, Vásquez, Viteri, Jácome, & Ayala, 2013).

En Ecuador es un cultivo de gran importancia económica, existen alrededor de 5247 ha de mora cultivadas, distribuidas en las provincias de Cotopaxi, Tungurahua, Bolívar, Chimborazo, Pichincha, Imbabura y Carchi (Martínez, Vásquez, Viteri, Jácome, & Ayala, 2013).

1.4.1.2 Generalidades y Taxonomía

La mora es un arbusto de vegetación perenne y naturaleza trepadora, puede alcanzar los 3 metros de altura. El fruto está compuesto por drupas pequeñas (Figura 1) de color purpura cuando están maduros, rico en vitaminas, minerales y gran actividad antioxidante. La planta de mora comienza a fructificar a los 6 u 8 meses después de la siembra (Freire, 2012, Plantas Nativas de la Hoya de Quito, 2016).



Figura 1. Mora de Castilla.
Cultivo en Tisaleo-
Tungurahua.

Taxonomía de la mora de Castilla.

Tabla 1

Taxonomía de la mora de Castilla.

Reino	Vegetal
División	Antofita
Clase	Dicotiledónea
Subclase	Arquiclamidea
Orden	Rosales
Familia	Rosaceae
Género	Rubus
Subgéneros	<i>Eubatus</i> (<i>Rubus glaucus</i> Benth), <i>Idaeobatus</i> , <i>Orobatus</i> , 9 Subgéneros más.
Especies (Presentes en Ecuador)	<i>R. loxensis</i> , <i>R. azuayensis</i> , <i>R. acanthophyllos</i> , <i>R. coriaceus</i> , <i>R. laegaardii</i> , <i>R. glabratus</i> , <i>R. roseus</i> , <i>R. nubigenus</i> , <i>R. compactus</i> , <i>R. ellipticus</i> , <i>R. niveus</i> , <i>R. glaucus</i> , <i>R. megalpococcus</i> , <i>R. adenothallus</i> , <i>R. peruvianus</i> , <i>R. bogotensis</i> , <i>R. adenotrichos</i> , <i>R. killipii</i> , <i>R. floribundus</i> , <i>R. boliviensis</i> , <i>R. urticifolius</i> .

Nota: Fuente: Mejía, (2011).

1.4.1.3 Enfermedad del Pie Negro

La enfermedad de pie negro en *Rubus glaucus*, se caracteriza por la marchitez, la cual se origina de una pudrición severa de la raíz. Tolosa (2015) afirma que “los agentes causales de esta enfermedad son múltiples y diversos y están en continua reevaluación taxonómica”, se encuentran incluidos dentro del género *Campylocarpon*, “*Cylindrocarpon*”, *Cylindrocladiella*, *Ilyionectria* y *Dactylonectria* (Iturralde, 2017; Agustí & Armengol, 2013).

Se la considera una enfermedad transmitida por el suelo, especialmente en sitios donde puede haber agua estancada durante tiempos significativos. Las heridas de poda en las partes altas de las plantas no se consideran sitios potenciales de entrada para estos hongos, aunque puede haber heridas a nivel del suelo. No se ha relacionado a ningún insecto como vector para propagar la enfermedad (Bonfiglioli, 2006).

Los síntomas característicos de la enfermedad del pie negro incluyen una reducción en la biomasa de la raíz, pelos radiculares con lesiones necróticas, el diámetro del rizoma disminuye, internamente la médula del cilindro vascular de la raíz muestra una decoloración negra y necrosis del tejido. Los síntomas externos muestran troncos de menor tamaño, follaje escaso, hojas pequeñas con clorosis y necrosis intervenales (Agustí & Armengol, 2013).

En Ecuador, se han presentado síntomas de la enfermedad del pie negro en las plantaciones de mora de Castilla desde el 2010. Durante el 2017, en las provincias de Tungurahua y Bolívar esta enfermedad tuvo una incidencia del 13,3 % lo que provocó una significativa pérdida económica a los agricultores. (Comunicación personal, William Viera Director del programa de Fruticultura del INIAP)

1.4.2 *Trichoderma*

1.4.2.1 Generalidades y Taxonomía

El género *Trichoderma* comprende un gran número de especies de hongos, las cuales son colonizadoras de materiales celulósicos y por lo general se encuentran en cualquier lugar donde esté disponible material vegetal en descomposición y también en la rizosfera de plantas donde pueden inducir resistencia sistémica contra patógenos. Se caracterizan por un crecimiento rápido, principalmente conidios de color verde brillante y una estructura de conidióforos repetidamente ramificada como se observa en la figura 2 (Schuster & Schmoll, 2010).



Figura 2. *Trichoderma asperellum*.
Nota: Fuente: Andermatt Biocontrol, (s.f.)

El género *Trichoderma* se ubica taxonómicamente de la siguiente manera.

Tabla 2*Taxonomía de Trichoderma.*

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Hypocreaceae
Género	Trichoderma

Nota: Fuente:

<http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=461012>. Recuperado: mayo 2019.

Las especies del género *Trichoderma* son considerados como agentes potenciales para control biológico desde 1930 (Howell, 2003). Por lo que en la actualidad se comercializa formulados de varias especies de *Trichoderma* los cuales al ser liberados en la rizosfera ejercen un efecto positivo en el crecimiento de las plantas y su nutrición, además inducen resistencia contra microorganismos patógenos (Contreras, Macías, del Val, & Larsen, 2016; Reino, Guerrero, Hernández, & Collado, 2008).

Las propiedades antagónicas de este género contra algunos fitopatógenos se deben a la activación de mecanismos como son la competencia por el espacio y nutrientes, el micoparasitismo y la antibiosis (Howell, 2003; Harman, 2005; Verma, Brar, Tyagi, Surampalli, & Valéro, 2007; Infante, Martínez, González, & Reyes, 2009).

1.4.2.1.1 Competencia por espacio y nutrientes

Según Infante et al. (2009) la competencia consiste en “ el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (sustrato, nutrientes), siempre y cuando la utilización de este por uno de los organismos reduzca la cantidad o espacio disponible para los demás” (p. 15).

Comparado con otros microorganismos, los hongos del género *Trichoderma* tienen mayor capacidad de movilizarse y tomar los nutrientes del suelo, debido a su potencial de transformar cualquier azúcar en ATP (Benítez, Rincon, Limón, & Codón, 2004). Además, para la mayoría de hongos el consumo de hierro es necesario para su viabilidad, los hongos de *Trichoderma* spp. pueden apoderarse de los iones de hierro mediante la liberación de compuestos quelantes altamente eficientes llamados sideróforos lo que provoca que el crecimiento de otros hongos se detenga (Benítez, Rincon, Limón, & Codón, 2004; Verma, Brar, Tyagi, Surampalli, & Valéro, 2007).

1.4.2.1.2 Micoparasitismo

Es un ataque directo de un hongo hacia otro hongo, el mecanismo de micoparasitismo empleado por algunas especies de *Trichoderma* es complejo e incluye crecimiento directo y enrollamiento hacia la hifa del hongo patógeno y la producción de enzimas extracelulares (quitinasas, glucanasas, proteasas) que según Verma et al. (2007) son un factor clave en la lisis de la pared celular de las hifas del hongo patógeno.

1.4.2.1.3 Antibiosis

Trichoderma spp. tiene la capacidad de producir compuestos anti microbianos de bajo peso molecular que inhiben el crecimiento o provocan la muerte del patógeno que se encuentra próximo

al área de crecimiento de *Trichoderma*. (Benítez, Rincon, Limón, & Codón, 2004; Verma, Brar, Tyagi, Surampalli, & Valéro, 2007)

Según Adnan, et al. (2019), tres tipos de metabolitos secundarios son producidos por *Trichoderma*; antibióticos volátiles, compuestos solubles en agua y peptaiboles. Cada especie de *Trichoderma* produce metabolitos volátiles y no volátiles con actividad antibiótica, algunos ejemplos son mencionados por Reino, Guerrero, Hernández, & Collado (2008) como son: antraquinonas, peptaiboles, terpenos volátiles, daucanos sesquiterpenos, pironas simples, ácido heptelídico y sus derivados, azapilones, entre otros.

1.5 Hipótesis

Existen diferencias significativas en la composición de la comunidad fúngica de la rizosfera de mora de Castilla tratada o no tratada con *Trichoderma* spp.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Zona de estudio

El presente estudio involucró dos fases:

2.1.1 Trabajo de campo

La obtención de las muestras se realizó en campos de cultivo de mora de Castilla (*Rubus glaucus* Benth), que forman parte del Programa de Fruticultura Sierra- Central, del INIAP, en el cantón Tisaleo, provincia de Tungurahua, con coordenadas: 01°21'30"S 078°39'30"W, a 3120m.s.n.m.



Figura 3. Campos de cultivo de mora de Castilla. Tisaleo, provincia de Tungurahua.

2.1.2 Trabajo de laboratorio

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen, que se encuentra ubicado en la Av. De los Granados y Av. Gral. Eloy Alfaro, con coordenadas: 0°09'56.1"S 78°28'07.7"W.

2.2 Procedimientos

2.2.1 Toma de muestras.

Se recolectaron muestras de suelo en cultivos de mora de Castilla en Tisaleo, provincia de Tungurahua.

Para la toma de muestra se utilizó, con ciertas modificaciones, la metodología descrita por Bach, Williams, Hargreaves, (2018), en la cual se utiliza un muestreador tubular de suelos de 5,5 cm de diámetro y se lo introduce aproximadamente a 20 cm de profundidad para tomar muestras de la rizosfera. Se extrajeron 5 núcleos de suelo por cada muestra, se los almacenó en fundas estériles resellables y con hielo en una nevera portátil hasta llegar al laboratorio, donde las muestras fueron almacenadas a 4°C.

Las muestras de rizosfera fueron recolectadas de forma aleatoria, se obtuvo 4 muestras de plantas con síntomas de la enfermedad de pie negro (2 con tratamiento de Trichoderma y 2 sin tratamiento) y 4 muestras de plantas sin síntomas de enfermedad (2 con tratamiento de Trichoderma y 2 sin tratamiento).

Tabla 3*Código utilizado en las muestras*

Código	Descripción
TE1	Planta con síntomas de enfermedad de pie negro, con tratamiento de Trichoderma. 1ra repetición.
TE2	Planta con síntomas de enfermedad de pie negro, con tratamiento de Trichoderma. 2da repetición.
TS1	Planta sin síntomas de enfermedad, con tratamiento de Trichoderma. 1ra repetición.
TS2	Planta sin síntomas de enfermedad, con tratamiento de Trichoderma. 2da repetición.
NE1	Planta con síntomas de enfermedad de pie negro, sin tratamiento de Trichoderma. 1ra repetición.
NE2	Planta con síntomas de enfermedad de pie negro, sin tratamiento de Trichoderma. 2da repetición.
NS1	Planta sin síntomas de enfermedad, sin tratamiento de Trichoderma. 1ra repetición.
NS2	Planta sin síntomas de enfermedad, sin tratamiento de Trichoderma. 2da repetición.

2.2.2 Extracción de DNA de suelo.

El suelo fue homogenizado y cribado en un tamiz de 250 μm . Para la extracción de DNA del suelo se utilizó 0,25 gramos del suelo que pasó a través del tamiz, con el kit de extracción: SurePrep Soil DNA Isolation Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 1.)

Para cuantificar la concentración y los ratios de pureza del DNA se utilizó el espectrofotómetro NanoDrop 8000 UV-Vis.

Los DNA extraídos de cada muestra fueron enviados a Macrogen Inc. en Korea, para que realicen la secuenciación de siguiente generación, con la amplificación de la región ITS con los primers ITS3F e ITS4R para dar un producto de 462 pares de bases.

2.2.3 Procesamiento de las secuencias

El análisis Bioinformático se realizó en el clúster de alto rendimiento la Universidad de las Fuerzas Armadas. En primer lugar, se realizó una limpieza de las secuencias obtenidas con el programa Trimmomatic-0,36, donde se eliminaron secuencias de mala calidad y las secuencias correspondientes a los adaptadores usados en la secuenciación con la plataforma Illumina, para datos paired-end son necesarios dos archivos de entrada, la secuencia forward y reverse, se obtiene 4 archivos de salida, 2 archivos “paired” para las secuencias pareadas donde ambas secuencias permanecen después del procesamiento y dos archivos de salida ‘unpaired’ donde solamente persiste una secuencia. Las secuencias forward y reverse “paired” fueron empalmadas con la herramienta bbmerge, para la obtención de una Tabla de OTUs (unidad taxonómica operativa) se agrupó y contabilizó la abundancia de secuencias idénticas con el comando Swarm de la herramienta VSEARCH y las quimeras fueron eliminadas mediante el algoritmo Uchime. Las secuencias no quiméricas fueron asignadas taxonómicamente utilizando el algoritmo BLASTN al 97 % de identidad con la base de datos UNITE ITS + *Oomycota*. Para la visualización de resultados se empleó la herramienta Kronatools, la cual genera un archivo en formato .html que puede ser visualizado usando cualquier navegador.

La normalización de la abundancia de las secuencias se realizó en R, utilizando el paquete metagenomeSeq’s CSS, además se descartó a los OTUs presentes en menos de 2 muestras y/o con abundancia menor a 10.

De 289 OTUs, con el programa FUNGuild asignó un grupo trófico a 242 OTUs, correspondiente al 83,7 %, de los cuáles únicamente se utilizaron para los siguientes análisis los

que tenían un nivel de confianza de “Probable” y “Altamente Probable” es decir 157 OTUs (Tabla 9, Anexos).

2.2.4 Aislamiento de Trichoderma

2.2.4.1 Preparación de la muestra

Las muestras de suelo fueron homogenizadas y tamizadas. Se pesó 10 g de cada muestra, con dos repeticiones por cada una. Siguiendo el protocolo de Aislamiento de Hongos facilitado por el Laboratorio de Diagnóstico Molecular IDgen (Anexo 2), se realizaron 4 diluciones seriadas por muestra.

2.2.4.2 Preparación del medio

Se preparó 700 ml de PDA con Captán al 1 % y cloranfenicol. El medio fue dispensado en 32 cajas Petri.

2.2.4.3 Siembra

Se rotularon las cajas Petri y en cada una se colocó 1 ml de la solución diluyente con la muestra de suelo y con ayuda del asa de Drigalski se extendió la muestra líquida sobre la superficie de la caja Petri.

Se incubó las cajas por 15 días y se realizó tinción con azul de metileno de los cultivos.

2.3 Extracción de DNA de cultivos de *Trichoderma* aislado.

Para la extracción de DNA de los cultivos de *Trichoderma* se utilizó el protocolo “Extracción de DNA de bacterias y hongos” modificado por Jarrín, F. (Anexo 3).

2.4 Amplificación de DNA mediante PCR.

Se amplificó la región ITS, para lo cual se utilizó los primers: Primer F ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) y Primer R ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC), generando un fragmento de DNA amplificado de aproximadamente 600 bp. Se siguió el protocolo descrito en *Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR protocols: A guide to Methods and Applications* (1990).

Los productos de PCR de los cultivos de *Trichoderma* aislados del suelo, fueron enviados a secuenciar en la compañía Macrogen Inc. en Korea, para su posterior purificación y secuenciación mediante el método Sanger. Los resultados fueron analizados en el software Geneious 10.0.8, donde se ensamblaron las secuencias forward y reverse y se obtuvo la secuencia consenso. Estas secuencias fueron analizadas en la base de datos del NCBI, mediante la herramienta BLASTN.

2.5 Ensayo de antagonismo.

Se realizaron dos ensayos de antagonismo, en el primer ensayo se utilizaron dos cepas aisladas de *Trichoderma* frente a tres especies de *Ilyonectria*: *I. vredenhoekensis*, *I. venezuelensis* e *I. robusta*, en el segundo ensayo de antagonismo se utilizó una cepa comercial de *Trichoderma asperellum* facilitada por el INIAP frente a *I. venezuelensis*, *I. robusta* y *Dactylonectria torresensis*.

Se siguió el protocolo descrito en “Antagonismo in vitro de aislamientos de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a *Sclerotium rolfsii* Sacc” (2017), en el cual se evalúa competencia por espacio entre los dos hongos. El porcentaje de Inhibición del Crecimiento radial se determinó con la siguiente formula:

$$\text{PICR} = \frac{r1 - r2}{r1} * 100$$

donde:

r1 - Crecimiento radial de la colonia en el control.

r2 - Crecimiento radial del aislamiento patógeno enfrentado al antagonista.

2.6 Análisis Estadístico

Se realizó una prueba de Duncan al 5 % de significancia para analizar la diferencia existente entre tratamientos, mediante el programa InfoStat versión 2018.

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Extracción DNA del suelo

Una vez concluido el protocolo de extracción de DNA de las muestras de suelo, se corrió un gel de electroforesis con los ADN para comprobar su presencia (Figura 4), además se midió las concentraciones de cada ADN, obteniéndose un rango entre 36-130,2 ng/ μ L (Tabla 4).

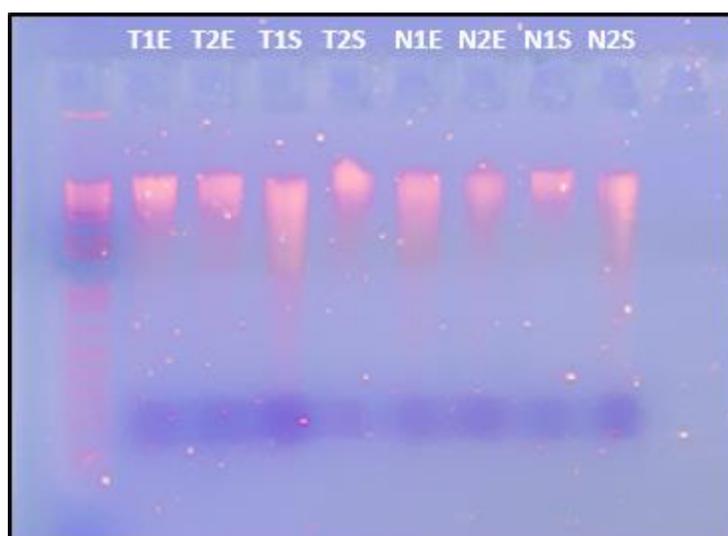


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Tabla 4

Concentración de cada muestra de ADN, medido en el espectrofotómetro NanoDrop 8000 UV-Vis.

Muestra	Concentración ng/ μ L	Muestra	Concentración ng/ μ L
T1E	130,2	N1E	36,0
T2E	90,6	N2E	54,8
T1S	70,4	N1S	39,8
T2S	56,5	N2S	60,6

3.2 Procesamiento de las secuencias

3.2.1 Secuenciación de segunda generación NGS

Con la secuenciación Illumina se obtuvo un promedio de 505.513 lecturas totales por muestra, el porcentaje de guanina- citocina estuvo en un rango de 49,10 y 51,433 y la proporción de bases con un puntaje de calidad mayor a 30 es en promedio de 81,42 % (Tabla 5).

Tabla 5

Datos de la secuenciación

Muestra	Bases de lectura totales (bp)	Lecturas totales	GC (%)	Q20(%)	Q30(%)
NS1	159'463.780	530.314	50,959	90,823	80,834
NS2	146'463.807	490.180	49,109	91,589	81,948
NE1	147'604.470	491.182	49,966	91,233	81,505
NE2	155'649.412	517.770	50,280	91,134	81,412
TS1	138'303.484	459.776	49,538	91,069	81,296
TS2	155'529.686	517.054	50,057	91,663	82,205
TE1	162'915.098	541.614	49,483	91,587	82,124
TE2	149'225.149	496.214	51,433	90,277	80,017

Nota: La primera columna corresponde al nombre de la muestra, Bases de lectura totales (bp) al número total de bases secuenciadas, lecturas totales, GC % el contenido de guanina- citocina, Q20 % y Q30 % la proporción de bases que tienen un puntaje de calidad mayor a 20 y 30.

Después de la limpieza de las secuencias y su empalme se obtuvo en promedio 203451 secuencias, es decir, se conservó aproximadamente el 40 % de las secuencias crudas, al eliminar

las secuencias quiméricas se obtuvo en promedio 196.862 secuencias que representa el 39 % de las secuencias originales y al hacer la asignación taxonómica en promedio se obtuvo 125.254,5 secuencias por muestra lo que representa únicamente el 24 % de las secuencias crudas. Las secuencias asignadas fueron agrupadas por unidad taxonómica operativa en 289 distintos OTUs, el mayor número de OTUs fue de 137 y se encontró en la muestra de planta con síntomas de enfermedad y tratamiento de *Trichoderma* (TE).

3.3. Perfiles Taxonómicos y diversidad

A partir de la tabla de OTUs se elaboraron los perfiles taxonómicos (Figura 5) en los cuales se encontró que en la comunidad fúngica el phylum más abundante con 71,0 % es el de los Ascomycetos, seguido por 17,0 % de Mortierellomicetos y 11,0 % de los Basidiomicetos, se encuentran también otros phyla con menos del 1,0 % como son Mucoromycota, Glomeromycota, Rozellomycota, Aphelidiomycota, entre otros, las diferencias entre tratamientos no son significativas.

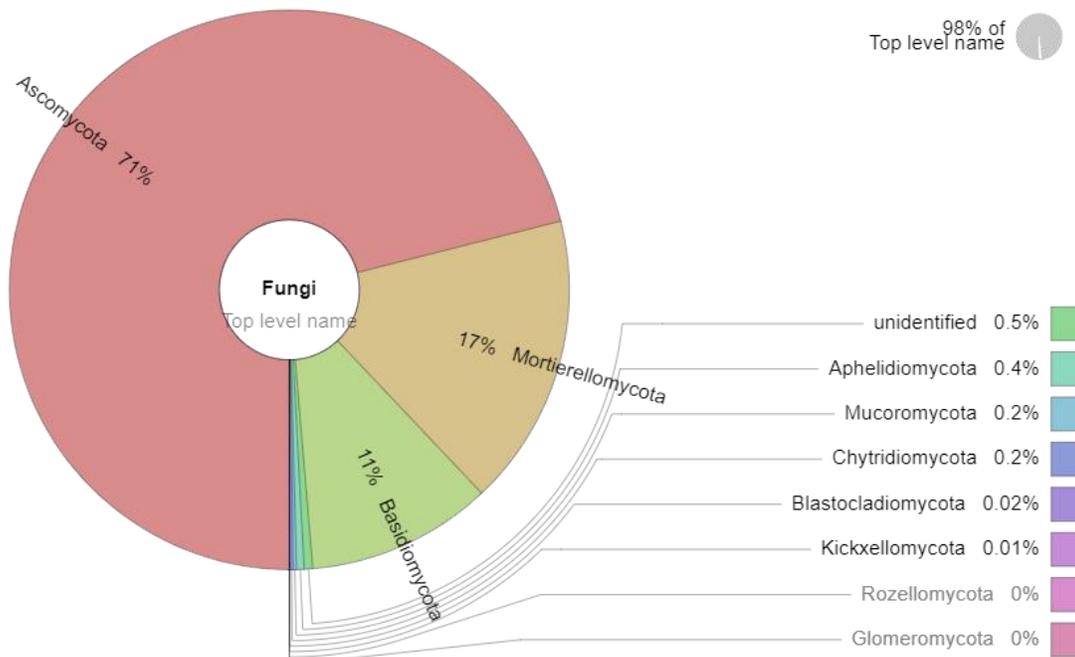


Figura 5. Filos presentes en las muestras de suelo.

Además, se encontró 43 géneros principales (Figura 6) es decir que al menos representan el 0,1 % del total. Entre estos géneros destaca la presencia del género *Ascobolus* con un promedio de 26,03 %, seguido por 16,9 % del género *Mortierella*, que es mayor en la muestra de suelo de planta sana sin tratamiento de *Trichoderma* (NS) que en las otras muestras ($p < 0,05$).

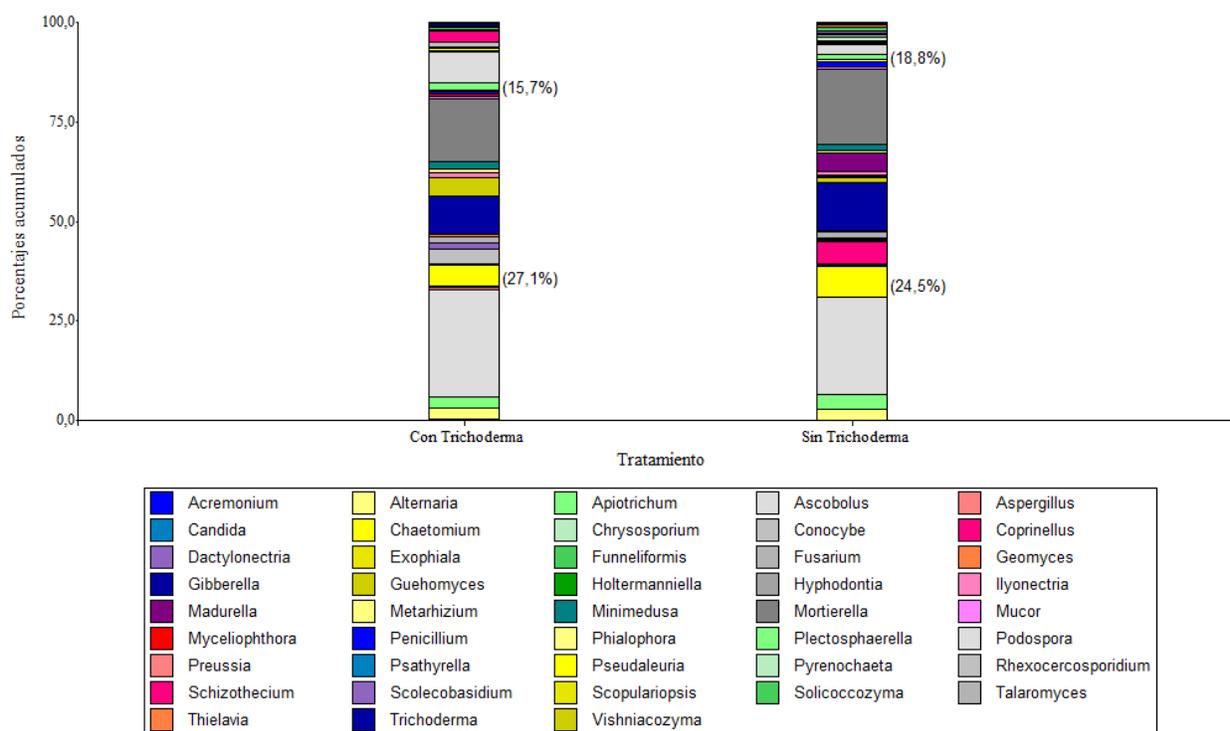


Figura 6. Porcentajes acumulados de los 43 géneros principales encontrados, comparación entre muestras tratadas con Trichoderma y muestras sin tratamiento.

Al comparar entre los cuatro tratamientos se encontró que la muestra TS tiene mayor abundancia de hongos del género Ascóbulus, 31,6 % y la muestra NS tiene una abundancia de 24,9 % de hongos del género Mortierella que es mayor con respecto a los otros tratamientos y además es el género con mayor abundancia en esta muestra (Figura 7).

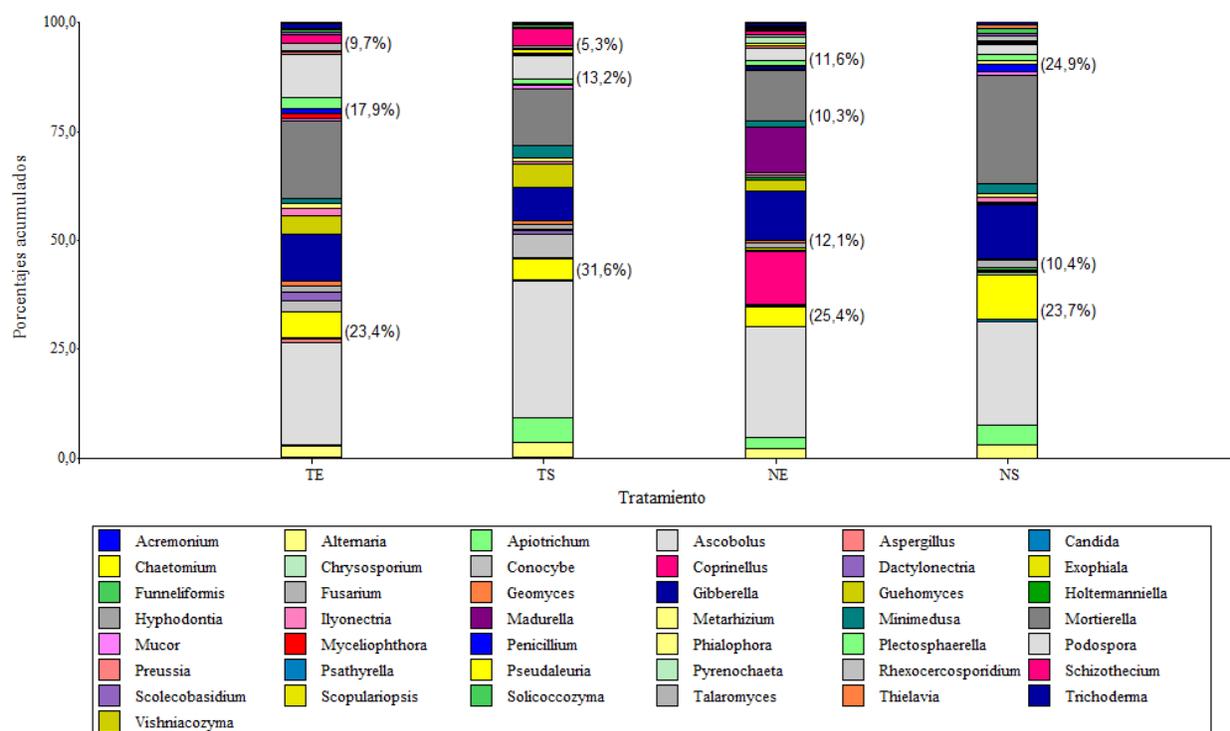


Figura 7. Porcentajes acumulados de los 43 géneros principales encontrados, comparación entre muestras tratadas con *Trichoderma* con síntomas y sin síntomas de enfermedad y muestras sin tratamiento con síntomas y sin síntomas de enfermedad.

Se realizó una comparación entre tratamientos de tres géneros de hongos importantes para este estudio, *Trichoderma*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria*. Hongos del género *Trichoderma* utilizados como agente de control biológico se encuentran presentes en las muestras de los cuatro tratamientos, la abundancia relativa es mayor en la muestra de suelo de planta enferma con *Trichoderma* (TE) y es menor en la muestra de suelo de planta sana con tratamiento de *Trichoderma* (TS), no se encuentran diferencias significativas.

Con respecto a los géneros patógenos relacionados con la enfermedad de pie negro, *Dactylonectria* e *Ilyonectria*, se encuentran presentes en mayor cantidad en la muestra de plantas enfermas con tratamiento de *Trichoderma* (TE).

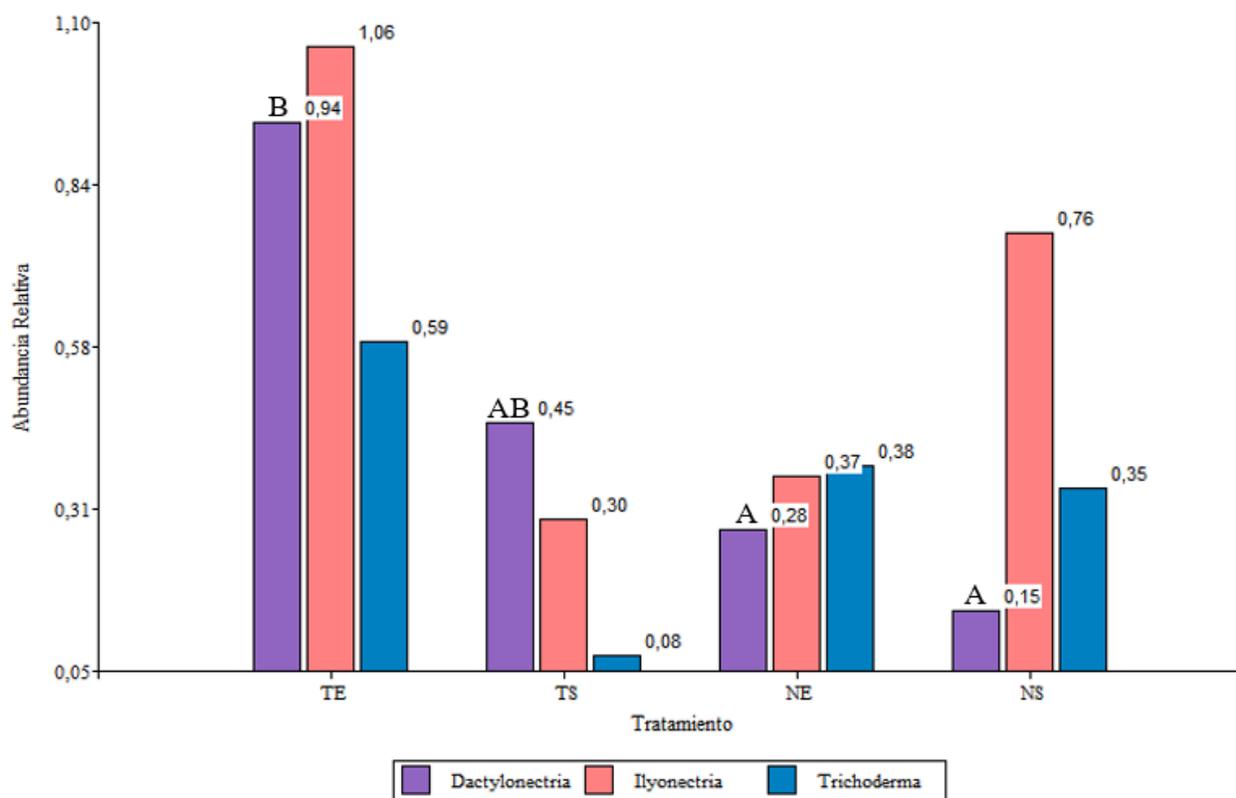


Figura 8. Abundancia relativa de *Trichoderma*, *Dactylonectria*, *Ilyonectria* en los cuatro tratamientos.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Se realizó una comparación de la presencia de los géneros patógenos entre las muestras con síntomas de enfermedad y sin síntomas de enfermedad, no se encontraron diferencias significativas, sin embargo, al comparar con respecto al tratamiento con *Trichoderma* y sin *Trichoderma* (Figura

9), se encuentra que es mayor la presencia del género *Dactylonectria* en las muestras con tratamiento de *Trichoderma*, esta diferencia es significativa ($p < 0,05$).

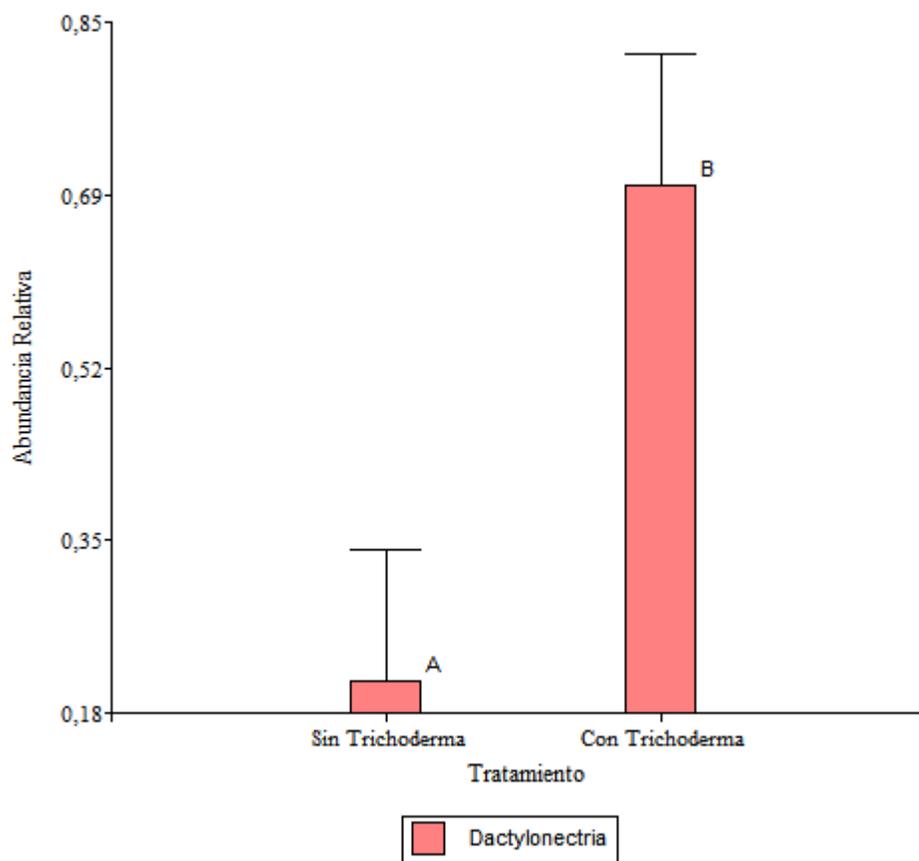


Figura 9. Abundancia relativa del género *Dactylonectria* en muestras con tratamiento de *Trichoderma* y muestras sin tratamiento.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.3.1 Diversidad fúngica

Se calcularon los índices de diversidad a nivel de género, con lo cual se encontró que las muestras sin tratamiento de *Trichoderma* tienen mayor abundancia (Figura 10) en comparación a las muestras con tratamiento de *Trichoderma*.

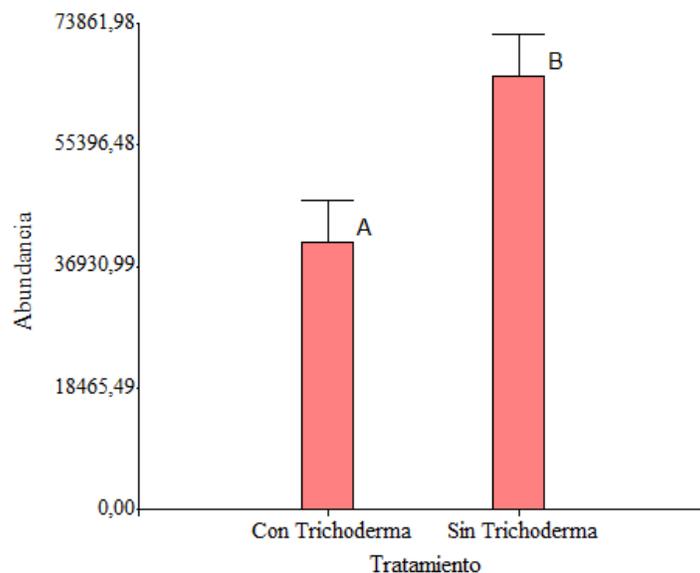


Figura 10. Abundancia de hongos en muestras con tratamiento de *Trichoderma* y muestras sin tratamiento.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Se calculó el índice de Shannon y se determinó que entre los dos tratamientos no hubo diferencias significativas (Figura 11), las muestras con tratamiento de *Trichoderma* tuvieron un índice de Shannon de $2,21 \pm 0,46$ y para las muestras sin *Trichoderma* el índice fue de $2,05 \pm 0,23$.

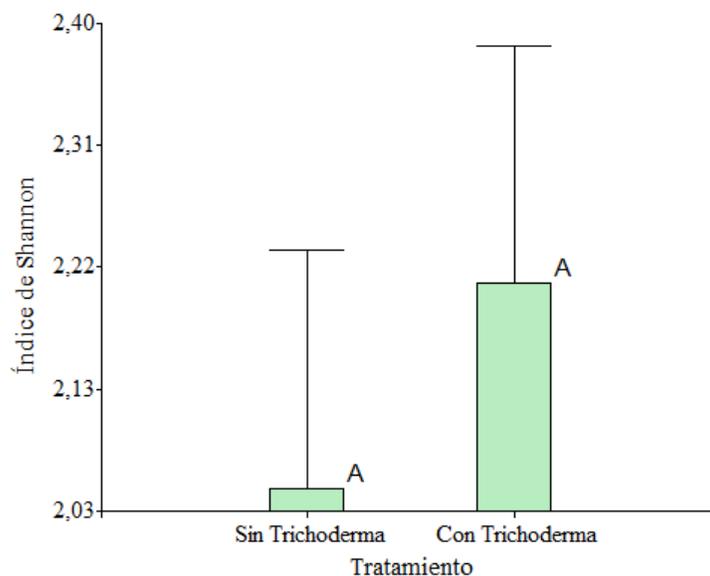


Figura 11. Índice de Shannon para muestras con tratamiento de *Trichoderma* y muestras sin tratamiento.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.3.2. Grupos Tróficos y asignación de grupos ecológicos

Con respecto a los grupos tróficos se realizó una comparación entre cuatro tratamientos, se encontraron hongos patrótrofos, saprótrofos y simbiótrofos. En la Figura 12, se puede ver que el mayor porcentaje de hongos patrótrofos, 38,1 %, se encuentra en la muestra TE y el menor porcentaje, 24,5 %, pertenece a la muestra TS, con respecto a los hongos saprofitos el mayor porcentaje, 75,4 %, se encuentra en la muestra TS y el menor, 50,0 %, pertenece a la muestra NS, además el mayor porcentaje de los hongos simbiótrofos, 16,2 % , corresponde a la muestra NS y el menor, 0,1 %, a la muestra TS. Sin embargo, con una prueba Duncan al 95 % de nivel de

confianza, no se encontró diferencia significativa en la presencia de cada grupo trófico en los distintos tratamientos.

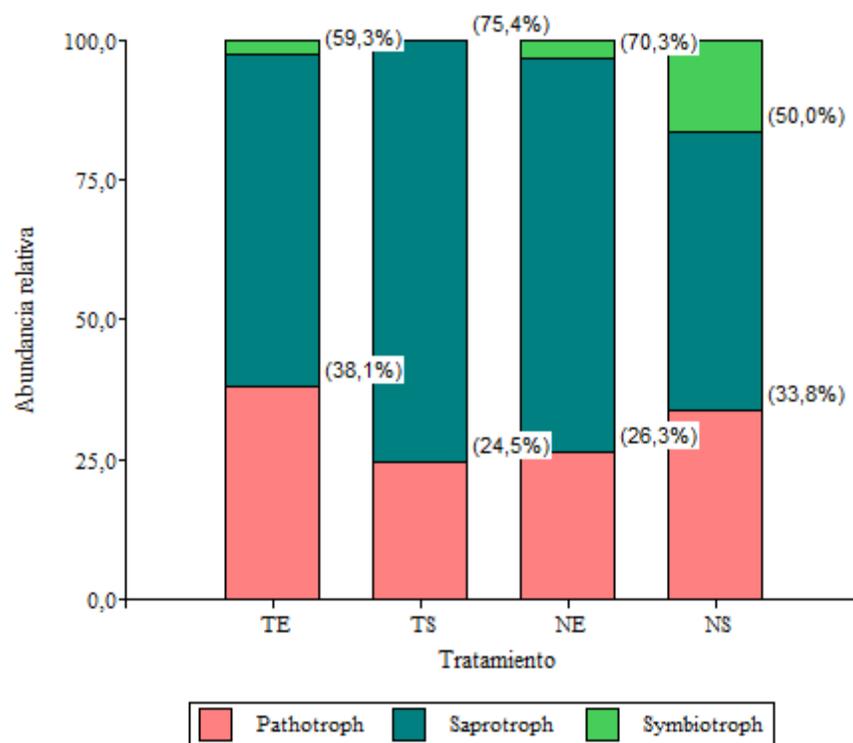


Figura 12. Porcentaje de abundancia relativa de los grupos tróficos en los cuatro tratamientos.

Con respecto al grupo ecológico al que afectan se encontraron hongos fitopatógenos, endófitos, patógenos de animales, saprofitos para plantas, animales, madera, suelo, ectomicorrizas, parásitos de hongos, entre otros, como se observa en la Figura 13.

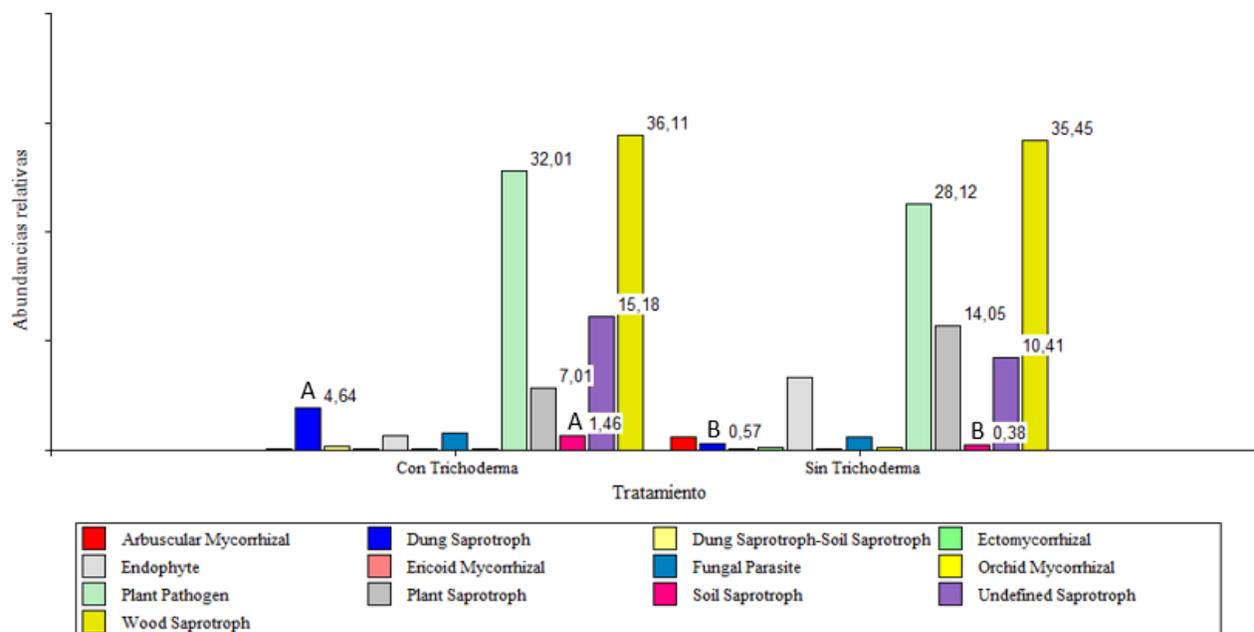


Figura 13. Abundancia relativa de los grupos ecológicos al que afectan en muestras con tratamiento de *Trichoderma* y muestras sin tratamiento.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Se realizó una comparación entre muestras con tratamiento de *Trichoderma* y sin tratamiento de *Trichoderma*, la presencia con mayor porcentaje fue de los saprofitos de la madera con 36,11 % seguido por los patógenos de plantas con 32,01 % en la muestra con tratamiento de *Trichoderma*, sin embargo, no hubo diferencias significativas entre tratamientos, además se determinó que en el tratamiento con *Trichoderma* hay mayor presencia de saprofitos del suelo (Soil Saprotroph) y saprófitos del estiércol (Dung Saprotroph) con diferencia significativa mediante una prueba Duncan al 95 % de nivel de confianza.

3.3.2.1 Patógenos de plantas

Se comparó entre los cuatro tratamientos la presencia de hongos patógenos de plantas, 22.313 hongos están presentes en la muestra NS mientras que tan solo 8.753 hongos patógenos se encuentran en la muestra de suelo de plantas sanas con tratamiento de *Trichoderma* (TS), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

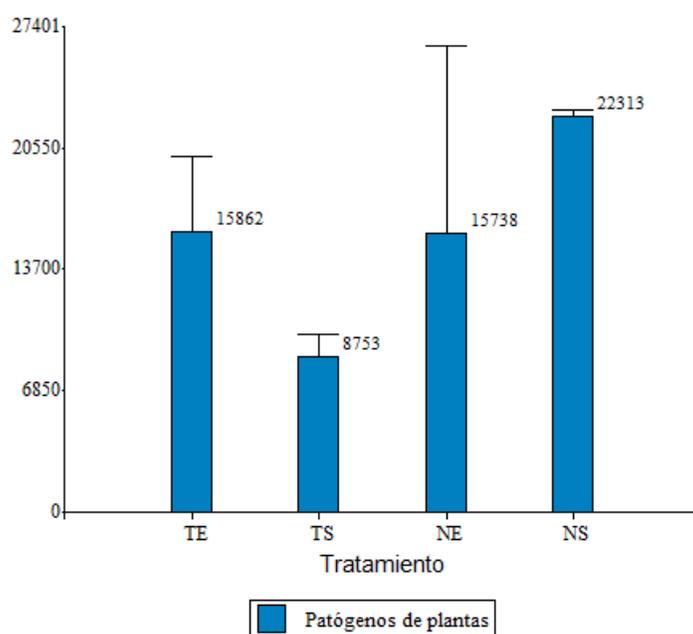


Figura 14. Abundancia de hongos de géneros patógenos de plantas, comparación en los cuatro tratamientos.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

Se encontraron algunos géneros de hongos patógenos, entre ellos se destaca la presencia de *Alternaria* y *Fusarium*, se realizó una comparación entre muestras con tratamiento de *Trichoderma*

y sin *Trichoderma* (Figura 15) y se observó que en las muestras sin tratamiento es mayor la abundancia de estos tres géneros.

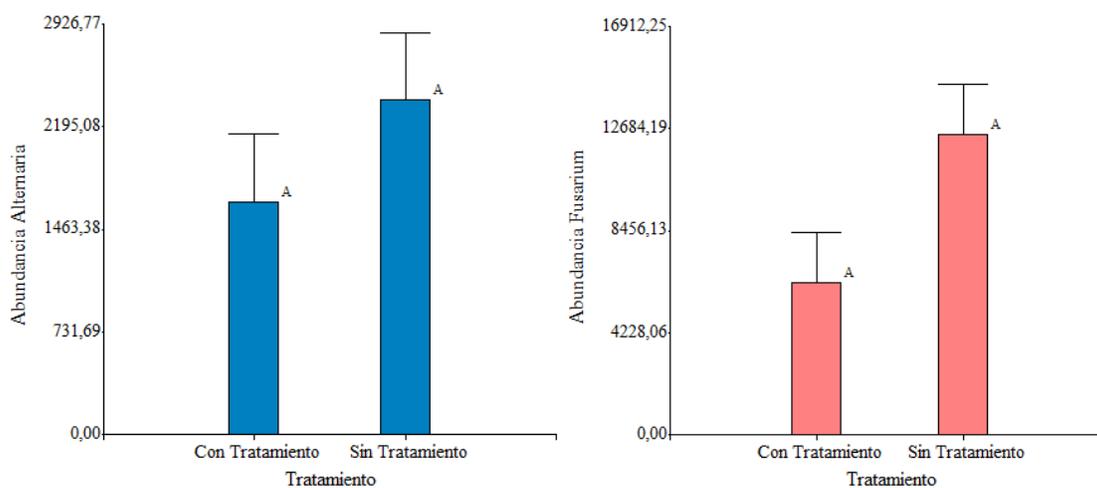


Figura 15. Abundancia de los principales géneros de hongos patógenos encontrados en muestras con tratamiento de *Trichoderma* y muestras sin tratamiento.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

3.4 Aislamiento de *Trichoderma*

Se aislaron 10 cultivos puros de los cuales 5 fueron identificados por tinción con azul de metileno como hongos del género *Trichoderma* (Figura 16), se realizó la extracción de DNA de dos cultivos morfológicamente distintos y se amplificó la región ITS con los primers ITS1 y 4 y en un gel de agarosa se detectó la presencia de bandas de aproximadamente 600 pb (Figura 17).



Figura 16. Conidióforos de *Trichoderma* (40X)

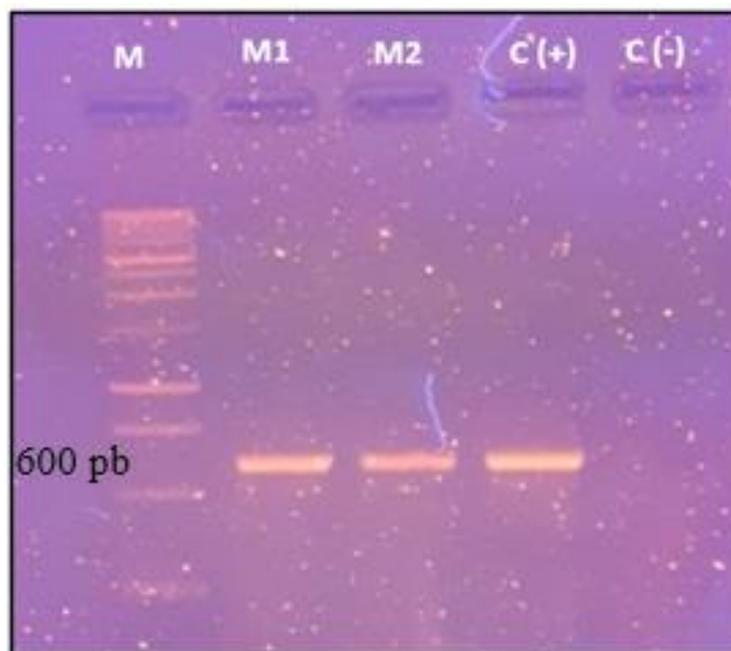


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa 1 %
Nota: Productos amplificados de la región ITS de *Trichoderma* por PCR con primers ITS1 y 4. C (+) control positivo, C (-) control negativo.

Al analizar con BLAST las secuencias enviadas por Macrogen, se obtuvo como resultado que los cultivos aislados pertenecen a *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma hamatum*.

Tabla 6

Resultados del análisis con BLAST.

Muestra	Longitud secuencia	Calidad secuencia	Query coverage	E- value	Organismo	Fragmento	% identidad	N° Accesoión
M1	495	88,7	100%	0,00E+00	<i>Trichoderma asperellum</i>	ITS 1-4	99	KY214244.1
M2	507	69,7	100%	0,00E+00	<i>Trichoderma hamatum</i>	ITS 1-4	99	LN846702.1

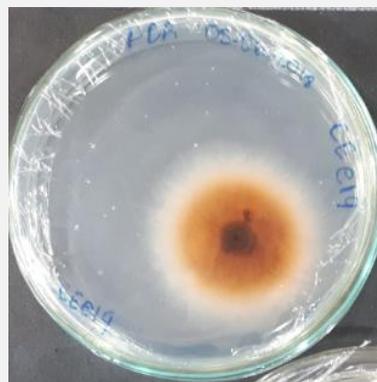
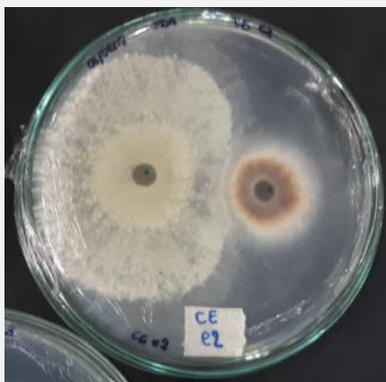
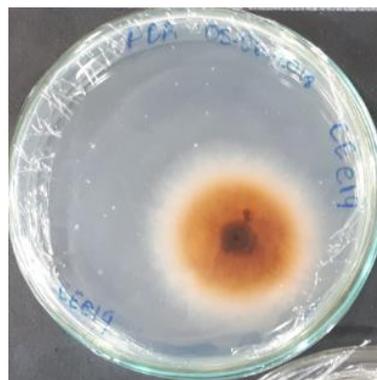
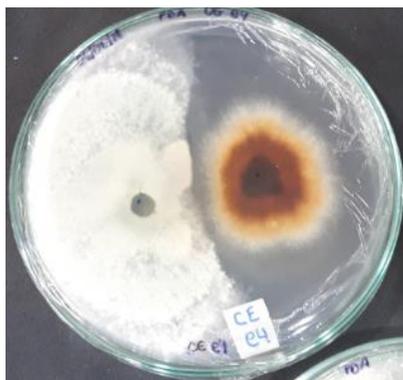
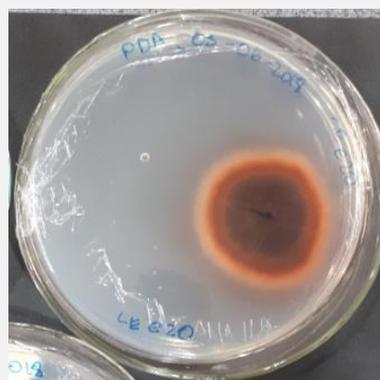
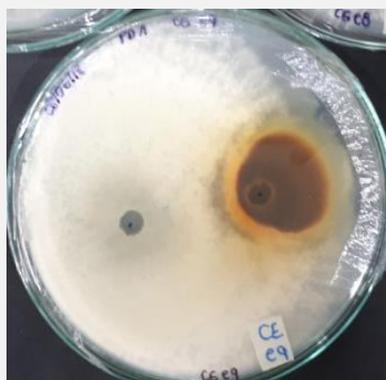
3.5 Ensayo de antagonismo

En el primer ensayo de antagonismo se realizaron 6 enfrentamientos, cada uno con 3 repeticiones, como se puede ver en la Tabla 7, los patógenos presentan diferencias en su color y tamaño con respecto al control.

Tabla 7*Primer ensayo de antagonismo.*

Ensayo a las 144h

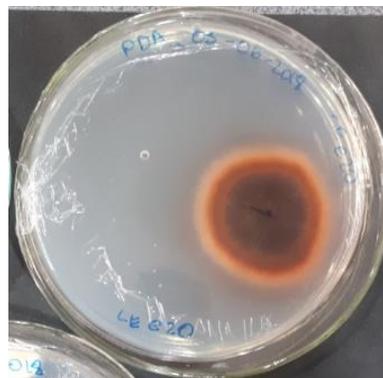
Control

E1: *T. asperellum* VS *I. vredenhoekensis**I. vredenhoekensis*E2: *T. hamatum* VS *I. vredenhoekensis**I. vredenhoekensis*E3: *T. asperellum* VS *I. venezuelensis**I. venezuelensis***CONTINÚA →**

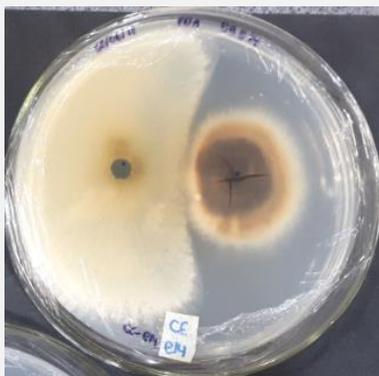
E4: *T. hamatum* *I. venezuelensis*



I. venezuelensis



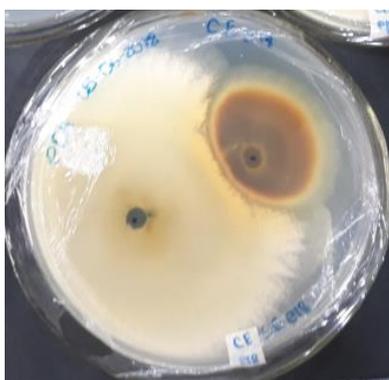
E5: *T. asperellum* VS *I. robusta*



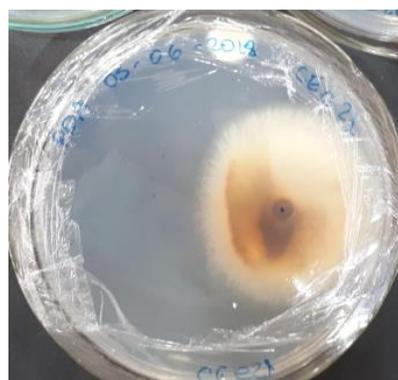
I. robusta



E6: *T. hamatum* VS *I. robusta*



I. robusta



En el segundo ensayo de antagonismo se utilizó *T. asperellum* comercial frente a los 3 hongos patógenos, en la Tabla 8 se puede observar las diferencias entre el control y los fitopatogenos enfrentados al antagonista.

Tabla 8

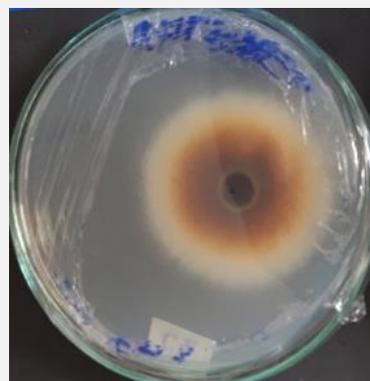
Segundo ensayo de antagonismo.

Ensayo 2 a las 144h

Control

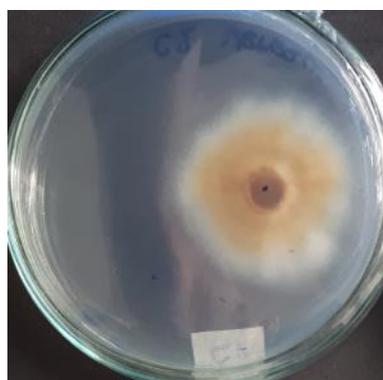
T1: *T. asperellum* (Comercial) VS *I. robusta*

I. robusta

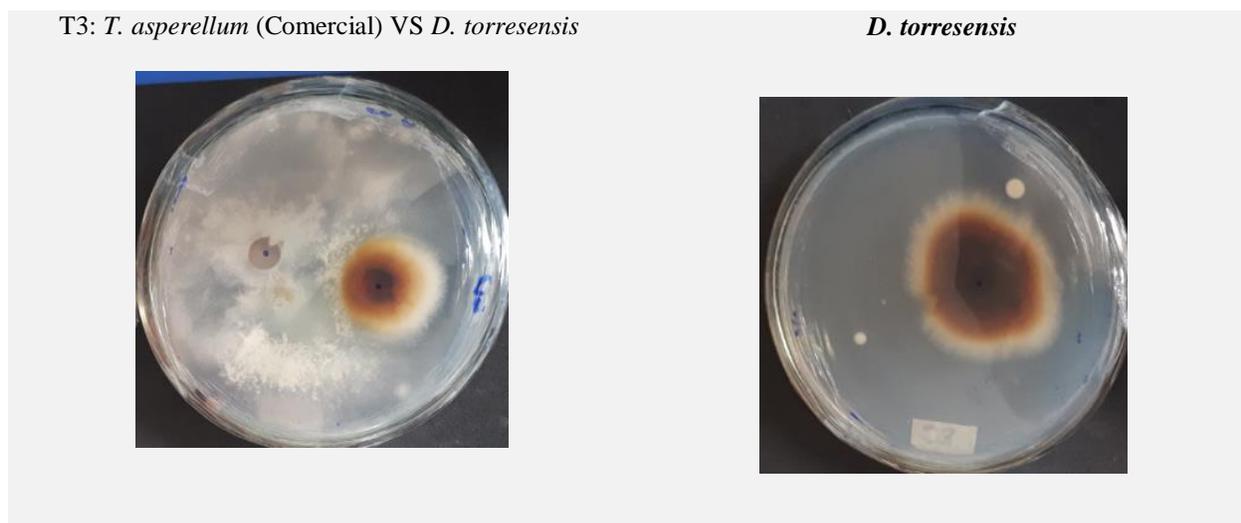


T2: *T. asperellum* (Comercial) VS *I. venezuelensis*

I. venezuelensis



CONTINÚA →



Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) y se determinó que, para el primer ensayo a las 144 horas, *T. hamatum* muestra el mayor porcentaje de inhibición de 56,79 % frente a *I. robusta* (E6), el menor porcentaje fue de 33,3 % de *T. asperellum* frente a *I. venezuelensis* (Figura 18). Mientras que, en el segundo ensayo, el mayor porcentaje de inhibición fue de 59,52 % de *T. asperellum* comercial frente a *I. robusta* (T1) y el menor porcentaje fue de 42,31 % de *T. asperellum* comercial frente a *I. venezuelensis* (Figura 19).

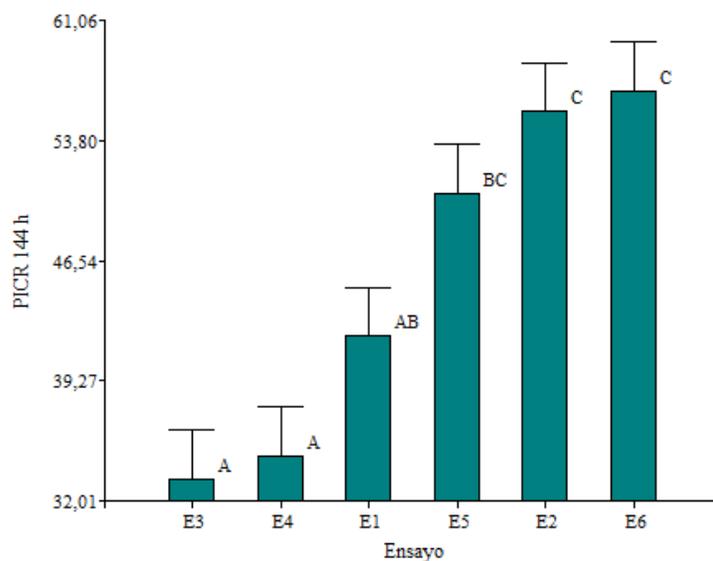


Figura 18. Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial en el primer ensayo.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

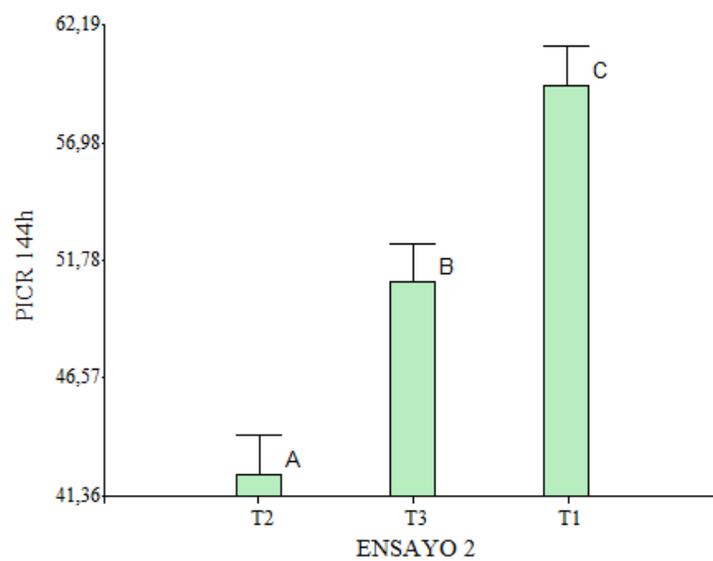


Figura 19. Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial en el segundo ensayo.

Nota: Barras con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En este estudio se realizó la caracterización de la comunidad fúngica de la rizosfera de cultivos de mora de Castilla con y sin tratamiento de *Trichoderma spp*, para lo cual las muestras recolectadas fueron tomadas a 20 cm de profundidad justo en el sitio donde se coloca el tratamiento de *Trichoderma* con un sacabocados como lo propone Bach et al (2018), sin embargo, Herre, Julian, & Marschner, (2018) consideran que para el estudio de las comunidades en la rizosfera se debe recolectar el suelo que queda adherido a las raíces de la planta después de agitarlas suavemente.

Las comunidades fúngicas de los suelos tanto con tratamiento como sin tratamiento de *Trichoderma*, se encuentran dominados por el filo *Ascomycota* con promedio de más del 71 % del total de hongos, lo que coincide con Keiblinger, et al. (2018) y Klaubauf et al. (2010) que reportaron que en los suelos agrícolas es común la presencia dominante de este filo.

La diversidad fúngica se midió con el índice de Shannon (H') a nivel de género, este índice caracteriza la diversidad basada en el número de género/ especies presentes y la abundancia de organismo por género/ especie (Allen, Kon, & Bar-Yam, 2013), en este caso los valores obtenidos en las muestras con tratamiento de *Trichoderma* y sin tratamiento fueron de 2,21 y 2,05 respectivamente, según Somarriba (1999) valores entre 2 y 3 indican que la zona tiene una biodiversidad normal, valores mayores a 3 son zonas con biodiversidad alta (Romero, 2017).

No se encontraron reportes de cálculo de índice de Shannon en suelo de cultivos de mora de Castilla, sin embargo, en un estudio hecho por Schmidt, Mitchell, & Scow (2018) se calcula H' a una profundidad de 15 a 30 cm (que coincide con la profundidad a la que se realizó este estudio)

y es de 2,70. Este valor es mayor al encontrado en el presente estudio, debido a que la diversidad y la composición de las comunidades fúngicas de suelos agrícolas depende de muchos factores, del tipo de cultivo, del manejo del suelo previo al cultivo, del uso de abono y/o fungicidas, entre otros (Wagg, Bender, Widmer, & Van der Heijden, 2014; Nie, et al., 2018).

Según Fraç, Hannula, Bełka, & Jędrzycka (2018) en el suelo existen géneros de hongos cuya presencia sirve como indicador de baja calidad del suelo ya que son hongos perjudiciales, entre estos se encuentran *Rhizoctonia*, *Fusarium* y *Alternaria*. En este estudio se determinó la presencia de hongos del género *Fusarium* y *Alternaria*, la abundancia de ambos géneros es mayor en muestras sin tratamiento de *Trichoderma*, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre tratamientos. Hongos del género *Fusarium* son fitopatógenos causantes de enfermedades del trigo, maíz, papa, entre otros cultivos de importancia agro- económica (Desjardins, 2003)

Por otro lado, Fraç et al. (2018) también menciona que hay hongos indicadores de salud en el suelo, entre estos se encuentran los hongos saprofitos, simbiótrofos y los antagonistas como es el caso de *Trichoderma* spp. La muestra con mayor abundancia de hongos saprofitos fue la de suelo de plantas sin síntomas de enfermedad y con tratamiento de *Trichoderma* (TS), los hongos saprofitos son clave en la degradación de material vegetal muerto, el ciclo del carbono, la movilización de nutrientes (Nguyen, et al., 2015, Schmidt, Mitchell, & Scow, 2018).

También se determinó que la mayor presencia de hongos *Trichoderma* se dio en la muestra de una planta enferma con tratamiento de *Trichoderma* (TE), la abundancia relativa fue de 0,59, a priori no se podía determinar que porcentaje de todos los hongos pertenecerían al género *Trichoderma*, sin embargo en un estudio realizado por Zhang, Xu, Huo, Xiao (2018) la mayor

abundancia relativa recuperada en suelos inoculados con *Trichoderma* es de 0,28 por lo cual la abundancia relativa de hongos del género *Trichoderma* es algo esperado.

Trichoderma es uno de los géneros de hongos más importantes conocido por su actividad antifúngica contra hongos patógenos. Dos Santos, et al. (2016) reportó la capacidad de *Trichoderma* spp. tanto in vivo e in vitro para inhibir el crecimiento de *Dactylonectria macrodidyma* agente causal de la enfermedad de pie negro en la vid.

En este estudio, en el primer ensayo de antagonismo el mayor porcentaje de inhibición fue de 56,79 % de *T. hamatum* frente a *I. robusta* y en el segundo ensayo el mayor porcentaje de inhibición alcanzado fue de 59,52 % por *T. asperellum* comercial frente a *I. robusta* ambos a los 6 días, estos resultados son mejores que los reportados por Dos Santos, et al. (2016) donde enfrentan a varios productos comerciales de *T. asperellum* frente a *D. macrodidyma* y su mayor porcentaje de inhibición alcanzado es de 44,2 % a los 14 días.

Según García, et al. (2017) el porcentaje obtenido en ambos ensayos demuestra un nivel medio de competencia por nutrientes y espacio sin embargo, en las fotografías de las Tablas 7 y 8 se observa que *Trichoderma* no crece encima del hongo patógeno como se ha descrito en otros ensayos de antagonismo de *Trichoderma* frente a otros fitopatógenos, como es el caso reportado por Ezziyyani, Pérez, Ahmed, Requena, & Candela (2004) de *T. harzianum* que invade totalmente a *Phytophthora capsici*, esporula sobre el mismo y además hay una reducción del tamaño del fitopatógeno, todo esto debido a que *T. harzianum* produce antibióticos y enzimas que degradan la pared celular, importantes en el micoparasitismo.

Los mecanismos de antagonismo que *T. hamatum* y *T. asperellum* emplean consiste en la competencia por nutrientes y espacio, el micoparasitismo y la producción de sustancias inhibitorias, metabolitos secundarios o antibióticos extracelulares, enzimas con acción lítica, (Verma, Brar, Tyagi, Surampalli, & Valéro, 2007), en las fotografías de las tablas 7 y 8 se puede comparar el aspecto del fitopatógeno del cultivo dual con respecto al control, se observa que existe cambio de color, probablemente por la presencia de los metabolitos secundarios producidos por el antagonista.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

A partir de la elaboración de perfiles taxonómicos se determinó que las comunidades fúngicas de los suelos tanto con tratamiento como sin tratamiento de *Trichoderma*, se encuentran dominados por el filo *Ascomycota*.

En los cuatro tratamientos, se encontró hongos patrótrofos, saprótrofos y simbiótrofos. La muestra TE tiene el mayor porcentaje de hongos patógenos presentes.

Se aisló hongos del género *Trichoderma* siendo estos *T. asperellum* y *T. hamatum* y se determinó que tienen capacidad inhibitoria frente a hongos patógenos relacionados con la enfermedad del pie negro en la mora.

Los resultados de este estudio no demuestran la hipótesis planteada sobre que existen diferencias significativas en el porcentaje de organismos benéficos y patógenos entre los distintos tratamientos, sin embargo, el estudio posee limitaciones ya que solo se realizaron 2 repeticiones por muestra en un solo sitio, además después de la revisión de vasta bibliografía se determinaron otras metodologías para el muestreo que serían más adecuadas para este tipo de estudio.

CAPÍTULO VI: RECOMENDACIONES

Se recomienda para futuros análisis de la rizosfera extraer ADN de la tierra que está directamente en contacto con las raíces de las plantas de mora, siguiendo el protocolo descrito por Herre, Julian, & Marschner, (2018).

Para poder establecer diferencias significativas es necesario analizar un mayor número de muestras por lo cual se recomienda aumentar el número de repeticiones.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., & Lu, G. D. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial Pathogenesis*, 7-18.
- Agamez, E., Barrera, J., & Oveido, L. (2009). Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* sp. En sustrato de plátano en medio líquido estático. *Acta biológica Colombiana*, 61-70.
- Agamez, E., Barrera, J., & Oviedo, L. (2009). Evaluación del antagonismo y multiplicación de *Trichoderma* sp. En sustrato de plátano en medio líquido estático. *Acta biol. Colomb.*, 61-70.
- Agustí, C., & Armengol, J. (2013). Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea* .
- Allen, B., Kon, M., & Bar-Yam, Y. (2013). A New Phylogenetic Diversity Measure Generalizing the Shannon Index and Its Application to. *The American Society of Naturalists*, 236-243.
- Badii, M. H., & Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *Daena: International Journal of Good Conscience*, 82-89.
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. (2014). Historical Perspective, Development and Applications of Next-Generation Sequencing in Plant Virology. *Virus*, 106-136.
- Benítez, T., Rincon, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 249- 260.
- Bisen, K., Keswani, C., Patel, J. S., Sarma, B. K., & Singh, H. B. (2016). *Trichoderma* spp.: Efficient Inducers of Systemic Resistance in Plants. *Microbial-mediated Induced Systemic Resistance in Plants*, 185-195.
- Bonfiglioli, R. (2006). *New Zealand update on black foot disease*. New Zeland: The Australian & New Zealand Grapegrower & Winemaker.

- Cadena, J. D., Martínez, M. D., Guzmán, L. F., Arteaga, R. I., & De Morelos, T. (2016). Aplicación de la secuenciación masiva para el estudio y exploración de diversidad microbiana y su aprovechamiento biotecnológico. *Agroproductividad*.
- Contreras, H., Macías, L., del Val, E., & Larsen, J. (2016). *Ecological functions of Trichoderma spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: Interactions with plants*. México: FEMS Microbiology Ecology Advance Access.
- Contreras, H., Macías, L., Del-Val, E., & Larsen, J. (2016). Ecological function of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *Microbiology Ecology*.
- Desjardins, A. E. (2003). Gibberella from A (Venaceae) to z (Eae) . *Annual Review of Phytopathology*, 177-198.
- Dos Santos, R. F., Heckler, L. I., Lazarotto, M., Garrido, L., Rego, C., & Blume, E. (2016). *Trichoderma* spp. and *Bacillus subtilis* for control of *Dactylonectria macrodidyma* in grapevine. *Phytopathologia Mediterranea*, 293-300.
- Duarte, Y., Lamz, A., & Martínez, B. (2017). In vitro antagonism of *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg isolates against *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Revista de Protección Vegetal*.
- Ezziyyani, M., Pérez, C., Ahmed, A., Requena, M., & Candela, M. E. (2004). *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum* L.). *Anales de Biología*, 36-45.
- Flores, F. J., Iturralde, P., Tello, C., Ayala, L., Viera, W., Martínez, A., . . . Proaño, N. (2018). *Dactylonectria* and *Ilyonectria* species associated with black foot disease of Andean blackberry (*Rubus glaucus* Benth) in Ecuador.
- Frąc, M., Hannula, S. E., Bełka, M., & Jędrzycka, M. (2018). Fungal Biodiversity and Their Role in Soil Health. *Frontiers in microbiology*.
- Freire, V. (2012). *Alternativas de mejora en el manejo y comercialización de la mora de Castilla proveniente de la provincia de Tungurahua*. Tesis de grado Escuela Politécnica Nacional.
- Harman, G. E. (2005). Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96, 190-194.
- Howell, C. R. (2003). Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*.

- Hoyos, L., Duque, G., & Orduz, S. (2008). Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 76-86.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., & Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Vegetal*, 14-21.
- Iturralde, P. (2017). *Identificación molecular y determinación de una metodología para la inoculación de Ilyonectria sp., asociado a la marchitez en plantas de mora de Castilla (Rubus glaucus)*. Tesis de Grado Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE.
- Keiblinger, K., Schneider, M., Gorfer, M., Paumann, M., Deltedesco, E., Berger, H., . . . Zeheter, F. (2018). Assessment of Cu applications in two contrasting soils—effects on soil microbial activity and the fungal community structure. *Ecotoxicology*.
- Kulski, J. K. (2016). Next-Generation Sequencing — An Overview of the History, Tools, and “Omic” Applications. *INTECH*, 1-58.
- Kumar, G., Maharshi, A., Patel, J., Mukherjee, A., Singh, H. B., & Sarma, B. K. (2017). *Trichoderma* : A Potential Fungal Antagonist. *SATSA Mukhapatra - Annual Technical Issue*, 206-218.
- Martínez, A., Vásquez, W., Viteri, P., Jácome, R., & Ayala, G. (2013). *Ficha técnica de la variedad de mora sin espinas (Rubus glaucus Benth) INIAP Andimora-2013*. Técnicos Programa Nacional de Fruticultura – Granja Tumbaco-EESC-INIAP.
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*.
- Martínez, B., Pérez, J., Infante, D., Duarte, Y., & Moreno, M. (2013). Antagonismo de aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a *Didymella bryoniae* (Fuckel) Rehm. *Revista de Protección Vegetal*.
- Mendes, R., Garbeva, P., & Raaijmakers, J. M. (2013). The rhizosphere microbiome: significance of plant-beneficial, plant-pathogenic and human-pathogenic microorganisms. *The ISME journal*.
- Nguyen, N., Song, Z., Bates, S., Branco, S., Tedersoo, L., Menke, J., . . . Kennedy, P. (2015). FUNGuild: An open annotation tool for parsing fungal community datasets by ecological guild. *Fungal Ecology*.

- Nie, S., Lei, X., Zhao, L., Brookes, P. C., Wang, F., Chen, C., & Xing, S. (2018). Nie, S., Lei, X., Zhao, L., Brookes, P. C., Wang, F., Chen, C., ... Xing, S. (2018). Fungal communities and functions response to long-term fertilization in paddy soils. *Applied Soil Ecology*, 251–258.
- Nieto, M. F., Steyaert, J. M., Salaza, F. B., Vi Nguyen, D., Rostás, M., Braithwaite, M., . . . Mendoza, A. (2017). Environmental Growth Conditions of *Trichoderma* spp. Affects Indole Acetic Acid Derivatives, Volatile Organic Compounds, and Plant Growth Promotion. *Frontiers in Plant Science*.
- Plantas Nativas de la Hoya de Quito*. (2016). Obtenido de <http://plantasnativas.visitavirtualjbq.com/index.php/emblematicas/1-rubus-glaucus>
- Producción de mora, un potencial en Tungurahua. (16 de Noviembre de 2017). *La Hora*. Recuperado el 15 de Agosto de 2018, de <https://lahora.com.ec/tungurahua/noticia/1102114515/produccion-de-mora-un-potencial-en-tungurahua->
- Reino, J., Guerrero, R., Hernández, R., & Collado, I. (2008). *Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma*. Cádiz: Phytochem Rev.
- Schmidt, R., Mitchell, J., & Scow, K. (2018). Cover cropping and no-till increase diversity and symbiotroph:saprotroph ratios of soil fungal communities. *Soil Biology and Biochemistry*.
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 787-799.
- Shuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnology*, 787-799.
- Verma, M., Brar, S., Tyagi, R., Surampalli, R. Y., & Valéro, J. R. (2007). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 20.
- Wagg, C., Bender, S. F., Widmer, F., & Van der Heijden, M. G. (2014). Soil biodiversity and soil community composition determine ecosystem multifunctionality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 5266-5270.